



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio preclínico y clínico sobre los efectos del consumo de aceitunas arbequina

Aldo Alain Gómez Contreras

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**ESTUDIO PRECLÍNICO Y CLÍNICO SOBRE LOS EFECTOS DEL  
CONSUMO DE ACEITUNAS ARBEQUINA**

**Aldo Alain Gómez Contreras**  
Barcelona, 2023



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT:  
BIOTECNOLOGIA

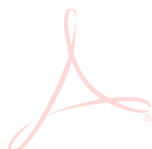
**ESTUDIO PRECLÍNICO Y CLÍNICO SOBRE LOS EFECTOS DEL  
CONSUMO DE ACEITUNAS ARBEQUINA**

Memoria presentada por **Aldo Alain Gómez Contreras** para optar al título de Doctor por la  
Universitat de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada en el grupo de Fisiología i Nutrició Experimental bajo la supervisión  
de la **Dra. Joana Maria Planas Rosselló** y la **Dra. Maria Emília Juan Olivé**.

**Dra. Joana Maria Planas Rosselló**  
(Directora de la tesis)

**Dra. Maria Emília Juan Olivé**  
(Directora de la tesis)



**Dra. Joana Maria Planas Rosselló**  
(Tutora de la tesis)

**Aldo Alain Gómez Contreras**  
(Doctorando)

**Aldo Alain Gómez Contreras**  
Barcelona, 2023



Esta tesis ha sido subvencionada por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013- 41188) y la Generalitat de Catalunya (2014SGR1221 y 2017SGR945). Durante su realización, el doctorando ha recibido financiamiento de la Beca "Presidente de la Republica" del Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo del Ministerio de Educación del Perú (PRONABEC-MINEDU, desde abril de 2019 a marzo de 2023). La asistencia a congresos ha sido subvencionada por la Comissió de Recerca de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació mediante bolsas de viaje. La tesis se ha llevado a cabo en el grupo de investigación consolidado Fisiología i Nutrició Experimental de la Secció de Fisiologia del Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona y en Tècniques Separatives dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT-UB).





# INDICE

---

---





---

INDICE.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	V
INDICE DE TABLAS.....	IX
RESUMEN DE LA TESIS .....	1
I. INTRODUCCION.....	7
1.1 ACEITUNA DE MESA .....	7
1.1.1 <i>Tipos de aceitunas de mesa: variedad y procesado</i> .....	7
1.1.2 <i>Composición nutricional</i> .....	9
1.1.2.1 Características nutricionales de la aceituna de mesa .....	10
1.1.2.2 Características no nutricionales de la aceituna de mesa.....	11
1.1.3 <i>Efectos sobre la salud</i> .....	12
1.1.3.1 Actividad antioxidante.....	12
1.1.3.2 Actividad antiinflamatoria .....	13
1.1.3.3 Actividad cardioprotectora .....	14
1.1.3.4 Actividad anticancerígena.....	15
1.1.3.5 Actividad antimicrobiana .....	16
1.2 ACEITUNA DE MESA Y MICROBIOTA INTESTINAL .....	16
1.2.1 <i>Papel de la microbiota y sus metabolitos en la hipertensión</i> .....	17
1.2.1.1 Ácidos grasos de cadena corta.....	17
1.2.1.2 Ácido gamma-aminobutírico .....	18
1.2.1.3 Lipopolisacárido.....	18
1.2.1.4 N-óxido de trimetilamina .....	19
1.3 INTERVENCIÓN NUTRICIONAL.....	19
1.3.1 <i>Tipos de intervención nutricional</i> .....	19
1.3.1.1 Suplementos nutricionales .....	19
1.3.1.2 Intervención con un solo alimento/bebida o componente dietético .....	19
1.3.1.3 Intervención con prueba de alimentación controlada .....	20
1.3.2 <i>Diseño de ECA</i> .....	20
1.3.2.1 Diseño paralelo .....	20
1.3.2.2 Diseño cruzado .....	21
1.3.2.3 Diseño factorial .....	21
1.3.2.4 Diseño de conglomerados.....	21

II. OBJETIVOS.....	25
2.1 ESTUDIO PRECLÍNICO EN RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS.....	25
2.2 ESTUDIO CLÍNICO EN VOLUNTARIOS SANOS .....	25
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	29
3.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL CONSUMO DE ACEITUNAS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATA .....	29
3.1.1 <i>Animales de experimentación</i> .....	30
3.1.2 <i>Animales de experimentación</i> .....	30
3.1.3 <i>Aceitunas de mesa</i> .....	30
3.1.3.1 Dosis administrada.....	32
3.1.3.2 Preparación del homogenado de aceitunas .....	32
3.1.4 <i>Medición de la presión arterial</i> .....	33
3.1.5 <i>Determinación de biomarcadores en plasma</i> .....	33
3.1.5.1 Recolección de las muestras de sangre .....	33
3.1.5.2 Determinación de malondialdehído .....	33
3.1.5.3 Determinación de angiotensina II.....	34
3.1.5.4 Determinación de interleucina 6.....	35
3.1.5.5 Determinación del factor de necrosis tumoral alfa .....	35
3.1.6 <i>Análisis de la microbiota fecal</i> .....	36
3.1.6.1 Recolección de muestras fecales .....	36
3.1.6.2 Extracción del ADN fecal .....	36
3.1.6.3 Cuantificación, pureza e integridad del ADN.....	37
3.1.6.4 Análisis del gen 16S rRNA .....	38
3.1.6.5 Análisis bioinformático .....	38
3.1.6.6 Diversidad y composición de la microbiota fecal.....	38
3.1.7 <i>Análisis estadístico</i> .....	38
3.2 INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN HUMANOS .....	40
3.2.1 <i>Diseño de la intervención nutricional</i> .....	40
3.2.2 <i>Participantes del estudio</i> .....	41
3.2.2.1 Tamaño de la muestra del estudio.....	41
3.2.2.2 Criterios de inclusión de los voluntarios.....	42
3.2.2.3 Criterios de exclusión de los voluntarios.....	42

3.2.2.4	Criterios de eliminación del estudio .....	43
3.2.3	<i>Asignación de los participantes a cada secuencia del estudio</i> .....	43
3.2.4	<i>Producto de la intervención nutricional</i> .....	43
3.2.4.1	Aceitunas de mesa arbequina.....	43
3.2.4.2	Dosis administrada.....	45
3.2.5	<i>Visitas de evaluación</i> .....	45
3.2.5.1	Recolección de muestras de sangre .....	45
3.2.5.2	Recolección de muestras de orina.....	46
3.2.6	<i>Variables biológicas estudiadas</i> .....	46
3.2.7	<i>Adherencia a la intervención</i> .....	46
3.2.8	<i>Análisis estadístico</i> .....	47
IV.	RESULTADOS .....	51
4.1	ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN RATAS CONTROLES NORMOTENSAS E HIPERTENSAS .....	51
4.1.1	<i>Peso corporal, consumo de pienso y de agua en ratas controles normotensas e hipertensas</i> .....	51
4.1.2	<i>Presión arterial de ratas controles normotensas e hipertensas</i> .....	51
4.1.3	<i>Biomarcadores plasmáticos en ratas controles normotensas e hipertensas</i> .....	52
4.1.4	<i>Microbiota fecal de ratas controles normotensas e hipertensas</i> .....	53
4.1.4.1	Diversidad alfa y beta .....	53
4.1.4.2	Composición de la microbiota fecal de ratas controles normotensas e hipertensas .....	55
4.1.4.3	Interacciones bacterianas en la microbiota fecal de ratas control normotensas e hipertensas ..	57
4.1.5	<i>Taxones bacterianos relacionados con la presión arterial en ratas controles normotensas e hipertensas</i> .....	58
4.2	EFFECTO DEL CONSUMO DE ACEITUNAS SOBRE LA MICROBIOTA FECAL DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS .....	60
4.2.1	<i>Efecto del consumo de aceitunas sobre el peso corporal de ratas normotensas e hipertensas</i> .....	60
4.2.2	<i>Efecto del consumo de aceitunas sobre la ingesta de pienso y de agua de ratas normotensas e hipertensas</i> .....	61
4.2.3	<i>Efecto sobre la presión arterial de ratas normotensas e hipertensas</i> .....	61
4.2.4	<i>Efecto de la administración de aceitunas sobre biomarcadores asociados a la presión arterial en ratas normotensas e hipertensas</i> .....	61
4.2.5	<i>Efecto de la ingesta de aceitunas sobre la microbiota fecal de ratas normotensas e hipertensas</i> ..	62
4.2.5.1	Cambios en la microbiota fecal de ratas normotensas controles y tratadas con aceitunaS .....	62

4.2.5.2	Cambios en la microbiota fecal de ratas hipertensas controles y tratadas con aceitunas .....	65
4.2.5.3	Cambios en la interacción bacteriana de la microbiota fecal de ratas normotensas e hipertensas tratadas con aceitunas.....	67
4.2.6	<i>INTERVENCIÓN NUTRICIONAL: CONSUMO DIARIO DE ACEITUNAS EN ADULTOS SANOS</i> .....	68
4.2.7	<i>Características basales de los participantes del estudio</i> .....	68
4.2.8	<i>Principales medidas de resultado</i> .....	72
4.2.8.1	Efecto del consumo de aceitunas sobre el peso corporal de adultos sanos.....	72
4.2.8.2	Efecto del consumo de aceitunas sobre la presión arterial de adultos sanos .....	73
4.2.8.3	Efecto del consumo de aceitunas sobre el perfil lipídico de adultos sanos.....	75
4.2.8.4	Efecto del consumo de aceitunas sobre la peroxidación lipídica de adultos sanos.....	80
4.2.8.5	Determinación del efecto de la intervención nutricional sobre las principales medidas de resultado .....	81
4.2.9	<i>Efecto del consumo de aceitunas sobre la hematología y la bioquímica clínica de adultos sanos</i> .....	84
4.2.10	<i>Parámetros de adherencia a la intervención</i> .....	86
V.	DISCUSIÓN.....	91
VI.	CONCLUSIONES .....	107
6.1	ESTUDIO PRECLÍNICO EN RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS.....	107
6.2	INTERVENCIÓN NUTRICIONAL: CONSUMO DIARIO DE ACEITUNAS EN ADULTOS SANOS .....	108
VII.	BIBLIOGRAFIA.....	113
VIII.	ANEXOS .....	131

<b>Figura 1.1</b>	Proceso de producción de las aceitunas de mesa .....	9
<b>Figura 1.2</b>	Representación esquemática de los principales mecanismos moleculares involucrados en las actividades biológicas de los polifenoles de la <i>Olea europaea</i> L....	13
<b>Figura 1.3</b>	Representación esquemática de los principales mecanismos moleculares involucrados las actividades biológicas de los triterpenos pentacíclicos de la <i>Olea europaea</i> L.....	15
<b>Figura 1.4</b>	Diseños de ensayos clínicos aleatorizados.....	22
<b>Figura 3.1</b>	Diseño experimental del estudio del efecto de la administración de aceitunas sobre la microbiota fecal y biomarcadores relacionados con la hipertensión en ratas.....	30
<b>Figura 3.2</b>	Preparación del homogenado de aceitunas de mesa arbequina.....	32
<b>Figura 3.3</b>	Diseño experimental de la intervención nutricional con aceitunas en adultos sanos.....	40
<b>Figura 4.1</b>	Concentraciones plasmáticas de malondialdehído, angiotensina II, interleucina 6 y factor de necrosis tumoral alfa en ratas WKY-c y SHR-c de 21 semanas de edad.....	53
<b>Figura 4.2</b>	Lecturas alineadas a cada nivel taxonómico.....	53
<b>Figura 4.3A</b>	Diversidad alfa a las 14 y 21 semanas de edad de la microbiota fecal de ratas WKY-c y ratas espontáneamente SHR -c.....	54
<b>Figura 4.3B</b>	Diversidad beta en ratas WKY-c y SHR-c a las 14 y 21 semanas de edad.....	54
<b>Figura 4.4A</b>	Abundancia relativa a nivel de filo en ratas WKY-c SHR-c.....	56
<b>Figura 4.4B</b>	Abundancia relativa a nivel de género en ratas WKY-c SHR-c.....	56
<b>Figura 4.5</b>	Relación entre Firmicutes y Bacteroidetes en ratas WKY-c y SHR-c a las 14 y 21 semanas de edad.....	57
<b>Figura 4.6</b>	Red de interacciones bacterianas en la microbiota fecal de WKY-c y SHR-c a las 21 semanas de edad.....	58
<b>Figura 4.7</b>	Mapa de calor de la correlación de rango de Spearman entre los taxones bacterianos de la microbiota fecal de las ratas SHR-c y WKY-c y la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica, el malondialdehído y la angiotensina II a las 21 semanas de edad.....	59

<b>Figura 4.8</b>	Efecto del consumo diario de aceitunas durante siete semanas sobre las concentraciones plasmáticas de malondialdehído, angiotensina II, interleucina 6 y factor de necrosis tumoral alfa en ratas WKY y SHR.....	62
<b>Figura 4.9A</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la diversidad alfa de la microbiota fecal de ratas WKY-c.....	63
<b>Figura 4.9B</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la diversidad beta de la microbiota fecal de ratas WKY-c.....	63
<b>Figura 4.10</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la abundancia relativa a nivel de filo en ratas de los grupos WKY-c y WKY-o.....	63
<b>Figura 4.11.</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la relación Firmicutes/Bacteroidetes en ratas de los grupos WKY-c y WKY-o.....	64
<b>Figura 4.12</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la abundancia relativa a nivel de género en ratas de los grupos WKY-c y WKY-o...	64
<b>Figura 4.13</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la abundancia relativa a nivel de especie en ratas de los grupos WKY-c y WKY-o....	65
<b>Figura 4.14A</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la diversidad alfa de la microbiota fecal de ratas de los grupos SHR-c y SHR-o...	66
<b>Figura 4.14B</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la diversidad beta de la microbiota fecal de ratas de los grupos SHR-c y SHR-o....	66
<b>Figura 4.15A</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la abundancia relativa a nivel de filo de ratas SHR-c y SHR-o.....	66
<b>Figura 4.15B</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la relación Firmicutes/Bacteroidetes de ratas SHR-c y SHR-o.....	66
<b>Figura 4.16A</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante 7 semanas, sobre la abundancia relativa a nivel de género de ratas SHR-c y SHR-o.....	67
<b>Figura 4.16B</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas durante 7 semanas, sobre la abundancia relativa a nivel de especie de ratas SHR-c y SHR-o.....	67
<b>Figura 4.17</b>	Red de interacciones bacterianas en la microbiota fecal de WKY-o y SHR-o a las 21 semanas de edad.....	68
<b>Figura 4.18</b>	Esquema CONSORT del proceso de los participantes a través de las fases de este estudio.....	69

<b>Figura 4.19</b>	Efecto del consumo diario de aceitunas arbequina sobre el peso corporal de los participantes.....	73
<b>Figura 4.20</b>	Efecto de la intervención sobre la presión arterial de los participantes.....	75
<b>Figura 4.21</b>	Concentración plasmáticas de triglicéridos durante las fases del estudio.....	77
<b>Figura 4.22</b>	Concentraciones de colesterol en sangre durante las fases del estudio.....	78
<b>Figura 4.23</b>	Cambios en el perfil lipídico al final de cada fase respecto al inicial de los participantes.....	79
<b>Figura 4.24</b>	Concentración plasmática de malondialdehído durante las fases del estudio.....	81





<b>Tabla 1.1</b>	Composición nutricional de las aceitunas de mesa .....	11
<b>Tabla 3.1</b>	Contenido de nutrientes y compuestos bioactivos en 100 gramos de la parte comestible de aceitunas de mesa de la variedad arbequina.....	31
<b>Tabla 3.2</b>	Contenido de nutrientes y compuestos bioactivos en aceitunas de mesa arbequina y en la dosis administrada al grupo de intervención.....	44
<b>Tabla 4.1</b>	Diferencias en el peso corporal, consumo de pienso, ingesta de agua y presión arterial entre las ratas WKY control y SHR control a las 14 y 21 semanas de edad.....	52
<b>Tabla 4.2</b>	Métricas de las redes de co-ocurrencia de WKY-c y SHR-c.....	57
<b>Tabla 4.3</b>	Efecto de la administración diaria de aceitunas arbequina durante siete semanas sobre el peso corporal, consumo de pienso, ingesta de agua y presión arterial en las ratas WKY y SHR respecto a sus controles.....	60
<b>Tabla 4.4</b>	Métricas de las redes de co-ocurrencia de WKY-o y SHR-o.....	68
<b>Tabla 4.5</b>	Características antropométricas y clínicas de los participantes al inicio del estudio según secuencia de aleatorización.....	70
<b>Tabla 4.6</b>	Variables hematológicas y bioquímicas al inicio del estudio, según secuencia de aleatorización.....	71
<b>Tabla 4.7</b>	Peso corporal de los participantes del estudio distribuidos por secuencia, periodo y sexo.....	72
<b>Tabla 4.8</b>	Presión arterial sistólica y diastólica de los participantes del estudio distribuidos por secuencia, periodo y sexo.....	74
<b>Tabla 4.9</b>	Perfil lipídico de los participantes del estudio distribuidos por secuencia, periodo y sexo.....	76
<b>Tabla 4.10</b>	Concentraciones plasmáticas de malondialdehído de los participantes del estudio distribuidos por secuencia, periodo y sexo.....	80
<b>Tabla 4.11</b>	Diferencia desde el inicio de las fases control, arbequina y efecto del consumo de arbequinas sobre el peso corporal, la presión arterial, el perfil lipídico y la concentración de MDA en adultos sanos.....	83
<b>Tabla 4.12</b>	Diferencia desde el inicio de las fases control, arbequina y efecto del consumo de arbequinas sobre las variables hematológicas y bioquímicas en adultos sanos.....	85
<b>Tabla 4.13</b>	Concentraciones urinarias de polifenoles al final de cada fase del estudio.....	87





# RESUMEN

---

---



La aceituna de mesa es un producto característico de la dieta mediterránea y fuente importante de nutrientes, sin embargo, pocos estudios han evaluado su consumo *in vivo*. En consecuencia, los objetivos de la presente tesis han consistido en determinar el efecto de la ingestión de aceitunas sobre biomarcadores asociados a presión arterial (PA) y microbiota intestinal en ratas normotensas e hipertensas, así como su impacto sobre variables antropométricas, hematológicas y bioquímicas de voluntarios sanos en una intervención nutricional. La variedad utilizada ha sido la Arbequina debido a su gran producción y consumo en Cataluña, así como elevado contenido de compuestos bioactivos. En la primera parte de la tesis, se administró una dosis de 3,85 g /kg equivalente al consumo en humanos de 30 Arbequinas durante 7 semanas a ratas espontáneamente hipertensas (SHR-o) y normotensas (WKY-o). Las ratas SHR-c y WKY-c recibieron agua. La suplementación no indujo diferencias en el peso corporal, la ingestión de comida y bebida en SHR-o y WKY-o con respecto a sus controles. Sin embargo, disminuyó PA en aproximadamente 20 mmHg en SHR-o, sin modificar PA de WKY-o. En SHR-o, las aceitunas disminuyeron en un 39% la peroxidación lipídica y en un 32% la angiotensina-II, sin inducir variaciones en WKY-o. No se observaron alteraciones en las concentraciones de IL6 y TNF- $\alpha$  en SHR y WKY controles y tratadas. El análisis de la microbiota fecal mostró una diversidad alfa y beta similar a las 14 y 21 semanas de edad en SHR y WKY controles y tratadas. Al final del estudio, la relación Firmicutes/Bacteroidetes fue superior en las ratas SHR-c respecto WKY-c. La suplementación con aceitunas no modificó esta ratio, pero sí indujo cambios en la abundancia relativa de taxones bacterianos, que fueron diferentes en cada cepa. En WKY-o, se favoreció el crecimiento de *Turicibacter*, *Coprococcus*, *Anaeroplasma* y especies de *Lactobacillus*. Mientras que en SHR-o, se generaron modificaciones en taxones que por correlación de Spearman se habían asociados a normotensión, como la reducción de *Peptoniphilus* y el incremento de *Sutterella* y *Akkermansia*. Asimismo, incrementó *Allobaculum*, asociado a una menor peroxidación lipídica, y *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son probióticas. En la segunda parte, se realizó un ensayo clínico aleatorizado controlado, de diseño cruzado, de dos periodos con un total de 40 voluntarios sanos, 22 hombres y 18 mujeres. El estudio se realizó en el Centro de Investigación del Medicamento - Sant Pau y ha sido registrada en Clinicaltrials.gov (NCT03886597). Los participantes asignados al grupo Arbequina ingirieron 60 aceitunas, que se incluyeron en su dieta habitual y fueron distribuidas en 30 en la comida y 30 en la cena, durante 30 días. Los resultados no muestran diferencias en el peso corporal, la PA, las variables hematológicas, ni bioquímicas de función hepática y renal, ni en hombres ni en mujeres, al comparar el grupo control con el Arbequina. Sin embargo, el consumo de aceitunas sí tuvo un impacto sobre el perfil lipídico, ya que disminuyó significativamente el colesterol total, LDL-c, triglicéridos, VLDL-c y la peroxidación lipídica, respecto el grupo control. La adherencia a la intervención se ha evaluado mediante la determinación por LC-MS/MS de los polifenoles en orina después de la hidrólisis con sulfatasa y glucuronidasa. En el grupo arbequina se han encontrado concentraciones de hidroxitirosol 20 veces superiores, mientras que el ácido *o*-cumárico, tirosol, luteolina, apigenina, pinoresinol y tirosol han sido tres veces superiores al control. En conclusión, el consumo regular de aceitunas promueve, en ratas SHR, una microbiota fecal compatible con su actividad antihipertensiva, y en voluntarios sanos mejora el perfil lipídico, sin incrementar el peso corporal ni PA. Los resultados sugirieron un papel cardioprotector para este alimento.



Table olives are a typical product of the Mediterranean diet and an important source of nutrients. However, the effect of their consumption *in vivo* has been scarcely evaluated. Consequently, the objectives of this thesis have been to determine the effect of olive ingestion on biomarkers associated with blood pressure (BP) and intestinal microbiota in normotensive and hypertensive rats, as well as its impact on anthropometric, hematological, and biochemical variables of healthy volunteers in a nutritional intervention. The variety used has been the Arbequina due to its large production and consumption in Catalonia, as well as its high content of bioactive compounds. In the first part of the thesis, a dose of 3.85 g/kg equivalent to the human consumption of 30 Arbequinas was administered for 7 weeks to spontaneously hypertensive (SHR-o) and normotensive (WKY-o) rats. SHR-c and WKY-c animals received water. The supplementation did not induce differences in body weight, and food and water intake in SHR-o and WKY-o with respect to their controls. However, it decreased BP by approximately 20 mmHg in SHR-o, without changing BP in WKY-o. In SHR-o, olives decreased lipid peroxidation by 39% and angiotensin-II by 32%, without inducing variations in WKY-o. No alterations in IL6 and TNF- $\alpha$  concentrations were observed in control and treated SHR and WKY. Fecal microbiota analysis showed similar alpha and beta diversity at 14 and 21 weeks of age in control and treated SHR and WKY. At the end of the study, the Firmicutes/Bacteroidetes ratio was higher in SHR-c rats than in WKY-c rats. Olive supplementation did not change this ratio, but it did induce modifications in the relative abundance of bacterial taxa, which were different in each strain. In WKY-o, the growth of *Turicibacter*, *Coprococcus*, *Anaeroplasm*a and *Lactobacillus* species was favoured. While in SHR-o, modifications were generated in taxa that had been associated with normotension by Spearman correlation, such as the reduction of *Peptoniphilus* and the increase of *Sutterella* and *Akkermansia*. Likewise, it increased *Allobaculum*, associated with lower lipid peroxidation, and *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which are probiotics. In the second part, a randomized controlled clinical trial, of crossover design and two periods was carried out with a total of 40 healthy volunteers, 22 men, and 18 women. The study was carried out at the Centro de Investigación del Medicamento - Sant Pau and has been registered at [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03886597) (NCT03886597). The participants assigned to the Arbequina group ingested 60 olives, which were included in their regular diet and distributed as 30 for lunch and 30 for dinner, for 30 days. The results did not show differences in body weight, BP, hematological variables, or biochemical variables of liver and kidney function, neither in men nor in women, when comparing the control group with the Arbequina. However, the consumption of olives did have an impact on the lipid profile, since it significantly decreased total cholesterol, LDL-c, triglycerides, VLDL-c, and lipid peroxidation, compared to the control group. Adherence to the intervention has been assessed by LC-MS/MS determination of polyphenols in urine after hydrolysis with sulfatase and glucuronidase. In the arbequina group, 20 times higher concentrations of hydroxytyrosol were found, while *o*-coumaric acid, tyrosol, luteolin, apigenin, pinoresinol, and tyrosol have been three times higher than the control. In conclusion, the regular consumption of olives promotes, in SHR rats, a fecal microbiota compatible with its antihypertensive activity, and in healthy volunteers, it improves the lipid profile, without increasing body weight or BP. The results suggest a cardioprotective role for this food.







# I. INTRODUCCIÓN

---

---



## 1.1 ACEITUNA DE MESA

La aceituna de mesa es uno de los alimentos fermentados vegetales más antiguos del área mediterránea. En el yacimiento arqueológico de la costa del Carmelo (Haifa, Israel) se encontraron utensilios utilizados para su elaboración que fueron datados hace 6.700-6.500 años, por lo que ya en el Calcolítico medio se consumía este alimento (Galili *et al.*, 2021). La aceituna de mesa forma parte de nuestro legado cultural y gastronómico, siendo un producto muy versátil en cuanto a usos se refiere ya que abarca su consumo como aperitivo o como ingrediente en diferentes recetas culinarias. Pero, además, hay que tener presente que las aceitunas de mesa fermentadas representan también un importante alimento saludable, por su alto contenido en compuestos bioactivos y promotores de la salud. Por ello, las aceitunas de mesa son un componente importantes de la Dieta Mediterránea (DM), y de acuerdo con las pautas de la pirámide de DM, las aceitunas, nueces y semillas deben consumirse todos los días en una cantidad moderada de 1 a 2 porciones (como un puñado), lo que representa un opción snack saludable (Serra-Majem *et al.*, 2020). A pesar de ello, hay que remarcar que constituye un alimento poco conocido desde el punto de vista, tanto de sus valores nutricionales como saludables.

### 1.1.1. Tipos de aceitunas de mesa: variedad y procesado

El Consejo Oleícola Internacional (IOC) registra alrededor de 2500 tipos de aceitunas, pero solo el 10% son aptas para el uso comercial, y su selección depende de factores específicos, como su uso para la producción de aceite, para consumo como aceitunas de mesa, o ambas opciones (International Olive Oil Council (IOC), 2013). Las aceitunas de mesa se clasifican en diferentes tipos según el grado de madurez de los frutos frescos y los procesos comerciales de preparación, entre otros factores (Conte *et al.*, 2020).

La Eurostat informó que había alrededor de 1,509,000 explotaciones dedicadas al cultivo de olivos. De estos, España e Italia albergan el 52% y 21% de los olivares de la Unión Europea, respectivamente, seguidos de Grecia y Portugal con el 16% y el 8%. Los demás países miembros de la UE poseen solo una fracción pequeña de la superficie total de olivares. (Rachele Rossi, 2017) Mientras que, en Cataluña, el olivo es un cultivo destacado ya que ocupa casi el 15% de la superficie agrícola y es considerado como el principal cultivo leñoso de la región (Rachele Rossi, 2017).

En España, se han identificado 262 variedades de olivo, de las cuales 23 se consideran principales, incluyendo las variedades Manzanilla, Gordal, Sevillana, Hojiblanca, Cacereña y Aloreña (Barranco y Rallo, 2000). En Cataluña más del 85% de la producción de olivos se concentra en cuatro cultivares

## Introducción

---

autóctonos: Arbequina (representando aproximadamente el 50% de la superficie cultivada), Morrut, Sevillana y Empeltre. Mientras que los cultivares secundarios, como Farga, Argudell, Verdiell y Rojal, representan alrededor del 12,5% de los olivares (Vichi *et al.*, 2019).

Para la elaboración de aceitunas de mesa los frutos de la oliva deben someterse a un tratamiento para eliminar su amargura natural y mejorar su palatabilidad, lo que aumenta su aceptación entre los consumidores (Kailis y Kiritsakis, 2017). Existen tres prácticas importantes utilizadas internacionalmente para preparar las aceitunas de mesa (Figura 1.1). La elección del método de procesamiento depende de la región y la variedad de aceitunas. Las tres prácticas principales son: aceitunas verdes tratadas (también conocidas como aceitunas verdes estilo español), aceitunas oscurecidas por oxidación (conocidas como aceitunas maduras o estilo californiano), y aceitunas naturales (principalmente negras, conocidas como estilo griego) (Ghanbari *et al.*, 2012). Estilo español: Aceitunas verdes al estilo español se obtienen sumergiendo los frutos en una solución de hidróxido de sodio (1,3-2,6% p/v) hasta que el NaOH alcance dos tercios a tres cuartos de la distancia entre la superficie de las aceitunas y el hueso. La lejía hidroliza la oleuropeina (responsable del sabor amargo) en hidroxitirosol no amargo y éster metílico de oleósido-11. Después de lavarlas con agua, se sumergen en una solución de cloruro de sodio (6-8% p/v) para una fermentación láctica suave. Las aceitunas se envasan en salmuera ( $\geq 8\%$  p/v de NaCl) y pueden procesarse más para prolongar la vida útil, mediante la adición de ácido sórbico o pasteurización (62,4°C durante 15 minutos) (Conte *et al.*, 2020; Ghanbari *et al.*, 2012; C. Romero *et al.*, 2004).

- Estilo californiano en salmuera: Se cosechan antes de madurar completamente y se almacenan en salmuera (5-10% p/v de NaCl) durante 2-6 meses con una acidificación media hasta pH 4 usando ácido láctico y acético en condiciones anaeróbicas/aeróbicas para evitar la fermentación. Las aceitunas se tratan con soluciones de NaOH (1-2% p/v) para que el NaOH entre en la pulpa. Entre los tratamientos con NaOH, las aceitunas se oxidan y se oscurecen rápidamente al suspenderlas en agua o en una solución de salmuera débil con aire. Las sales de hierro como gluconato o lactato ferroso mantienen el color negro. Estas aceitunas de mesa se envasan en salmuera y se esterilizan (Ghanbari *et al.*, 2012; C. Romero *et al.*, 2004).
- Estilo griego: Las aceitunas se cosechan en la etapa final de maduración con un color oscuro y se sumergen en una solución de salmuera (8-10% p/v de NaCl), sin un tratamiento previo para reducir el amargor (Conte *et al.*, 2020). Se produce una fermentación natural espontánea impulsada por levaduras y bacterias ácido-lácticas y gramnegativas, en condiciones anaeróbicas o aeróbicas, definida por la disponibilidad de sustrato, el nivel de sal, la

temperatura, el pH y los compuestos antimicrobianos presentes, como los compuestos fenólicos. Durante la fermentación, la amargura de las aceitunas desaparece debido a la difusión de la oleuropeína a la salmuera y la hidrólisis ácida de este compuesto (Ghanbari *et al.*, 2012; C. Romero *et al.*, 2004).

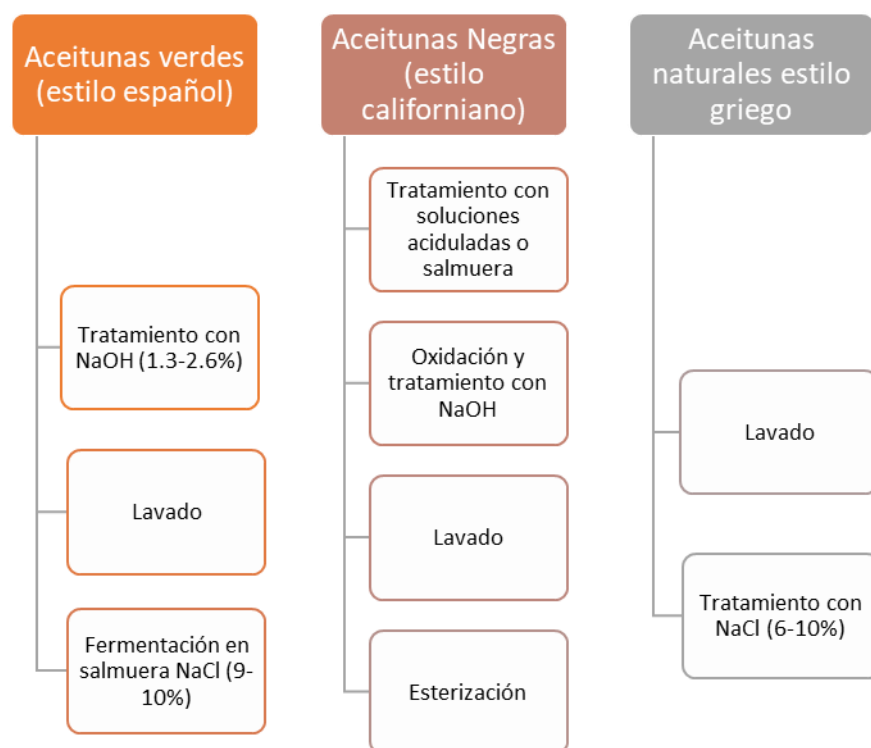


Figura 1.1. Proceso de producción de las aceitunas de mesa (Guo *et al.*, 2018).

### 1.1.2. Composición nutricional

La aceituna de mesa tiene una composición nutricional caracterizada por un equilibrado contenido graso en el que predominan los ácidos grasos insaturados sobre los saturados al igual que en los aceites que se obtienen de ella. Además, las aceitunas contienen aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas, fibra dietética y un conjunto de componentes minoritarios, los polifenoles y los derivados triterpénicos. Estos compuestos minoritarios son microconstituyentes no nutritivos de la dieta, que están presentes en los frutos de la *Olea europaea* L., principalmente en el epicarpio. Se producen como metabolitos secundarios del olivo con la finalidad de proteger la integridad de la aceituna, actuando como agentes antimicrobianos, antifúngicos e insecticidas (Bianchi, 2003). Muchos de estos compuestos son componentes bioactivos cuyas actividades beneficiosas han sido demostradas en ensayos *in vitro* e *in vivo*, utilizando ya sea el compuesto aislado o bien el aceite obtenido de la oliva (Pérez-Martínez *et al.*, 2011; Ruiz-Canela *et al.*, 2011; Soriguer *et al.*, 2013). Es importante destacar que

estos componentes bioactivos se hallan en mayor concentración en las aceitunas que en los propios aceites que se derivan de ellas debido a su pérdida durante el proceso de su extracción (Bianchi, 2003). De ello, se deriva la posible importancia de la aceituna de mesa como fuente alimenticia de estos compuestos que, a su vez, pueden configurarla como un alimento potencialmente funcional.

La estructura anatómica de la aceituna incluye el epicarpio, el mesocarpio y el endocarpio, que influyen en la calidad del producto final. El epicarpio representa el 1-3% del peso de la drupa y cambia de color con la madurez, mientras que el mesocarpio y el epicarpio son la porción comestible que representa del 70-85% del peso total. El endocarpio y la semilla representan del 18-22% y del 2-4% del peso total, respectivamente (Ghanbari *et al.*, 2012).

### 1.1.2.1. Características nutricionales de la aceituna de mesa

El contenido energético promedio de 100 g de aceitunas de mesa en peso escurrido varía de 200 a 250 kcal, lo que representa del 10 al 12,5% de las calorías totales en una dieta de 2000 kcal para un adulto promedio con actividad física limitada (Lanza, 2012). Además de la humedad, que oscila entre 60 y 81 g/100 g de peso escurrido en diferentes aceitunas de mesa, los lípidos son el principal componente, con un rango general de 6-30 g/100 g de peso escurrido (López-lópez *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2020). El nivel de proteínas es bajo, oscilando entre 1,0 y 2,2 g/100 g de peso escurrido, y no varía mucho con el estilo de la aceituna de mesa. A pesar de su pequeña contribución al valor nutricional general de las aceitunas de mesa, las proteínas presentes en ellas son de alta calidad debido a la presencia de todos los aminoácidos esenciales, aunque los ácidos aspártico y glutámico son los más representativos (Boskou, 2017; Lanza, 2012). Los carbohidratos están prácticamente ausentes en las aceitunas de mesa debido a su transformación y eliminación durante la fermentación y el almacenamiento en salmuera (López-lópez *et al.*, 2010). Las aceitunas de mesa son una fuente valiosa de fibra dietética, especialmente de pectina, hemicelulosas, celulosa y lignina. La concentración total de fibra es al menos 1,5 g/100 g de peso fresco y aproximadamente 3 g/100 g de peso fresco en las muestras ya analizadas (Boskou *et al.*, 2015).

Las aceitunas de mesa contienen una serie de micronutrientes de interés, como el  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno, con valores que oscilan entre 1,3 y 9 mg/100 g de peso fresco y 0,04 y 0,26 mg/100 g de peso fresco, respectivamente (Sagratini *et al.*, 2014). También contienen minerales en cantidades significativas, con valores que van desde 2,0 a 6,9 g/100 g de peso fresco, dependiendo de la variedad de aceitunas. En las aceitunas verdes (variedades Gordal, Manzanilla, Hojiblanca y Verdial), los valores varían de 4,2 a 5,5 g/100 g de peso fresco (Rocha *et al.*, 2020). En la tabla 1.1 se muestran la composición media de las aceitunas:

Tabla 1.1. Composición nutricional de las aceitunas de mesa

	Por 100 g de porción comestible	Por ración (40 g)
<b>Nutrientes</b>		
Energía (Kcal)	196	63
Proteínas (g)	0,80	0,3
Lípidos totales (g)	20	6,4
AG saturados (g)	2,81	0,9
AG monoinsaturados (g)	14	4,48
AG poliinsaturados (g)	2,23	0,71
Hidratos de carbono (g)	1	0,3
Fibra (g)	4,4	1,4
Agua (g)	73,80	23,6
<b>Minerales</b>		
Calcio (mg)	63	20,2
Hierro (mg)	1,50	0,5
Yodo (µg)	1	0,3
Magnesio (mg)	12,00	3,8
Zinc (mg)	—	—
Sodio (mg)	2.25	720
Potasio (mg)	91	29,1
Fósforo (mg)	17	5,4
Selenio (µg)	0,9	0,3
<b>Vitaminas</b>		
Tiamina (mg)	0,03	0,01
Riboflavina (mg)	0,07	0,02
Equivalentes niacina (mg)	1,00	0,3
Vitamina B6 (mg)	0,02	0,01
Folatos (µg)	Tr	Tr
Vitamina B12 (µg)	0	0
Vitamina C (mg)	0	0
Vitamina A: Eq. Retinol (µg)	22	7
Vitamina D (µg)	0	0
Vitamina E (mg)	1,99	0,60

Tr: Trazas. Tablas de Composición de Alimentos. Moreiras *et al.*, 2013.

#### 1.1.2.2. Características no nutricionales de la aceituna de mesa

Los fitoquímicos más importantes presentes en las aceitunas de mesa se pueden clasificar en dos categorías: fenólicos y no fenólicos, siendo los compuestos fenólicos los más abundantes. Los



principales compuestos fenólicos en las aceitunas de mesa pertenecen a seis clases diferentes, que incluyen alcoholes fenólicos hidroxitirosol y tirosol, flavonas (luteolina, luteolina-7-O-glucósido, apigenina y apigenina-7-O-glucósido), flavonoles (rutina), antocianinas (cianidina-3-O-glucósido), ácidos fenólicos (ácido 5-O-cafeoilquínico) y un derivado de ácido hidroxicinámico (verbascósido) (Kailis y Kiritsakis, 2017). Los triterpenos pentacíclicos son la principal subclase de compuestos no fenólicos identificados en las aceitunas de mesa, notablemente los ácidos maslínico y oleanólico (Rufino-Palomares, 2022).

### 1.1.3. Efectos sobre la salud

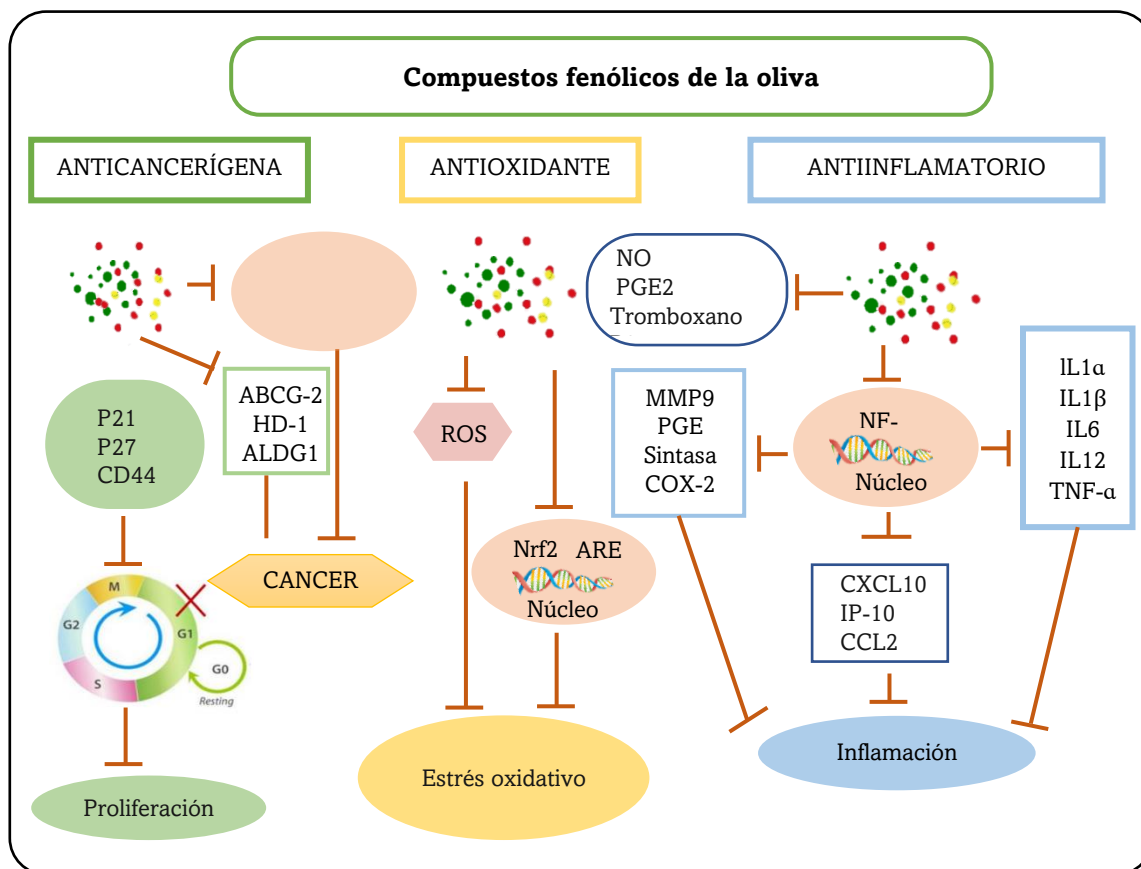
La evidencia sobre los efectos del consumo de las aceitunas de mesa en la salud aun es limitada. Además, la mayor cantidad de estudios se han centrado en las propiedades del aceite de oliva y sus compuestos. Por esta razón se describen los efectos en la salud relacionados principalmente a su contenido de MUFA y compuestos bioactivos como polifenoles y triterpenos pentacíclicos (Rocha *et al.*, 2020). Las principales actividades de los polifenoles y triterpenos pentacíclicos de la oliva en la salud se muestran en las Figuras 1.2 y 1.3.

#### 1.1.3.1. Actividad antioxidante

Entre los compuestos de la oliva que se han estudiado por su capacidad antioxidante se encuentran los polifenoles. De estos dos compuestos se ha descrito su capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS), que participan en la inducción de muchas enfermedades (Romani *et al.*, 2019). Esta capacidad se ha atribuido principalmente a la presencia de un resto 3,4-dihidroxi unido a un anillo aromático, el cual puede estabilizar el radical libre formado (Rocha *et al.*, 2020). Dentro de los compuestos fenólicos de la oliva, los más estudiados son el hidroxitirosol y la oleuropeina; no obstante, el contenido de oleuropeina en aceitunas de mesa es mínimo y menos biodisponible (Rocha *et al.*, 2020; Kountouri *et al.*, 2007), por lo que los efectos del hidroxitirosol resultan más relevantes. El papel del hidroxitirosol como antioxidante se debe principalmente a su capacidad para escindir cadenas de radicales y su actividad quelante (Sroka *et al.*, 2003; Coople *et al.*, 2008). Los estudios respecto a la actividad antioxidante de los polifenoles en humanos han mostrado que pueden reducir el daño oxidativo de lípidos y del ADN (Franconi *et al.*, 2006; Salvini *et al.*, 2006). De hecho, la evidencia respecto a sus propiedades antioxidantes motivó la declaración de la EFSA respecto a su capacidad para proteger a los lípidos en sangre del daño oxidativo (EFSA panel, 2011).

Otros compuestos de la aceituna de mesa de los que se han descrito una capacidad antioxidante, son los triterpenos pentacíclicos. Uno de los más estudiados ha sido el ácido maslínico, del que se ha informado su capacidad de prevenir al prevenir el estrés oxidativo causado por un exceso

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inhibir la capacidad de peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL-c), así como reducir la peroxidación lipídica en las membranas de los hepatocitos (He *et al.*, 2022; Montilla *et al.*, 2003).



**Figura 1.2.** Representación esquemática de los principales mecanismos moleculares involucrados en la acción de las actividades biológicas más importantes relacionadas con el papel de los polifenoles presentes en la *Olea europaea* L. Modificado de Rufino-Palomares *et al.*, 2022.

### 1.1.3.2. Actividad antiinflamatoria

La inflamación, al igual que el estrés oxidativo, se considera un factor importante en el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares (ECV). Para los compuestos fenólicos de la oliva, principalmente del hidroxitirosol, la descripción de sus propiedades antiinflamatorias se basa en su probable capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandina E, reducir la síntesis de citocinas proinflamatorias (IL1, IL1 $\beta$ , IL6, IL12, TNF- $\alpha$ ) y quimiocinas (CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1) (Rocha *et al.*, 2020).

## Introducción

---

Respecto a las propiedades antiinflamatorias de los triterpenos pentacíclicos de la oliva, los estudios realizados con ácido maslínico han mostrado que es capaz de inhibir la producción de NO, interleucina 6 (IL6) y del factor (TNF- $\alpha$ ); de suprimir la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Además, el ácido maslínico puede inducir la activación de la proteína quinasa JNK y en consecuencia con la inhibición de vías de señalización proinflamatorias (Rufino-Palomares *et al.*, 2022).

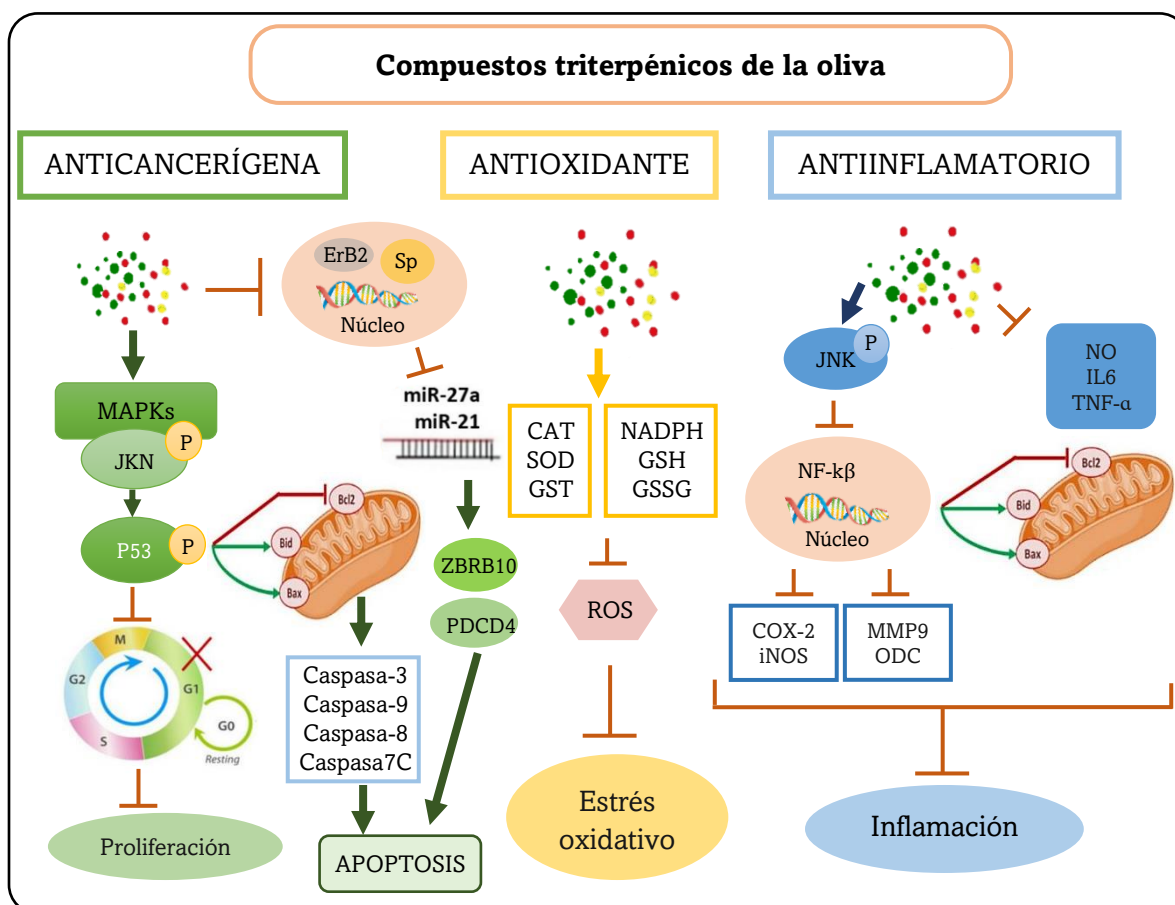
### 1.1.3.3. Actividad cardioprotectora

El contenido de MUFA junto con las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los compuestos bioactivos de la oliva pueden ayudar a reducir factores de riesgo asociados a ECV. Estudios realizados principalmente a partir del consumo de aceite de oliva virgen extra, solo o enriquecido con polifenoles y triterpenos, han mostrado mejoras sobre el estrés oxidativo, la disfunción endotelial, la inflamación, la trombosis, la presión arterial y el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Riolo *et al.*, 2022). Teres *et al.* (2008) mostró que el contenido de ácido oleico del aceite de oliva está relacionado con su efecto hipotensor, a través de un mecanismo de acción basado en la regulación rápida de la estructura lipídica de la membrana celular, que a su vez puede activar o estimular la expresión de moléculas involucradas en la vasodilatación, como el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y la proteína cinasa A (PKA) y restringir las moléculas implicadas en la vasoconstricción, como el inositol trifosfato (IP3), diacilglicerol y Rho quinasa (Teres *et al.*, 2008).

Por otro lado, los estudios realizados respecto al papel cardioprotector de los polifenoles de la oliva, en especial del hidroxitirosol, han destacado su capacidad de prevenir el desarrollo de lesiones ateroscleróticas mediante la reducción del daño oxidativo del LDL-c, la reversión de la angiogénesis mediante la inhibición de la actividad de las MMP-2 y MMP-9, la reducción del daño inflamatorio inducido por citocinas proinflamatorias, la disminución de la formación de eicosanoides y expresión de moléculas de adhesión celular, como la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Rocha *et al.*, 2020; Riolo *et al.*, 2022).

La evidencia de la actividad cardioprotectora de los triterpenos de la oliva, ha señalado que el ácido maslínico puede inhibir la hipertrofia cardíaca, la fibrosis miocárdica y la función cardíaca (Fang *et al.*, 2022). Además, se ha descrito que otros triterpenos de la oliva como el ácido ursólico puede reducir los triglicéridos plasmáticos, colesterol total, LDL-c y la aterosclerosis (Sharma *et al.*, 2018).

Otros estudios han informado que el consumo de aceite de oliva, dentro del patrón de consumo de la dieta mediterránea, se ha asociado a una reducción de eventos cardiovasculares (infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o muerte por causas cardiovasculares), en comparación con una dieta control baja en grasas en una población española (Estruch *et al.*, 2018). Además, se ha observado en una población no mediterránea, que un mayor consumo de aceite de oliva se ha asociado con un menor riesgo de cardiopatía coronaria y ECV (Guasch-Ferré *et al.*, 2020).



**Figura 1.3.** Representación esquemática de los principales mecanismos moleculares involucrados en la acción de las actividades biológicas más importantes relacionadas con el papel de los triterpenos pentacíclicos presentes en la *Olea europaea* L. Modificado de Rufino-Palomares *et al.*, 2022.

#### 1.1.3.4. Actividad anticancerígena

La actividad anticancerígena de los productos de la oliva se ha descrito principalmente asociada a su contenido de compuestos bioactivos. Del hidroxitirosol se ha informado la capacidad de detener el ciclo celular en diferentes fases, reducir la proliferación e inducir la apoptosis de células cancerígenas (Rufino-Palomares *et al.*, 2022). Entre otros polifenoles de la oliva de los cuales se han descrito propiedades anticancerígenas se encuentra la luteolina y el oleocantal. Se ha indicado que la luteolina

## Introducción

---

puede suprimir la expresión del factor eritroide nuclear 2 (Nrf2), de la hemooxigenasa 1 (HO-1 ) y Crypto-1; moléculas importantes para el funcionamiento de las células madre cancerosas (Tsai *et al.*, 2021). Del oleocantal se ha informado su capacidad de inhibir la proliferación y el ciclo celular, así como de inducir la apoptosis en el carcinoma hepatocelular (Pei *et al.*, 2016).

Respecto a las propiedades anticancerígenas de los triterpenos pentacíclicos encontrados en la oliva, varios estudios han demostrado los efectos antiproliferativos y proapoptóticos del ácido maslínico en células HT29 y Caco-2, los mecanismos descritos incluyen la activación de la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), incluida JNK, y p53, induciendo la detención del ciclo celular y el retraso de la genotoxicidad (Rufino-Palomares *et al.*, 2022). También se han descrito la capacidad del ácido betulínico para inhibir la progresión del cáncer en dos líneas de cáncer colorrectal (HCT116 y SW480); así como, la actividad antimigratoria y proapoptótica del uvaol (Rufino-Palomares *et al.*, 2022).

### 1.1.3.5. Actividad antimicrobiana

Diferentes estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de los polifenoles y los triterpenos pentacíclicos de la oliva. Se ha indicado que el hidroxitirosol tienen un efecto antimicrobiano frente a *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* (Crisante *et al.*, 2016; Nazzaro *et al.*, 2019; Rufino-Palomares *et al.*, 2022). En cuanto a la actividad antiviral, estudios in vitro han demostrado que el hidroxitirosol puede inhibir la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Lee-Huang *et al.*, 2007).

Respecto a los triterpenos de la oliva, el ácido maslínico y el ácido oleanólico han mostrado propiedades antimicrobianas frente a bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus mutans* (Blanco-Cabra *et al.*, 2019). Ambos triterpenos también mostraron la capacidad de inhibir el VIH (Medina-O'Donnell *et al.*, 2019). Además, en los últimos años se ha estudiado la capacidad del ácido maslínico, ácido ursólico y del ácido betulínico para actuar como inhibidores de la proteasa del SARS-CoV-2 (Alhadrami *et al.*, 2021).

## 1.2 ACEITUNA DE MESA Y MICROBIOTA INTESTINAL

La investigación de las comunidades microbianas alojadas en el cuerpo humano ha surgido como un área prometedora para comprender el desarrollo de funciones intestinales, trastornos y enfermedades, así como su tratamiento y prevención. Estos microorganismos habitan diferentes partes del cuerpo humano, aunque aproximadamente el 95% se encuentran en el tracto gastrointestinal (Song y Shin, 2022). El término microbioma se refiere al conjunto de genomas de los microorganismos que habitan en un determinado entorno, mientras que la microbiota corresponde a la comunidad de

microorganismos en sí mismo. En el tracto gastrointestinal humano se alojan alrededor de 100 billones de microorganismos, mayoritariamente bacterias, aunque también se encuentran virus, hongos y protozoos. Actualmente, se considera que el microbioma constituye un órgano virtual del cuerpo. En comparación con el genoma humano, que consta de alrededor de 23 000 genes, el microbioma codifica más de tres millones de genes, los cuales producen miles de metabolitos que reemplazan muchas de las funciones del huésped, lo que tiene un impacto en el estado físico, el fenotipo y la salud del hospedero (Valdes *et al.*, 2018). Además, algunos factores internos y externos pueden modular las poblaciones de microbiota, como la edad, el sexo, la dieta, las condiciones de vida, los antibióticos, el estado de salud o la enfermedad, entre otros (Song y Shin, 2022).

### 1.2.1. Papel de la microbiota y sus metabolitos en la hipertensión

En los últimos años, el interés se ha centrado en la relación entre la microbiota intestinal y el estado de salud del huésped. Dado que la microbiota intestinal produce metabolitos activos que participan en varios procesos fisiológicos, una microbiota alterada puede estar implicada en el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas (Fan y Petersen, 2021). Los estudios en modelos animales y humanos han demostrado que la microbiota intestinal de los individuos hipertensos tiene una menor diversidad bacteriana y una composición taxonómica diferente en comparación con los controles normotensos (Cookson, 2021). Esta alteración de la ecología microbiana en el intestino se denomina disbiosis y está asociada a un menor número de bacterias comensales y en consecuencia a una menor producción de metabolitos con un rol en la fisiología del hospedero (Verhaar *et al.*, 2020). Algunos estudios también sugieren un posible papel causal de la disbiosis intestinal en la patogenia de la hipertensión (Adnan *et al.*, 2017). Los estudios respecto a la relación entre la microbiota intestinal y el desarrollo de la hipertensión sugieren que la producción de metabolitos o compuestos microbianos, pueden estar implicados (Verhaar *et al.*, 2020).

#### 1.2.1.1. Ácidos grasos de cadena corta

El butirato, propionato y acetato son ácidos grasos de corta cadena (AGCC) producidos por la microbiota intestinal humana como resultado de la fermentación de fibras dietéticas no digeribles (Verhaar *et al.*, 2020; Cookson, 2021). El butirato es el principal AGCC producido en el colon, mientras que el propionato y el acetato se producen en menor cantidad en el colon y en el intestino delgado, respectivamente (Anachad *et al.*, 2023). El butirato es el principal nutriente de las células epiteliales del colon, lo que contribuye a mantener su integridad y función adecuada. Además, se ha demostrado que el butirato tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, y puede ser útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa (Cookson, 2020; Anachad *et al.*, 2023). El propionato, por su parte, puede ser utilizado por el hígado como fuente de energía y se ha

## Introducción

---

demostrado que puede reducir los niveles de colesterol en sangre. El acetato puede ser utilizado como fuente de energía por otros tejidos del cuerpo y se ha sugerido que puede tener un papel en la regulación del apetito (Verhaar *et al.*, 2020; Cookson, 2021).

En cuanto a la regulación de la presión arterial, se ha encontrado evidencia de que los AGCC, especialmente el butirato, pueden tener un efecto hipotensor al disminuir la resistencia vascular periférica (Verhaar *et al.*, 2020; Cookson, 2021). Se ha propuesto que esto se debe a que los AGCC pueden actuar como precursores de sustancias que tienen propiedades vasodilatadoras, como el óxido nítrico. Además, se ha demostrado que la disminución de la producción de AGCC en el colon está asociada con un aumento de la presión arterial. En este sentido, se ha sugerido que el consumo de alimentos que promueven la producción de AGCC, como las fibras dietéticas y las aceitunas, podría ser una estrategia útil para prevenir la hipertensión arterial (Cookson, 2021; Al Samarraie *et al.*, 2023).

### 1.2.1.2. *Ácido gamma-aminobutírico*

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es un inhibidor de neurotransmisor presente en el cerebro y el sistema nervioso central, pero también se produce en el intestino por ciertas bacterias de la microbiota como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se ha descubierto que la producción de GABA por estas bacterias intestinales tiene un papel importante en la regulación de la presión arterial (Yang *et al.*, 2023). El GABA producido por las bacterias intestinales actúa como una molécula señalizadora que se une a los receptores GABA<sub>B</sub> en las células similares a las enterocromafines (ECC), estimula la liberación de 5-hidroxitriptamina (5-HT), atenúa la respuesta simpática y tiene un efecto hipotensor (Cookson, 2021). Se ha demostrado que la suplementación con GABA puede reducir la presión arterial en humanos y ratones hipertensos, posiblemente a través de la regulación del sistema nervioso simpático y la mejora de la función endotelial (Cookson, 2021).

### 1.2.1.3. *Lipopolisacárido*

El ácido lipopolisacárido (LPS) es un componente de la membrana externa de algunas bacterias Gram-negativas que se encuentran en el intestino. Una elevada concentración de LPS en la luz intestinal degradan las proteínas de unión estrecha y comprometen la integridad de la barrera intestinal (Guo *et al.*, 2013). El paso de LPS a la circulación, puede generar una respuesta inflamatoria crónica y dañar la función del endotelio vascular promoviendo la hipertensión mediante la reducción de los factores vasodilatadores y la mejora de los factores vasoconstrictores (Yang *et al.*, 2023). Estudios recientes han investigado la interacción entre los metabolitos microbianos, encontrando que el butirato puede reducir los efectos proinflamatorios de la estimulación con LPS (Verhaar *et al.*, 2020).

### 1.2.1.4. *N*-óxido de trimetilamina

El *N*-óxido de trimetilamina (TMAO) es actualmente un metabolito altamente investigado por su implicancia en el desarrollo de la hipertensión. Varias bacterias pueden promover la síntesis de TMAO a través de la producción de trimetilamina (TMA) a partir del metabolismo de la fosfatidilcolina, la colina, betaína y la carnitina (Al Samarraie *et al.*, 2023). Desafortunadamente, TMAO puede inhibir la síntesis primaria de ácidos biliares en el hígado, lo que da como resultado una menor activación de los receptores TGR5 en las ECC (Koeth *et al.*, 2013). A nivel, TMAO aumenta la inflamación endotelial e inhibe el NO endotelial, suprimiendo la vasodilatación. Además, Los estudios han demostrado que TMAO mejora la vasoconstricción y la hipertensión inducida por angiotensina II (Yang *et al.*, 2023).

## 1.3 INTERVENCIÓN NUTRICIONAL

Una intervención nutricional comprende una serie de acciones destinadas a cambiar un aspecto nutricional en un individuo o población (Staudacher *et al.*, 2022). Esta puede abarcar una amplia variedad de actividades, desde la administración de nutrientes hasta la implementación de programas de educación nutricional (Staudacher *et al.*, 2022).

### 1.3.1. Tipos de intervención nutricional

#### 1.3.1.1. *Suplementos nutricionales*

Una intervención con suplementos en ensayos clínicos se refiere a un estudio en el que los participantes reciben un suplemento dietético o una combinación de suplementos para evaluar su efecto sobre los resultados de salud. Las modificaciones dietéticas experimentales pueden incluir varios componentes de una dieta, a menudo implicando cambios en los patrones dietéticos de alimentos integrales y, en consecuencia, cambios en múltiples macronutrientes y micronutrientes simultáneamente (Lichtenstein *et al.*, 2021). Un buen ejemplo es la dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra o frutos puede reducir la incidencia de efectos cardiovasculares (Estruch *et al.*, 2018). Los suplementos dietéticos incluyen vitaminas, minerales, hierbas, productos botánicos, aminoácidos y otras sustancias que se consumen por vía oral y están destinadas a complementar la dieta (Estruch *et al.*, 2018).

#### 1.3.1.2. *Intervención con un solo alimento/bebida o componente dietético*

Los alimentos/bebidas o componentes dietéticos únicos en los ensayos de nutrición en los ensayos de nutrición intervencionista se refieren a estudios en los que los participantes consumen un alimento, una bebida o un componente dietético específico para evaluar su efecto sobre un resultado de salud particular.



## Introducción

---

En intervenciones que involucren el uso de un solo alimento o componente dietético, es fundamental proporcionar instrucciones claras a los participantes acerca de su consumo (Abumweis *et al.*, 2010).

### *1.3.1.3. Intervención con prueba de alimentación controlada*

Esta intervención implica proporcionar una cantidad precisa y controlada del alimento o nutriente a un individuo y luego medir los efectos sobre la función fisiológica o metabólica (Staudacher *et al.*, 2017). Es importante considerar la composición de la dieta, la idoneidad de los nutrientes, la rotación del menú y las listas de alimentos/bebidas que no pertenecen al estudio. Por ejemplo, en un estudio de intervención con prueba de alimentación controlada que investiga el efecto de una dieta alta en grasas en la función cardiovascular, se podría proporcionar una comida alta en grasas a un grupo de participantes y medir su respuesta de presión arterial y otros marcadores de salud cardiovascular en un período de tiempo establecido (Staudacher *et al.*, 2017).

### **1.3.2. Diseño de ECA**

En el campo de la nutrición humana, los ensayos controlados aleatorios (ECA) son considerados el estándar de oro para establecer relaciones causales entre la exposición a nutrientes, alimentos o patrones dietéticos y medidas de resultado preespecificadas, como la composición corporal, los biomarcadores o las tasas de eventos (Weaver y Miller, 2017). Estos ECA pueden ser diseñados para generar biomarcadores y/o datos de resultados, identificar mecanismos o desarrollar y validar nuevas tecnologías o métodos.

Los diseños de estudio utilizados comúnmente en ECA de nutrición humana incluyen diseños paralelos, cruzados, factoriales y en conglomerados, entre otros más avanzados (Weaver y Miller, 2017). Cada diseño tiene fortalezas y debilidades, y en algunos casos, la elección del diseño está dictada por la viabilidad (por ejemplo, instalaciones, personal, disponibilidad de la población objetivo). El Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas y muchas revistas revisadas por pares han adoptado los criterios CONSORT (Estándares consolidados de informes de ensayos) para ayudar a mejorar la calidad de los ECA y sus informes (Bennett, 2005).

#### *1.3.2.1. Diseño paralelo*

El diseño de estudio paralelo asigna aleatoriamente a cada participante a una única intervención de estudio, lo que permite comparaciones basadas en la variación entre grupos/entre sujetos (Figura 1.4A). Los grupos de tratamiento pueden ser equilibrados o desequilibrados en cuanto al número de participantes y características demográficas. Este diseño es simple y permite probar múltiples tratamientos simultáneamente, lo que reduce la duración del estudio en comparación con el diseño

cruzado. Además, se minimizan las diferencias extrañas que podrían afectar los resultados. Sin embargo, se requiere un tamaño de muestra mayor debido a la variabilidad de las características de los participantes entre los grupos (Bennett, 2005).

#### *1.3.2.2. Diseño cruzado*

El diseño de estudio cruzado, cada participante actúa como su propio control, participando en todas las intervenciones (dos o más), con períodos de lavado ideales que separan cada intervención. (Figura 1.4B) Un período de lavado es un tiempo en el que el participante del estudio no consume ningún producto de tratamiento y es esencial para minimizar los efectos de arrastre entre las intervenciones del estudio (Abumweis *et al.*, 2010; Richard Chin, 2008). Un efecto de arrastre ocurre cuando la respuesta a un tratamiento de un período de intervención anterior afecta la respuesta en el período de intervención posterior (Margetts, 1997; Richard Chin, 2008). La principal ventaja de un diseño cruzado sobre un diseño de brazos paralelos es el mayor poder estadístico logrado al realizar todos los tratamientos en el mismo individuo, lo que elimina la variación entre individuos y reduce el tamaño total de la muestra requerido (Richard Chin, 2008).

#### *1.3.2.3. Diseño factorial*

El diseño factorial es una técnica de investigación que permite evaluar múltiples tratamientos simultáneamente en un solo estudio (Figura 1.4C) En este diseño, se asignan aleatoriamente combinaciones de  $\geq 2$  intervenciones a cada participante, lo que permite evaluar tanto los efectos principales como las interacciones entre los tratamientos (Richard Chin, 2008). El diseño factorial es eficiente porque los tamaños de grupo equilibrados en cada combinación de las intervenciones proporcionan un poder estadístico óptimo para estimar las interacciones y realizar análisis de subgrupos. Un diseño común es el  $2 \times 2$ , que involucra 2 intervenciones en 2 niveles cada una (Richard Chin, 2008). Este diseño es útil cuando las intervenciones se pueden asignar de forma independiente y se desea examinar los efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos.

#### *1.3.2.4. Diseño de conglomerados*

En un diseño de estudio de conglomerados, las intervenciones se asignan al azar a grupos completos en lugar de a individuos. (Figura 1.4D) Este tipo de diseño puede ser una forma eficiente de administrar una intervención en poblaciones con agrupaciones naturales, como hogares, escuelas, aulas o centros comunitarios (Brown *et al.*, 2015). La aleatorización a grupos tiene ventajas en entornos donde sería difícil asignar diferentes tratamientos a participantes que están en el mismo grupo, por ejemplo, diferentes patrones dietéticos para personas que viven juntas en el mismo hogar o que comen en la misma cafetería escolar (Brown *et al.*, 2015). Es importante considerar tanto el número de

## Introducción

conglomerados como el número de individuos dentro de cada uno para maximizar el poder estadístico y facilitar la implementación del estudio (Brown et al., 2015).

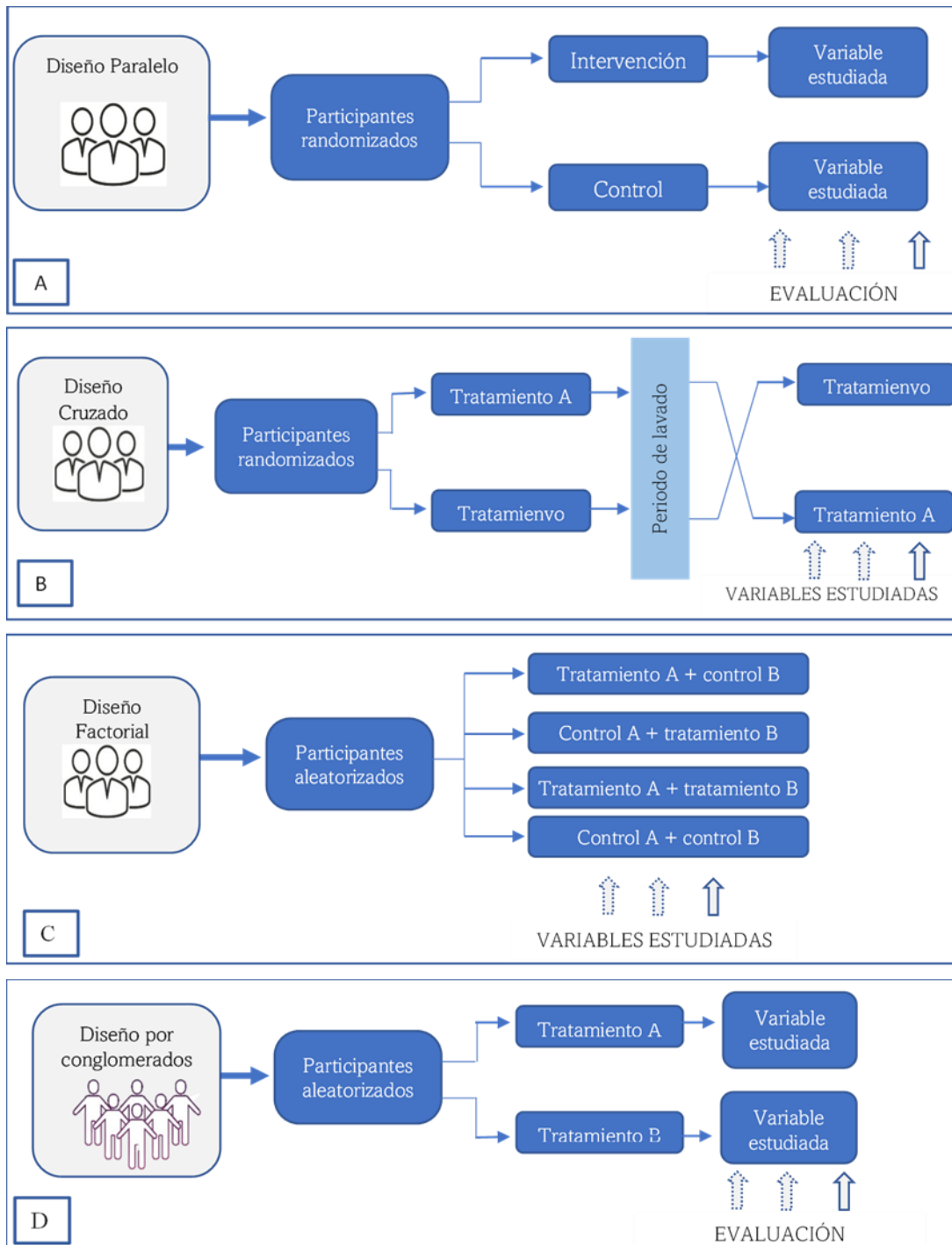


Figura 1.4 Diseños de ensayos clínicos aleatorizados. (A) Diseño paralelo. (B) Diseño cruzado. (C) Diseño factorial. (D) Diseño por conglomerados.



## II. OBJETIVOS

---

---



## 2. OBJETIVOS

### 1. Estudio preclínico en ratas normotensas e hipertensas

- Establecer un modelo animal para estudiar el efecto de la ingestión de aceitunas arbequina sobre la presión arterial de animales normotensos e hipertensos. Para ello, se utilizarán ratas espontáneamente hipertensas (SHR) junto a sus controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY). A estos animales, se les administrará una dosis diaria de 3,85 mg/kg de aceitunas arbequina o la dosis equivalente de agua y se les monitorizará la presión arterial y el peso corporal.
- Estudiar la microbiota intestinal de ratas Wistar-Kyoto (WKY) normotensas y ratas espontáneamente hipertensas (SHR), tanto en los grupos controles como en los suplementados con 3,85 mg/kg de aceitunas arbequina, con la finalidad de establecer la diversidad, la composición bacteriana y el nivel de interacción microbiana.
- Determinar las concentraciones plasmáticas de cuatro biomarcadores asociados a la hipertensión (malondialdehído o MDA, angiotensina II o ANGII, interleucina 6 o IL6 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  o TNF- $\alpha$ ) en ratas WKY y SHR, tratadas o sin tratar.
- Identificar los taxones bacterianos que puedan estar relacionados con la presión arterial, la peroxidación lipídica y la concentración de angiotensina II en plasma tanto en ratas WKY y SHR controles, y evaluar si la suplementación con aceitunas arbequina puede modificarlos

### 2. Estudio clínico en voluntarios sanos

- Realizar una intervención nutricional aleatorizada, abierta, controlada, de diseño cruzado y de dos periodos, para evaluar el efecto del consumo diario de 60 aceitunas arbequina, repartidas en dos dosis de 30 aceitunas antes de las comidas principales, durante 30 días en 40 adultos sanos.
- Estudiar variables antropométricas, hematológicas y bioquímicas en los voluntarios sanos sometidos a la ingestión o no de aceitunas.
- Evaluar marcadores del perfil lipídico y el estado oxidativo de los voluntarios tras el consumo de aceitunas respecto a sus controles.
- Determinar por LC/MS la presencia de compuestos fenólicos y sus metabolitos en orina de los voluntarios estudiados como biomarcadores de ingestión de las aceitunas arbequina y conocer así el grado de adherencia a la intervención.





### III. MATERIAL Y MÉTODOS

---

---





### 3.1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CONSUMO DE ACEITUNAS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATA

#### 3.1.1. Diseño del estudio

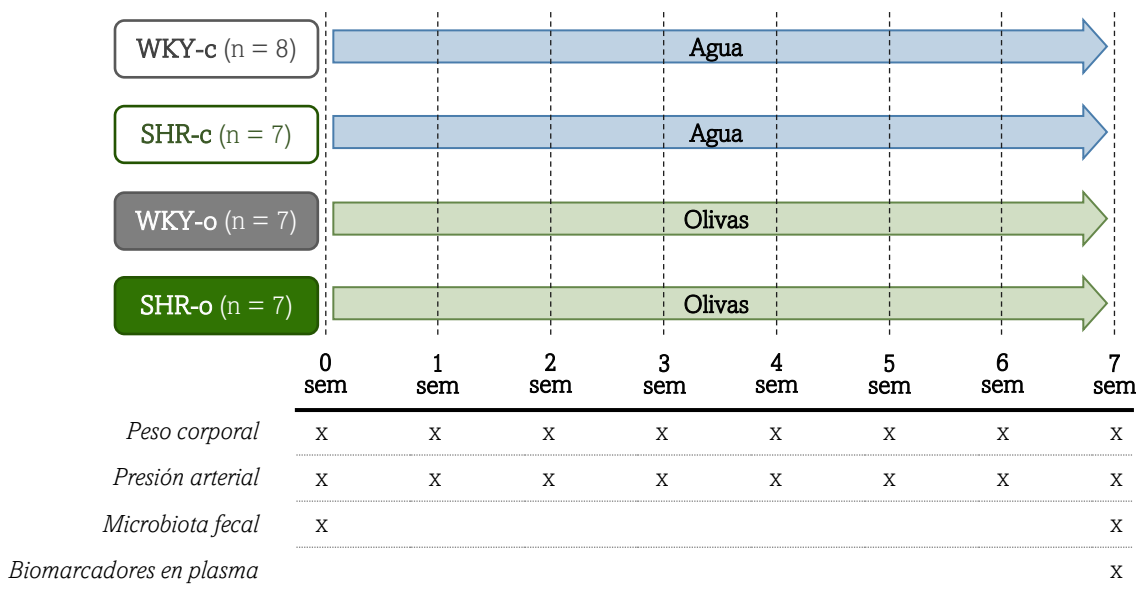
Se estudió el efecto de la administración diaria de aceitunas sobre la microbiota fecal y biomarcadores relacionados con la enfermedad cardiovascular en ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY) y ratas espontáneamente hipertensas (SHR). De acuerdo con los objetivos del estudio, los animales fueron distribuidos en cuatro grupos. Para estudiar las diferencias entre la microbiota fecal de ratas normotensas y ratas hipertensas, así como los biomarcadores asociados a la presión arterial (PA), se emplearon un grupo de ratas Wistar-Kyoto control (WKY-c; n = 8) y un grupo de ratas espontáneamente hipertensas control (SHR-c; n = 7). A estos grupos se les administró agua (10 mL/kg) como tratamiento durante las siete semanas del experimento. Además, para estudiar el efecto de la administración diaria de aceitunas arbequina sobre la microbiota fecal y los biomarcadores relacionados con la PA en ratas normotensas e hipertensas, se emplearon un grupo experimental de ratas WKY (WKY-o, n = 7) y un grupo experimental SHR (SHR-o, n = 7), los cuales recibieron diariamente una suspensión homogénea de la parte comestible de aceitunas a una dosis de 3,85 mg/kg de peso corporal en un volumen de 10 mL/kg.

Los animales iniciaron el experimento a las 14 semanas de edad y durante 7 semanas recibieron la administración correspondiente (agua o aceitunas) por sonda orogástrica (calibre 18 × 76 mm, ref. FTSS-18S-76, Instech Laboratories, Inc, Pensilvania, EE. UU.). La administración oral de agua o aceitunas se realizó diariamente entre las 17:00 y las 18:00 horas para minimizar los efectos del ritmo circadiano.

El peso corporal, el consumo de comida y agua, así como la PA se controlaron semanalmente, mientras que las muestras de heces se recogieron al inicio y al final del estudio (14 y 21 semanas de edad). Las muestras de sangre para las determinaciones bioquímicas se recolectaron al final del experimento, después del sacrificio de los animales (Figura 3.1).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universitat de Barcelona (Ref. 105/17) y por la Generalitat de Catalunya (Ref. 9468), cumpliendo con las Directrices de la Comunidad Europea para el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

## Material y métodos



**Figura 3.1.** Diseño experimental del estudio del efecto de la administración de aceitunas sobre la microbiota fecal y biomarcadores relacionados con la hipertensión en ratas.

### 3.1.2. Animales de experimentación

Las ratas macho normotensas Wistar-Kyoto (WKY) y ratas espontáneamente hipertensas (SHR), se obtuvieron de Envigo Laboratories (Huntingdon, Reino Unido). Los animales se adquirieron a las 11 semanas de edad y se estabularon aleatorizados con dos ratas por jaula. Durante todo el periodo experimental las ratas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), humedad ( $50 \pm 10\%$ ) y un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. Antes de iniciar el estudio, los animales estuvieron en cuarentena por una semana y durante 2 semanas fueron aclimatadas a los procedimientos experimentales. La manipulación de los animales se realizó en el mismo rango horario para minimizar el efecto de los ritmos circadianos. Durante todo el periodo experimental, las ratas se alimentaron con una dieta convencional (2014 Teklad Global 14%, Harlan, Barcelona, España) y agua *ad libitum*.

### 3.1.3. Aceitunas de mesa

Las aceitunas de la variedad arbequina empleadas en el experimento se obtuvieron de la Cooperativa del Camp (Maials, Lleida, España), fueron recolectadas en la campaña 2016-2017 y procesadas mediante fermentación natural en salmuera. El contenido de nutrientes y de compuestos bioactivos de la aceituna arbequina (por 100 g de parte comestible) se muestra en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Contenido de nutrientes y compuestos bioactivos en 100 gramos de la parte comestible de aceitunas de mesa de la variedad arbequina.

	Aceituna de mesa (por 100 g parte comestible)
Energía (kcal)	211 <sup>a</sup>
Proteínas (g)	1,60 <sup>a</sup>
Hidratos de carbono (g)	—
Grasa total (g)	21,00 <sup>a</sup>
Grasa saturada (g)	3,9 <sup>a</sup>
MUFA (ácido oleico) (g)	19,20 <sup>b</sup>
Grasa polinsaturada (g)	—
Fibra total (g)	7,2 <sup>a</sup>
Sodio (g)	1,72 <sup>a</sup>
Vitamina C (nmol)	0,022 <sup>c</sup>
Calcio (mg)	86,42 <sup>c</sup>
Hierro (mg)	0,46 <sup>c</sup>
Magnesio (mg)	37,36 <sup>c</sup>
Manganeso (mg)	0,54 <sup>c</sup>
Potasio (mg)	2017,2 <sup>c</sup>
<b><i>Triterpenos pentacíclicos</i></b>	
Ácido maslínico (mg)	234,10 <sup>d</sup>
Ácido oleanólico (mg)	86,20 <sup>d</sup>
Ácido ursólico (mg)	< LOD <sup>d</sup>
Eritrodiol (mg)	1,04 <sup>d</sup>
Uvaol (mg)	< LOD <sup>d</sup>
<b><i>Polifenoles</i></b>	
Hidroxitirosol (mg)	47,50 <sup>d</sup>
Hidroxitirosol acetato (mg)	2,69 <sup>d</sup>
Tirosol (mg)	2,31 <sup>d</sup>
Salidroside (mg)	1,74 <sup>d</sup>
Catecol (mg)	< LOD <sup>d</sup>
Ácido vanílico (mg)	0,36 <sup>d</sup>
Ácido <i>p</i> -cumárico (mg)	0,57 <sup>d</sup>
Ácido caféico (mg)	0,46 <sup>d</sup>
Verbascósido (mg)	33,40 <sup>d</sup>
Luteolina (mg)	8,96 <sup>d</sup>
Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido (mg)	1,11 <sup>d</sup>
Quercetina (mg)	0,65 <sup>d</sup>
Rutina (mg)	2,60 <sup>d</sup>
Apigenina (mg)	0,45 <sup>d</sup>
Oleuropeina (mg)	1,26 <sup>d</sup>
Pinoresinol (mg)	0,31 <sup>d</sup>

MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; LOD, límite de detección. a, información proporcionada por el productor; b, información de Rocha *et al.* (2020); c, información de Diarte *et al.* (2021); d, información de Franco-Ávila *et al.* (2023).

## Material y métodos

### 3.1.3.1. Dosis administrada

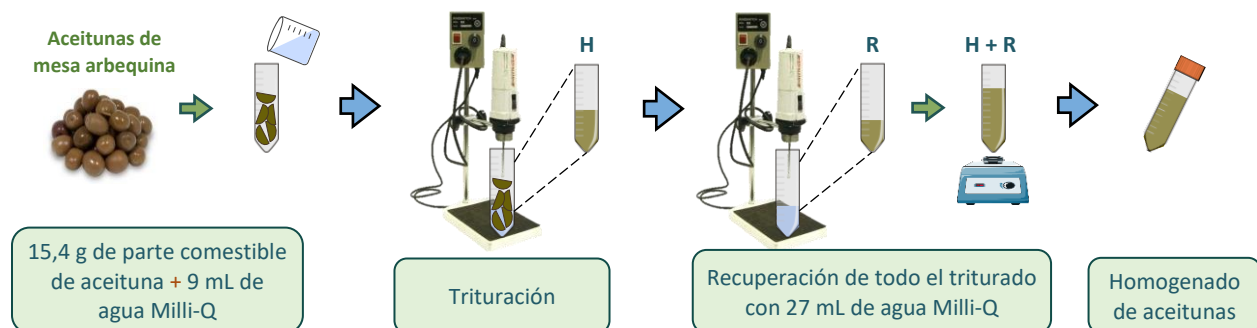
Las aceitunas se administraron en una dosis equivalente al consumo de 30 aceitunas arbequinas por una persona de 60 kg de peso. Considerando el peso medio de la parte comestible de una aceituna arbequina ( $1,24 \pm 0,3$  g), el consumo de 30 aceitunas en humanos corresponde a una dosis de 0,62 g de olivas/kg de peso corporal. La traslación de la dosis en humanos a la dosis administrada a las ratas, se calculó mediante la fórmula basada en el área de superficie corporal propuesta por Reagan-Shaw *et al.* (2008):

$$\text{Dosis equivalente humana (mg/kg)} = \text{Dosis animal (mg/kg)} \times \frac{\text{Animal } K_m}{\text{Humano } K_m}$$

Donde, el factor  $K_m$  para una rata de 150 g es de 6, mientras que el factor  $K_m$  para una persona de 60 kg es 37 (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Con lo cual, la dosis de 3,85 g de olivas/kg de peso corporal de rata corresponde a la ingesta de 30 aceitunas arbequinas en humanos.

### 3.1.3.2. Preparación del homogenado de aceitunas

Para la preparación del homogenado de aceitunas a la dosis de 3,85 g/kg, cada aceituna fue secada con papel de filtro antes de separar la parte comestible del hueso utilizando un bisturí. En un tubo falcon de 50 mL sumergido en hielo, se colocaron 15,4 g de aceituna deshuesada y se agregaron 9 mL de agua Milli-Q. La trituración de las aceitunas se realizó empleando un homogeneizador Polytron® PT 10-35 acoplado al brazo PTA 20 TS (Kinematica AG, Lucerna, Suiza) con el que se aplicaron 6 ciclos de 30 segundos con pausas de 1 minuto y con la configuración de velocidad 5. Para recuperar los residuos de las aceitunas trituradas, se agregaron en un nuevo falcon 9 mL de agua Milli-Q y se activó el homogeneizador durante 30 segundos a la velocidad 5; el líquido obtenido se agregó al homogenado de aceitunas y se mezcló con un vórtex durante 1 minuto. Este procedimiento se repitió 3 veces, con 6 mL de agua Milli-Q (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Preparación del homogenado de aceitunas de mesa arbequina. El tubo H corresponde al falcón donde se han triturado las aceitunas de mesa y el tubo R, al utilizado para la recuperación de todo el triturado.

Finalmente se obtuvo una suspensión fina y uniforme de aceituna con 36 mL de agua Milli-Q, que fue alicuotada y almacenada a -20°C hasta su administración (Figura 3.2.). El homogenado de aceitunas se conservó, protegido de la luz, por un periodo máximo de dos días a 4°C.

### 3.1.4. Medición de la presión arterial

La medición de la presión arterial se realizó mediante un procedimiento no invasivo utilizando un esfigmomanómetro de cola (LE5001 Harvard Apparatus, Panlab, Barcelona, España). Para favorecer la detección de las pulsaciones en la arteria caudal, las ratas se mantuvieron a una temperatura ambiente de 30°C durante 10 minutos previos a la medición, utilizando una esterilla térmica y una lámpara de luz infrarroja según el protocolo descrito por Buñag (1973); la temperatura de la jaula fue monitorizada usando un termómetro digital (termómetro Demestres 305, Barcelona, España). La presión arterial se midió una vez a la semana entre las 08:00 y las 10:00 horas. Para realizar la medición, los animales se colocaron dentro de un cilindro de inmovilización, se mantuvieron conscientes y en reposo. Se colocó el ocluser en la cola del animal y se realizaron tres mediciones repetidas con intervalos de cinco minutos de estabilización entre mediciones. Con todos los valores obtenidos en el día de evaluación se calculó el valor medio de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD).

### 3.1.5. Determinación de biomarcadores en plasma

#### 3.1.5.1. Recolección de las muestras de sangre

Finalizado el periodo experimental, previo ayuno nocturno, las ratas fueron anestesiadas con 90 mg/kg clorhidrato de ketamina (Ketamidol®; Richter Pharma AG, Wels, Austria) y 10 mg/kg clorhidrato de xilacina (Rompun®; Bayer Hispania SL, Barcelona, España). Una vez verificada la ausencia de los reflejos podal y palpebral, se extrajo la sangre por punción cardiaca, que fue depositada en tubos con EDTA-K<sub>2</sub>. El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 3345 xg durante 30 minutos a 4°C (Centrifuge Megafuge 1.0, Heraeus, Alemania) y fue inmediatamente colocado en tubos cónicos de 500 µL, sumergidos en N<sub>2</sub> líquido y almacenados a -80°C, hasta su análisis.

#### 3.1.5.2. Determinación de malondialdehído

El malondialdehído (MDA) es un producto secundario de la peroxidación lipídica y su determinación se puede realizar mediante la reacción con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), en la que se forman aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA que se cuantifican por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría. Para determinar la concentración de MDA en el plasma de ratas se ha empleado el método descrito por Ohkawa *et al.* (1979).

## Material y métodos

---

Se preparó la recta patrón que se elaboró a partir de una solución madre de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 20% (TMP, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suiza) en agua Milli-Q (160  $\mu$ M), mediante diluciones seriadas con agua Milli-Q, obteniéndose distintas concentraciones comprendidas desde 80 hasta 0,625  $\mu$ M.

Inicialmente, se preparó una solución mixta que contenía 1% del antioxidante butilo-hidroxitolueno al 1% (BHT, Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) diluido en ácido acético glacial (Scharlab, Sentmenat, España), 9% de solución de sodio dodecil sulfato al 8,1% (SDS, Bio-Rad, California, EE. UU.) preparada en agua Milli-Q, 45% de ácido acético glacial al 20% diluido en agua Milli-Q a un pH de 3,5 y 45% de ácido tiobarbitúrico al 0,8% (Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) preparado con agua Milli-Q y ácido acético glacial (50% v/v). A continuación, se agregaron 280  $\mu$ L de la solución mixta a 55  $\mu$ L de plasma, se agitó en vórtex a máxima potencia durante 10 segundos y se incubó (Dry-Bath DB-006, Labolan, Navarra, España) durante 1 hora a 95°C. Después de su enfriamiento en hielo, se añadieron 375  $\mu$ L de butanol (Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.), se mezcló en vórtex y se centrifugó (Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific, Alemania) durante 10 minutos a 850  $xg$  y 4°C. La fase butanólica se recuperó y se traspasó a un nuevo tubo cónico. Posteriormente, se colocaron en la placa 300  $\mu$ L de las diluciones de la recta patrón y de la fase butanólica de las muestras (por duplicado) y se leyó la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro Sunrise (Tecan, Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de 532 nm. La concentración de MDA de cada muestra se calculó interpolando el valor de la absorbancia de la muestra en la recta patrón, utilizando el programa GraphPad v 8.0.2.

### *3.1.5.3. Determinación de angiotensina II*

La determinación de la concentración plasmática de angiotensina II se realizó empleando el equipo comercial de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) Rat ANG II (ER163, FineTest, Wuhan, China). La curva estándar utilizada se preparó en las concentraciones de 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 y 2000 pg/mL. Mientras que las muestras de plasma de rata se diluyeron 1:4 con el tampón de dilución proporcionado por la casa comercial. Inicialmente se realizaron dos lavados de la placa de 96 pocillos con 300  $\mu$ L de la solución de lavado incluida en el equipo del ensayo y se agregaron 50  $\mu$ L del estándar y de las muestras diluidas en cada pocillo. A continuación, se agregaron 50  $\mu$ L del anticuerpo marcado con biotina, la placa con las muestras se colocó en el agitador (Titramax 100, Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania) durante 1 minuto a 700 rpm y se incubó durante 45 minutos a 37°C en estufa (Memmert INB 701c, Schwabach, Alemania). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 300  $\mu$ L de la solución de lavado, se añadieron 100  $\mu$ L de conjugado de

estreptavidina-HRP en cada pocillo y se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C. Terminada la incubación se realizaron 5 lavados de la placa, se agregaron 90 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en cada pocillo y se incubó la placa a 37°C. Después de 15 minutos de incubación se detuvo la reacción agregando 50 µL de la solución de parada en cada pocillo y se leyó la placa en el espectrofotómetro Sunrise (Tecan, Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de 450 nm. Para calcular la concentración de angiotensina II de cada muestra se interpoló la diferencia entre la absorbancia de cada pocillo menos la absorbancia del estándar de concentración 0 pg/mL, con la absorbancia de la curva estándar utilizando el programa GraphPad v 8.0.2 y, finalmente, se corrigió la concentración de las muestras aplicando el factor de dilución (x4).

### *3.1.5.4. Determinación de interleucina 6*

La concentración de la citocina proinflamatoria interleucina 6 (IL6) se determinó en plasma de ratas utilizando un ensayo comercial de ELISA para IL6 (SEA079Ra, Cloud-clone Corp, Texas, EE. UU.). Antes de iniciar el ensayo se prepararon diluciones seriadas de la curva estándar a las concentraciones de 0; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 y 500 pg/mL. A continuación, se agregaron 100 µL de las diluciones de la curva estándar y de las muestras de plasma sin diluir en la placa de 96 pocillos. Se dejó en incubación durante 1 hora a 37°C en la estufa (Memmert UN110, Schwabach, Alemania) y al final de este periodo se eliminó el líquido de la placa sin lavar y se añadieron 100 µL del reactivo de detección A. Se realizó una nueva incubación de 1 hora a 37°C, seguida de 3 lavados con 350 µL de la solución de lavado suministrada en el equipo del ensayo. Posteriormente, se agregaron 100 µL del reactivo de detección B y se dejó en incubación durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación se realizaron 5 lavados y a continuación se agregaron 90 µL de TMB en cada pocillo. Se dejó en incubación a 37°C y a los 20 minutos se agregaron 50 µL de la solución de parada en cada pocillo para realizar la lectura de la placa en el espectrofotómetro Sunrise (Tecan, Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de 450 nm. El cálculo de la concentración plasmática de IL6 se realizó mediante la interpolación de la absorbancia de cada muestra en la curva estándar utilizando el programa GraphPad v 8.0.2.

### *3.1.5.5. Determinación del factor de necrosis tumoral alfa*

Para determinar las concentraciones del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en plasma de rata se utilizó un ensayo comercial de ELISA para TNF- $\alpha$  (ER1393, FineTest, Wuhan, China). La curva estándar se preparó en las concentraciones de 0; 3,906; 7,813; 15,625; 31,25; 62,5; 125 y 250 pg/mL. En la placa de 96 pocillos se agregaron 100 µL de las diluciones de la curva estándar y de las muestras de plasma sin diluir y se incubaron durante 90 minutos a 37°C en estufa (Memmert UN110,



## Material y métodos

---

Schwabach, Alemania). Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con 300  $\mu\text{L}$  de solución de lavado, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo marcado con biotina en cada pocillo y se dejó en incubación durante 60 minutos a 37°C. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de la placa, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de conjugado de estreptavidina-HRP y se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de la placa y se colocaron 90  $\mu\text{L}$  de TMB en cada pocillo. Después de 15 minutos en la estufa (Mettler UN110, Schwabach, Alemania) a 37°C se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución de parada e inmediatamente se leyeron las muestras en el espectrofotómetro Sunrise (Tecan, Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de 450 nm. Para calcular las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$ , primero se calculó la diferencia entre la absorbancia de cada pocillo menos la absorbancia del estándar de concentración 0 pg/mL y, a continuación, se interpoló en la curva estándar utilizando el programa GraphPad v 8.0.2.

### 3.1.6. Análisis de la microbiota fecal

#### 3.1.6.1. Recolección de muestras fecales

Las muestras de heces se recogieron a las 14 y 21 semanas de edad. Las heces se recogieron directamente en un tubo cónico estéril, se congelaron inmediatamente en  $\text{N}_2$  líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. La recolección de muestras se realizó por la mañana, en el intervalo entre las 8:00 y 10:00 horas, para limitar la variación debida al ritmo circadiano.

#### 3.1.6.2. Extracción del ADN fecal

El ADN microbiano se extrajo de las muestras de heces utilizando el equipo comercial QIAamp PowerFecal ADN (Mo Bio Laboratories, California, EE. UU.). Por cada muestra de hez, se pesaron 800 mg de zirconia en un tubo cónico de 2 mL y se agregaron 100 mg de muestra. A continuación, se añadieron 750  $\mu\text{L}$  del reactivo PowerBead Solution y 60  $\mu\text{L}$  del reactivo CD1, se realizó una breve agitación con vórtex (a máxima velocidad) y se incubó a 65°C durante 10 minutos (Dry-Bath DB-006, Labolan, Navarra, España). Las muestras incubadas se sometieron a 4 ciclos de disrupción mecánica a 5,5 m/s durante 30 segundos (FastPrep®-24, MP Biomedicals, California, EE. UU.); entre cada ciclo, los tubos se agitaron a 1400 rpm a 20°C durante 5 minutos (ThermoMixer® comfort, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Después de la homogenización, se centrifugó a 1300  $\times g$  durante 1 minuto a 4°C (Centrifuga Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific, Alemania) y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo cónico de 2 mL. Se agregaron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo CD2 para eliminar los inhibidores de PCR (ADN no orgánico, material inorgánico, proteínas, entre otros), se incubó durante 5 minutos a 4°C, se centrifugó (1300  $\times g$  durante 1 minuto

a 4°C) y transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Para recuperar el ADN, se añadieron 200 µL del reactivo CD3, se repitió el proceso de incubación y se centrifugó. Se traspasaron 750 µL del sobrenadante a un nuevo tubo cónico y se agregaron 1200 µL de la primera solución de lavado (EA). A continuación, se cargaron 650 µL a una columna MB Spin, se centrifugó a 1300 *xg* durante 1 minuto a 4°C y se eliminó el residuo. Se repitió el procedimiento 3 veces. Para un segundo lavado, se añadieron 500 µL del reactivo C5 y después de centrifugar durante 1 minuto a 1300 *xg* y 4°C, se pasó la columna MB Spin a un nuevo tubo de recolección. Para finalizar la extracción, se eluyó el ADN de la columna con 100 µL del reactivo C6 seguido de una centrifugación de 1 minuto a 1300 *xg* y 4°C.

### 3.1.6.3. Cuantificación, pureza e integridad del ADN

El análisis de la concentración y la pureza del ADN obtenido en la extracción, se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.). Se colocaron 2 µL de muestra en el pedestal de medición y se realizó la lectura a una longitud de onda de 260 nm, cada muestra fue analizada por triplicado. La cuantificación del ADN se realizó directamente con el programa informático asociado al equipo (Nanodrop 1000 v3.7), cuyo cálculo está basado en la ley de Lambert-Beer y considera que una unidad de absorbancia de ADN de doble cadena a 260 nm equivale a 50 ng/µL (Olson y Morrow, 2012).

La pureza del ADN se analizó evaluando la proporción de absorbancia a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) que permite identificar la contaminación por proteínas (valores óptimos > 1,8), mientras que la proporción de absorbancia a 260 y 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ) se calculó para evaluar la contaminación por diferentes compuestos tales como fenoles, sales o polisacáridos (valores óptimos > 2,0) (Olson y Morrow, 2012; Maghini *et al.*, 2021). La integridad del ADN, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) con solución TAE (Tris, acetato y EDTA) al 0,5% (Invitrogen Ltda., Scotland, UK) y bromuro de etidio 0,005% (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suiza). Las muestras diluidas (1:5) con la solución tampón de carga (BioRad, California, EE. UU.), se depositaron en cada pocillo y se dejaron correr durante 35-45 minutos a 60v. Posteriormente, el gel se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV (TFX-20M, Life Technologies™, GIBCO BRL, California, EE. UU.).

Las muestras se diluyeron a una concentración de 6 ng/µL con agua Milli-Q estéril para su envío al Servicio de Genómica y Bioinformática de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB, Bellaterra, Barcelona, España).

## Material y métodos

---

### 3.1.6.4. Análisis del gen 16S rRNA

Las regiones hipervariables V3 y V4 del gen 16S rRNA bacteriano se amplificaron por PCR utilizando los cebadores específicos PCR1\_Forward (50bp): 5'-TCGTTCGACGTCAGATGTGTAAGACAGCC TACGGNGGCWGCAG-3' y PCR1\_Reverse (55bp): 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTATAAGAC AGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. Las muestras fueron secuenciadas utilizando la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) en el Servicio de Genómica y Bioinformática de la UAB (Bellaterra, Barcelona, España).

### 3.1.6.5. Análisis bioinformático

Para obtener la clasificación taxonómica de cada muestra, las lecturas obtenidas se procesaron con la aplicación BaseSpace 16S Metagenomics y el software MiSeq Reporter v 2.6 proporcionado por la plataforma Illumina MiSeq. Las lecturas sin procesar de extremo pareado se recortaron teniendo en cuenta una puntuación de calidad Phred igual o superior a 30. Las secuencias filtradas se analizaron mediante el algoritmo ClassifyReads, una implementación de alto rendimiento del Ribosomal Database Project (RDP) (Wang *et al.*, 2007). La asignación taxonómica se realizó mediante un análisis de homología de secuencias mediante la herramienta RDP SeqMatch utilizando como referencia la base de datos Greengenes (v. 13.5).

### 3.1.6.6. Diversidad y composición de la microbiota fecal

El estudio de la diversidad alfa se realizó mediante el índice de Chao1, el índice de Shannon y el número de especies. Estos índices se calcularon utilizando la aplicación BaseSpace 16S Metagenomics. El análisis de la diversidad beta a nivel de género se determinó utilizando la métrica de Bray-Curtis, calculada con el programa PAST v 4.05 (Hammer *et al.*, 2001) y se visualizó mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA) realizado con la aplicación 16s Metagenomics.

El análisis de la composición de la microbiota fecal se realizó principalmente en dos niveles taxonómicos, uno alto (filo) y uno bajo (género); además, sólo se incluyeron taxones con un porcentaje de lecturas superior al 0,001%. Debido a la gran variabilidad del número de recuentos totales por muestra, se usó el tamaño de la biblioteca como factor de normalización en cada nivel taxonómico. Para esto, se calculó la abundancia relativa dividiendo la abundancia bruta por el número total de recuentos por muestra (Hawinkel *et al.*, 2019).

### 3.1.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se han expresado como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Se evaluó la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente.

El estudio de las diferencias en el peso, consumo de alimento, ingesta de agua, presión arterial y en las concentraciones plasmáticas de MDA, angiotensina II, IL6 y TNF- $\alpha$ , entre ratas normotensas e hipertensas; así como el efecto de la administración diaria con aceitunas sobre estas variables, se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, seguida de la prueba *post-hoc* de Bonferroni.

El estudio de la microbiota fecal de ratas hipertensas y normotensas se realizó mediante el análisis de medidas de diversidad alfa y beta, de la abundancia diferencial por niveles taxonómicos y de redes de co-ocurrencia de la interacción entre bacterias. El estudio de la microbiota fecal se realizó en dos partes; primero se estudiaron las diferencias entre ratas SHR y WKY a las 14 y 21 semanas de edad, evaluando el efecto de la cepa (WKY y SHR), la edad (14 y 21 semanas) y la interacción cepa x edad sobre la diversidad y la abundancia diferencial. A continuación, se estudió el efecto del consumo de aceitunas sobre la diversidad y abundancia bacteriana en la microbiota de ratas SHR y WKY, considerando como factores la administración de aceitunas y la cepa. En ambos casos, las diferencias en las métricas de diversidad alfa se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, la comparación de la diversidad beta se realizó mediante el análisis de similitudes (ANOSIM) y el análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) y la abundancia diferencial se realizó mediante ANOVA de dos vías. Las comparaciones múltiples de la diversidad alfa y beta se corrigieron con la prueba *post-hoc* de Bonferroni, mientras que en el análisis estadístico de la abundancia relativa se controló la tasa de descubrimientos falsos (FDR < 5%) utilizando el procedimiento Benjamini-Hochberg (Sorbie *et al.*, 2022).

Para estudiar las interacciones entre taxones bacterianos en la microbiota fecal de ratas SHR y WKY, se realizó un análisis de correlación de rangos de Spearman y se construyeron redes de co-ocurrencia incluyendo solo las correlaciones significativas. La interacción entre géneros bacterianos se visualizó mediante un gráfico de co-ocurrencia elaborado con el programa Cytoscape versión 3.9.1. (Shannon *et al.*, 2003) y las métricas de red se obtuvieron con el complemento NetworkAnalyzer (Assenov *et al.*, 2008).

Además, se estudió la relación de diferentes taxones bacterianos con la PAS, PAD y con las concentraciones plasmáticas de MDA y angiotensina II, utilizando la prueba de correlación de rangos de Spearman.

Los análisis estadísticos se consideraron significativos cuando  $p < 0,05$ . En la prueba de correlación, se consideró una correlación positiva con significancia estadística cuando se cumplió que,  $p < 0,05$  y  $\rho > 0,6$ , mientras que se consideró una correlación negativa significativa si  $p < 0,05$  y  $\rho < -0,6$ . El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism v 8.0.2 (La Jolla, California, EE. UU.).

### 3.2. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN HUMANOS

#### 3.2.1. Diseño de la intervención nutricional

Se realizó una intervención nutricional de centro único, aleatorizada, cruzada, abierta y controlada de dos periodos en adultos sanos. Los participantes del estudio fueron asignados de forma aleatoria a una de las dos secuencias de la intervención nutricional. La secuencia 1 (control – arbequina, C/A) realizó en el primer periodo la fase control y en el segundo periodo la fase de intervención con el consumo de aceitunas (fase arbequina); mientras que en la secuencia 2 (arbequina – control, A/C), las fase del estudio se realizaron en el orden inverso. Cada periodo de la intervención tuvo una duración de 30 días, separados por una fase de lavado de 15 días (Figura 3.3). Después de la fase de lavado cada participante realizó la fase complementaria.

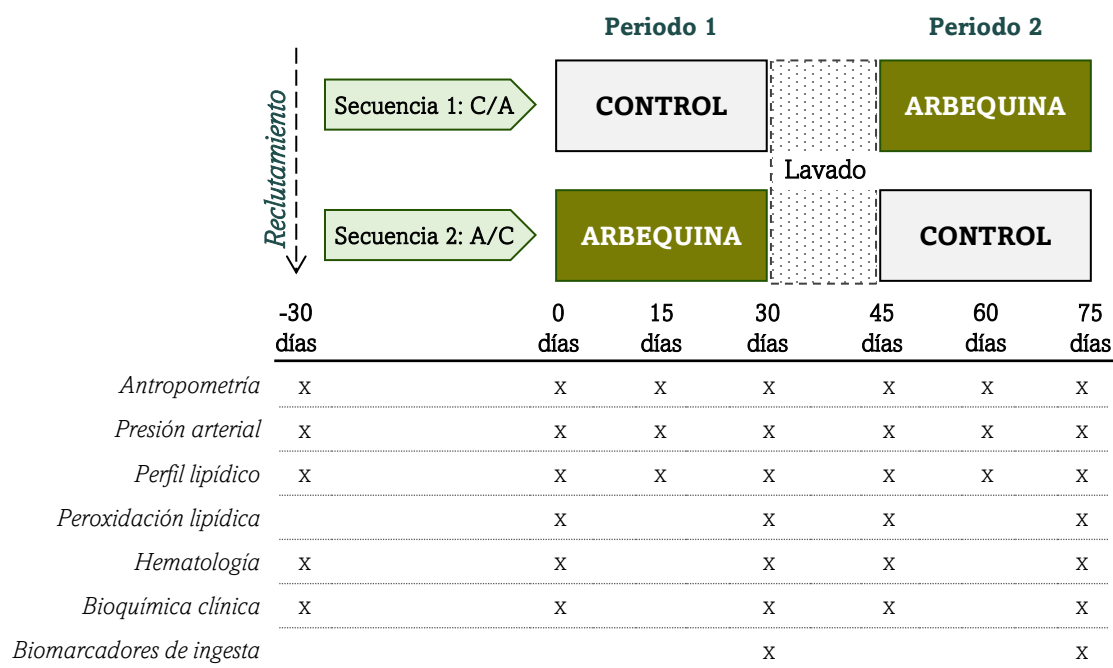


Figura 3.3. Diseño experimental de la intervención nutricional con aceitunas en adultos sanos.

Durante los 30 días de la fase control los participantes consumieron su dieta habitual, restringiendo alimentos ricos en compuestos fenólicos y triterpenos. En la fase arbequina los participantes consumieron 60 aceitunas diarias, distribuidas en dos comidas principales: 30 antes del almuerzo y 30 antes de la cena. Todos los participantes consumieron el producto en casa siguiendo una dieta restrictiva en alimentos ricos en polifenoles y triterpenos pentacíclicos.

La duración de la fase de lavado se estableció mediante un estudio piloto. Se determinó que después de 15 días post-intervención, las concentraciones de polifenoles y triterpenos

pentacíclicos en plasma y orina son similares a las concentraciones pre-intervención. Durante la fase de lavado los participantes consumieron una dieta habitual, con restricción de alimentos ricos en polifenoles y triterpenos pentacíclicos.

El estudio se desarrolló de acuerdo con el protocolo de investigación y siguiendo las normas descritas en la Guía Tripartita Armonizada de la ICH para las Buenas Prácticas Clínicas (CPMP/ICH/135/95, Expert Working Group, 1996), la declaración de Helsinki referente a investigación biomédica en seres humanos (2013), las directrices del Ministerio de Salud Español (Real Decreto 1090/2015) y la Directiva Europea 2001/20/CE. El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Sant Pau (IIBSP-OLI-2016-23) y fue registrado en Clinicaltrials.gov como NCT03886597 con fecha de inicio el 25 de marzo de 2019.

Todos los participantes fueron informados verbal y por escrito sobre la naturaleza del estudio, sus propósitos, procedimientos, duración prevista, los beneficios y potenciales riesgos relacionados con el estudio. Además, se explicó el carácter voluntario de su participación y permanencia. Los participantes incluidos en el estudio dieron su consentimiento por escrito y se les entregó una copia de la declaración escrita firmada.

Se ha preservado la confidencialidad de la información personal de los participantes, según lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, y su reglamento (Real Decreto, 1720/2007). La identidad de los participantes sólo ha sido conocida por el investigador principal, colaboradores y personal técnico del estudio.

### **3.2.2. Participantes del estudio**

Se seleccionaron sujetos sanos de ambos sexos, de 30 a 60 años del panel de voluntarios del Centro de Investigación del Medicamento-Sant Pau (CIM-Sant Pau), que cumplieron con los criterios de elegibilidad.

#### *3.2.2.1. Tamaño de la muestra del estudio*

El número de participantes del estudio se calculó, considerando la concentración plasmática de colesterol total como resultado principal, cuya variabilidad en una población sana es de 21 mg/dL (Yi *et al.*, 2019). Aceptando un riesgo alfa de 0,05 y una potencia estadística de 80% en un contraste bilateral, se estimó un tamaño muestral de 36 sujetos para detectar una diferencia igual o superior a 10 mg/dL de colesterol total. Se incluyeron 4 sujetos adicionales para compensar posibles pérdidas en el seguimiento.

## Material y métodos

---

### *3.2.2.2. Criterios de inclusión de los voluntarios*

Se incluyeron en el estudio a los voluntarios que cumplieron con los siguientes criterios en la visita de selección:

- Sujetos de sexo masculino o femenino, de 30 a 60 años en el momento de la inscripción.
- Índice de masa corporal (IMC) dentro del rango entre 19 y 29,9 kg/m<sup>2</sup>.
- Sujetos sanos según su historia clínica y exploración física, con resultados de laboratorio dentro del rango normal, de acuerdo con los valores de referencia de los Servicios de Bioquímica Clínica y de Hematología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
- Temperatura clínicamente aceptable, frecuencia cardiaca (FC) entre 50-100 latidos por minuto (lpm), presión arterial sistólica (PAS) entre 100-140 mm Hg y presión diastólica (PAD) entre 50-90 mm Hg.
- Aceptación voluntaria para participar en el estudio y firma del consentimiento informado aprobado por la Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Sant Pau (CREC).

### *3.2.2.3. Criterios de exclusión de los voluntarios*

Se excluyeron del estudio a los voluntarios que presentaron cualquiera de las siguientes condiciones:

- Sujetos con antecedentes de dependencia al alcohol o abuso de drogas en el último año, o con un consumo diario de alcohol mayor a 40 g/día para los hombres o mayor a 24 g/día para las mujeres.
- Fumadores con consumo de tabaco, incluyendo parches de nicotina, dentro de los 6 meses previos al inicio del estudio.
- Elevado consumo de bebidas estimulantes (>5 cafés, té, chocolate o bebidas de cola por día) y jugo de uva.
- Antecedentes de alergia o hipersensibilidad a las drogas.
- Consumo de cualquier medicación, suplemento alimenticio, vitaminas, productos naturistas o plantas medicinales dentro de las 2 semanas anteriores a la investigación (excepto el uso breve de paracetamol).
- Sujetos sometidos a cirugía mayor durante los 6 meses anteriores al inicio del estudio, con antecedentes o evidencia clínica de enfermedades cardiovasculares, respiratorias, hepáticas, renales, endocrinas, gastrointestinales, hematológicas, neurológicas u otras enfermedades crónicas.
- Sujetos con serología positiva para hepatitis B, C o VIH.

- Estado de embarazo o lactancia.
- Sujetos que donaron sangre durante las 4 semanas anteriores al inicio de la investigación.
- Sujetos que, en la fase de reclutamiento, tengan una evaluación de electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones con PR  $\geq 220$  milisegundos, QRS  $\geq 120$  milisegundos y QTc  $\geq 440$  milisegundos para los hombres y  $\geq 450$  para las mujeres; bradicardia ( $< 50$  lpm) o cambios menores clínicamente significativos en la onda ST o cualquier otro cambio anormal en el ECG de detección que interfiera con la medición del intervalo QT.
- Sujetos que participaron en otro ensayo clínico durante los 3 meses anteriores al inicio del estudio.

### *3.2.2.4. Criterios de eliminación del estudio*

Debido a que la participación fue voluntaria, los sujetos pudieron abandonar el estudio en cualquier momento. Además, el CIM-Sant Pau se reservó la facultad de retirar a los participantes según los siguientes criterios:

- Se niega a cooperar
- Experimenta efectos adversos lo suficientemente graves que contraindica continuar en el estudio.
- Tiene una condición médica general que contraindica continuar en el estudio
- No completa el estudio como se describe en el protocolo
- No se obtienen algunas de las muestras de plasma requeridas.

### **3.2.3. Asignación de los participantes a cada secuencia del estudio**

Los participantes fueron asignados a cada secuencia: Control – Arbequina (C/A) o Arbequina – Control (A/C), de forma aleatoria y equilibrada (relación de asignación 1:1). Se generó una tabla de aleatorización mediante el programa R, donde cada número de aleatorización correspondió a una secuencia de intervención.

### **3.2.4. Producto de la intervención nutricional**

#### *3.2.4.1. Aceitunas de mesa arbequina*

Las aceitunas de mesa de la variedad arbequina, cosechadas en la campaña 2016 – 2017, fermentadas naturalmente y conservadas en salmuera, fueron proporcionadas por la Cooperativa del Camp (Maials, Lleida, España). La presentación del producto fue en envases de vidrio con un contenido neto de 465 g. y fueron entregados a los participantes al inicio y en el día 15 de la fase arbequina.



## Material y métodos

**Tabla 3.2.** Contenido de nutrientes y compuestos bioactivos en aceitunas de mesa arbequina y en la dosis administrada al grupo de intervención

	Por 100 g de parte comestible	Por dosis diaria (aprox. 60 g)
Energía (kcal)	211 <sup>a</sup>	126,6
Proteínas (g)	1,60 <sup>a</sup>	0,96
Hidratos de carbono (g)	—	—
Grasa total (g)	21,00 <sup>a</sup>	12,6
Grasa saturada (g)	3,9 <sup>a</sup>	2,34
MUFA (ácido oleico) (g)	19,20 <sup>b</sup>	11,52
Grasa polinsaturada (g)	—	—
Grasa trans (g)	—	—
Fibra total (g)	7,2 <sup>a</sup>	4,32
Sodio (g)	1,72 <sup>a</sup>	1,03
Vitamina C (nmol)	0,022 <sup>c</sup>	0,013
Calcio (mg)	86,42 <sup>c</sup>	51,85
Hierro (mg)	0,46 <sup>c</sup>	0,28
Magnesio (mg)	37,36 <sup>c</sup>	22,42
Manganeso (mg)	0,54 <sup>c</sup>	0,32
Potasio (mg)	2017,2 <sup>c</sup>	1210,3
<b><i>Triterpenos pentacíclicos</i></b>		
Ácido maslínico (mg)	234,10 <sup>d</sup>	140,46
Ácido oleanólico (mg)	86,20 <sup>d</sup>	51,72
Ácido ursólico (mg)	< LOD <sup>d</sup>	< LOD
Eritrodiol (mg)	1,04 <sup>d</sup>	0,62
Uvaol (mg)	< LOD <sup>d</sup>	< LOD
<b><i>Polifenoles</i></b>		
		0
Hidroxitirosol (mg)	47,50 <sup>d</sup>	28,50
Hidroxitirosol acetato (mg)	2,69 <sup>d</sup>	1,61
Tirosol (mg)	2,31 <sup>d</sup>	1,39
Salidroside (mg)	1,74 <sup>d</sup>	1,04
Catecol (mg)	< LOD <sup>d</sup>	< LOD
Ácido vanílico (mg)	0,36 <sup>d</sup>	0,21
Ácido <i>p</i> -cumárico (mg)	0,57 <sup>d</sup>	0,34
Ácido caféico (mg)	0,46 <sup>d</sup>	0,28
Verbascósido (mg)	33,40 <sup>d</sup>	20,04
Luteolina (mg)	8,96 <sup>d</sup>	5,38
Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido (mg)	1,11 <sup>d</sup>	0,67
Quercetina (mg)	0,65 <sup>d</sup>	0,39
Rutina (mg)	2,60 <sup>d</sup>	1,56
Apigenina (mg)	0,45 <sup>d</sup>	0,27
Oleuropeina (mg)	1,26 <sup>d</sup>	0,76
Pinoresinol (mg)	0,31 <sup>d</sup>	0,18

MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; LOD, límite de detección. a, información proporcionada por el productor; b, información de Rocha *et al.* (2020); c, información de Diarte *et al.* (2021); d, información de Franco-Ávila *et al.* (2023).

### 3.2.4.2. Dosis administrada

La selección de la dosis de la intervención nutricional consideró que la cantidad de aceitunas administrada tuviese un contenido de nutrientes y compuestos bioactivos suficientes para ejercer algún efecto sobre variables biológicas en adultos sanos, que pudieran ser determinados en plasma y en orina, sin el riesgo de generar toxicidad en los participantes del estudio.

En este sentido, la dosis de 60 aceitunas arbequina tiene un contenido 7 veces superior de compuestos fenólicos a lo aportado por 20 g de aceite de oliva virgen extra (5 mg de hidroxitirosol y otros polifenoles como oleuropeína y tirosol), que, según la declaración de la EFSA, contribuyen a la protección de los lípidos en la sangre contra el estrés oxidativo (EFSA Panel, 2011). Además, en estudios realizados en ratas por nuestro grupo de investigación se observó que la dosis equivalente de 60 aceitunas de la variedad arbequina podía ser cuantificada en muestras de plasma (Kundisova *et al.*, 2020). Adicionalmente, previo al estudio de intervención nutricional se realizó un estudio farmacocinético donde se ensayaron dosis de 60 y 120 aceitunas arbequina en adultos sanos, quienes no reportaron efectos adversos.

### 3.2.5. Visitas de evaluación

Después de las evaluaciones realizadas en la etapa de reclutamiento y de las evaluaciones previas al inicio del estudio para completar y confirmar los datos relacionadas con el seguimiento de los participantes, el estudio comprendió 6 visitas de evaluación en las que se recolectaron los datos que fueron utilizados en el análisis de la intervención nutricional. Todas las evaluaciones se realizaron en el CIM-Sant Pau. Los 40 participantes asistieron el primer día, el día 15 y el día 30 de cada uno de los dos periodos del estudio. En cada visita se evaluó el peso corporal, la presión arterial, la frecuencia cardiaca, la frecuencia respiratoria, se realizó un examen físico y se recolectaron muestras de sangre para la determinación de biomarcadores clínicos. Además, se recolectaron muestras de orina al final de cada periodo del estudio (Figura 3.3).

#### 3.2.5.1. Recolección de muestras de sangre

Los participantes asistieron al CIM-Sant Pau tras 10 horas de ayuno. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos S-Monovette EDTA K<sub>2</sub>, se centrifugaron durante 10 minutos a 1900 xg a 4°C y el plasma obtenido se distribuyó en alícuotas de 1 mL en crioviales PK de 2 mL que fueron almacenadas a -80°C hasta el momento del análisis correspondiente. La recolección de muestras se realizó al inicio, a los 15 días y al final de los 2 periodos del estudio.

## Material y métodos

---

### 3.2.5.2. Recolección de muestras de orina

Se indicó a los participantes del estudio que recogieran la orina de las 12 horas previas a la visita de evaluación en el CIM-Sant Pau. Las muestras de orina fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1900  $\times g$  a 4°C. El sobrenadante obtenido se distribuyó en alícuotas de 5 mL que fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su análisis.

### 3.2.6. Variables biológicas estudiadas

Las mediciones se realizaron en el CIM-Sant Pau. El peso corporal y la presión arterial se registraron en al inicio, a los 15 días y al final de cada periodo del estudio.

El estudio del perfil lipídico incluyó la determinación de las concentraciones de triglicéridos (TG), colesterol sérico total (CT), colesterol HDL (HDL-c), colesterol LDL (LDL-c) y colesterol VLDL (VLDL-c). Además, se estudió la glucosa en sangre, se controlaron las concentraciones de sodio, ácido úrico, urea y creatinina en sangre, como biomarcadores de la función renal; mientras que las concentraciones de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina y las proteínas totales en sangre, se utilizaron para controlar la función hepática. Las determinaciones de estas variables fueron realizadas por el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Adicionalmente, se controlaron las variables hematológicas mediante un hemograma completo el cual se realizó en el Servicio de Hematología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

La cuantificación de la peroxidación lipídica se realizó en el Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación (Universitat de Barcelona - UB). La determinación de MDA en plasma se realizó con base en la producción de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) con el método descrito por Ohkawa *et al.* (1979), explicadas previamente en el apartado 3.1.5.2.

### 3.2.7. Adherencia a la intervención

Para determinar si los participantes cumplieron con el consumo diario de 60 aceitunas arbequina se analizaron las concentraciones de polifenoles en orina, como marcadores de ingesta. La cuantificación de estos compuestos se realizó al final de la fase control y al final de la fase arbequina mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). El procesamiento de las muestras se realizó en Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación - UB y la cuantificación se realizó utilizando los equipos del Servicio de Técnicas Separativas en los Centros Científicos y Tecnológicos de la UB (CCiTUB).

Para la determinación de polifenoles en muestras de orina se utilizaron las enzimas glucoronidasa y sulfatasa para cuantificar por separado el compuesto padre de sus respectivos metabolitos.

Las muestras de orina se filtraron y distribuyeron en 2 alícuotas de 90  $\mu$ L, una para la muestra control y la segunda para la muestra con enzima. En ambas, se agregaron 10  $\mu$ L de patrón interno de polifenoles (2,3-dihidroxifenil etanol; 20  $\mu$ M) y se colocaron en baño maría a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, a la muestra control se le añadió 90  $\mu$ L de NaCl al 0,2% a 4°C y 90  $\mu$ L de glucoronidasa 5000U a las muestras de enzimas; se colocaron en baño maría con agitación intensa a 37°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción enfriando las muestras en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 14800 rpm durante 30 minutos a 2°C, se recogió el sobrenadante y se colocó en viales ámbar con insert para HPLC – MS. Para las muestras preparadas con sulfatasa, se reemplazó la glucoronidasa por sulfatasa 100U y el tiempo de incubación en baño maría a 37°C y agitación intensa fue de 180 minutos.

La determinación de polifenoles se realizó con un cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, EE. UU) acoplado a un espectrómetro de masas QTRAP 4000 (AB Sciex, Toronto, Canadá) equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI). Se empleó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m; Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) que operaba a 30°C. Como fase móvil se utilizó agua Milli-Q con ácido acético al 0,025 % (A), y acetonitrilo con acetona al 5 % (B) a un flujo de 0,8 mL/minuto. La separación de polifenoles se realizó con el siguiente gradiente de elución para la fase orgánica: 0 min, 5% B; 1 min, 10% B; 10 min 65% B; 10,5 min, 100% B; 15,5 min, 100% B; finalmente 6 minutos en condiciones iniciales (5% B), para evitar el efecto de arrastre. La detección de polifenoles se realizó en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) con polaridad negativa y con las siguientes condiciones: temperatura de la fuente a 700°C; gas de cortina (N<sub>2</sub>) a 25 unidades arbitrarias (au); gas de ionización 1 (GS1, gas de calefacción, N<sub>2</sub>), 75 au; gas de ionización 2 (GS2, gas de secado, N<sub>2</sub>), 50 au y voltaje de pulverización de ionización a – 3500 V. El volumen de inyección de la muestra fue de 10  $\mu$ L en modo *partial loop*.

### 3.2.8. Análisis estadístico

Todos los participantes aleatorizados inicialmente (n = 40) finalizaron el estudio y completaron las 6 evaluaciones; por lo cual, todos los datos disponibles se incluyeron en el análisis. Los análisis estadísticos se realizaron con los programas SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.) y GraphPad Prism v 8.0.2 (La Jolla, California, EE. UU.).

## Material y métodos

---

Las características demográficas, los variables clínicas y bioquímicas evaluados al inicio del estudio se presentan por secuencia de aleatorización y de forma global. Las variables categóricas se muestran como n (%), que corresponde al porcentaje del número de participantes; las variables continuas con distribución normal se resumieron como media  $\pm$  error estándar (SEM), mientras que las variables con distribución diferente a la normal se presentaron como mediana y el rango entre los percentiles 25 y 75 [p25 – p75]. No se realizaron pruebas estadísticas para establecer diferencias entre los grupos al inicio del estudio, ya que se asumió que cualquier diferencia existente, fue producto de la aleatorización y no de algún sesgo sistemático (Dwan *et al.*, 2019).

Se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y los gráficos de probabilidad normal (Q-Q) utilizando un análisis univariado (PROC UNIVARIATE). El resultado del análisis de variables con distribución normal se informó como media  $\pm$  SEM, mientras que las variables con una distribución diferente a la normal se transformaron logarítmicamente (Log2) antes del análisis y los resultados se expresaron como media geométrica con (IC95%).

Para evaluar las diferencias medias y el cambio entre la medición inicial, a los 15 y 30 días en las variables estudiados, se utilizó un ANOVA de medidas repetidas para cada fase y periodo, seguida de la prueba *post-hoc* de Bonferroni.

El efecto del consumo de aceitunas durante 30 días sobre las variables del estudio se analizó utilizando un modelo lineal de efectos mixtos (PROC MIXED), considerando a los participantes como efecto aleatorio, mientras que los variables estudiadas, el tratamiento, el periodo, la secuencia de aleatorización y el sexo se incluyeron como efectos fijos. Además, se analizó la interacción tratamiento x sexo para evaluar si el tratamiento presenta un efecto diferente asociado al sexo. Para comprobar el efecto de arrastre se analizó por separado la interacción entre periodo y tratamiento. El método de estimación utilizado en el modelo fue el de máxima verosimilitud residual (REML), la selección de las estructuras de covarianza del modelo se basó en la optimización de las estadísticas de ajuste, utilizando los criterios de información de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC). La significancia estadística se ha definido como un *p* valor menor a 0,05 para un contraste bilateral.



## IV. RESULTADOS

---

---



#### 4.1. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN RATAS CONTROLES NORMOTENSAS E HIPERTENSAS

Para estudiar el efecto de la ingesta de aceitunas sobre la microbiota fecal, se realizó un estudio previo en ratas controles normotensas Wistar-Kyoto (WKY-c) y controles espontáneamente hipertensas (SHR-c) en las que se sustituyó la administración del homogenado de aceitunas por agua (10 mL/kg de peso corporal del animal). En estos grupos de ratas se estudiaron la presión arterial (PA), cuatro biomarcadores relacionados con la PA y la composición de la microbiota fecal.

##### 4.1.1. Peso corporal, consumo de pienso y de agua en ratas controles normotensas e hipertensas

La comparación del peso corporal entre WKY-c y SHR-c no mostró diferencias significativas durante las siete semanas que duró el experimento (Tabla 4.1). Sin embargo, se observó una mayor ganancia de peso, aunque no significativa ( $p = 0,078$ ) en ratas WKY-c ( $78 \pm 9$  g) respecto a lo registrado para las ratas SHR-c ( $54 \pm 6$  g).

Por otro lado, el consumo de pienso fue similar en ambos grupos y se mantuvo constante durante todo el periodo del estudio (Tabla 4.1). Las ratas WKY-c tuvieron un consumo medio de  $18,1 \pm 0,3$  g de pienso al día, mientras que los animales del grupo SHR-c consumieron una media de  $17,6 \pm 0,2$  g de pienso al día.

Respecto la ingesta de agua, se encontró que las ratas del grupo WKY-c tuvieron un consumo constante a lo largo del estudio, con una ingesta media de  $21,4 \pm 0,6$  mL de agua al día. En el caso de SHR-c, la ingesta de agua a las 14 semanas de edad fue  $36,8 \pm 2,3$  mL/día. Este consumo fue un 17,6% superior a la ingesta de agua de las 21 semanas de edad ( $30,3 \pm 1,6$  mL/día). Es decir, el consumo diario de agua disminuyó con la edad. Estos resultados indicaron que la ingesta de agua de las ratas SHR-c fue significativamente superior, al observado en ratas WKY-c (Tabla 4.1).

##### 4.1.2. Presión arterial de ratas controles normotensas e hipertensas

Durante las siete semanas de duración del experimento, se tomaron mediciones de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) semanalmente. En las ratas WKY-c, ambas medidas de presión arterial permanecieron estables a lo largo del estudio. Por otro lado, en las ratas SHR-c se determinó un incremento aproximado de 19 mmHg ( $p > 0,05$ ) en la PAS desde el inicio hasta el final del estudio, mientras que la medida de la PAD permaneció estable (Tabla 4.1). La comparación de la presión arterial entre ambos grupos, mostró que al inicio del experimento la PAS en las ratas SHR-c fue un 42% mayor que la registrada en las ratas WKY-c, mientras que la PAD fue un 71% superior para las



## Resultados

ratas SHR-c con respecto a las WKY-c. Resultados similares se encontraron al final del estudio, con una PAS y una PAD, un 50% y un 62% mayor respectivamente, en las ratas SHR-c en comparación con las mediciones en las ratas WKY-c (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Diferencias en el peso corporal, consumo de pienso, ingesta de agua y presión arterial entre las ratas WKY control y SHR control a las 14 y 21 semanas de edad.

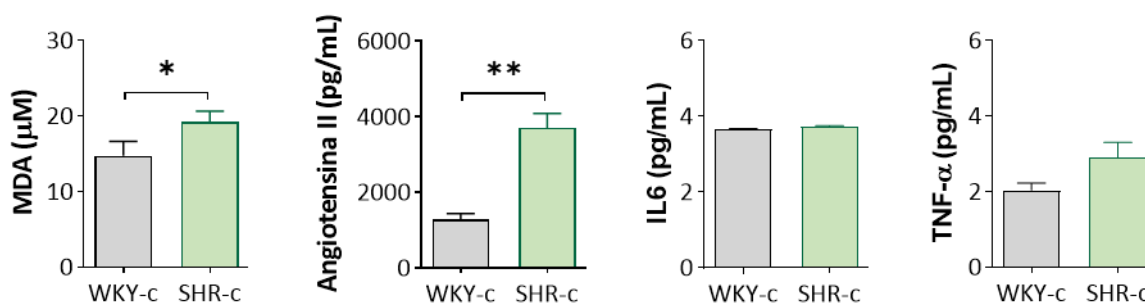
	WKY-c	SHR-c
<b>Peso corporal (g)</b>		
14 semanas de edad	270 ± 7 <sup>a</sup>	269 ± 4 <sup>a</sup>
21 semanas de edad	347 ± 10 <sup>a</sup>	325 ± 4 <sup>a</sup>
<b>Consumo de pienso (g/día)</b>		
14 semanas de edad	18,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	17,9 ± 0,2 <sup>a</sup>
21 semanas de edad	18,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	17,4 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>Ingesta de agua (mL/día)</b>		
14 semanas de edad	21,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	36,8 ± 2,3 <sup>b</sup>
21 semanas de edad	21,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	30,3 ± 1,6 <sup>b</sup>
<b>PAS (mmHg)</b>		
14 semanas de edad	147 ± 3 <sup>a</sup>	209 ± 3 <sup>b</sup>
21 semanas de edad	152 ± 2 <sup>a</sup>	228 ± 4 <sup>b</sup>
<b>PAD (mmHg)</b>		
14 semanas de edad	98 ± 3 <sup>a</sup>	168 ± 4 <sup>b</sup>
21 semanas de edad	109 ± 4 <sup>a</sup>	177 ± 5 <sup>b</sup>

Resultados expresados como media ± SEM en ratas Wistar-Kyoto del grupo control (WKY-c, n = 8) y ratas espontáneamente hipertensas del grupo control (SHR-c, n = 7). PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. Los valores con letras distintas indican diferencias entre grupos ( $p < 0,05$ ).

### 4.1.3. Biomarcadores plasmáticos en ratas controles normotensas e hipertensas

El estudio de biomarcadores asociados con la presión arterial incluyó el análisis de la peroxidación lipídica mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA), la determinación de angiotensina II, así como las citocinas proinflamatorias interleucina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Las determinaciones se realizaron en el plasma de las ratas obtenido al final del experimento (21 semanas de edad).

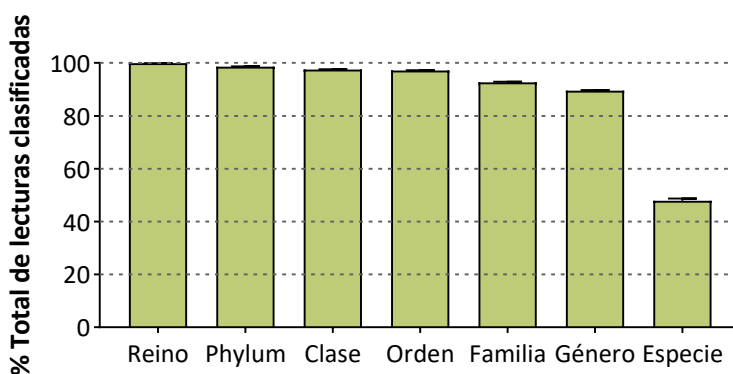
La concentración plasmática de MDA fue un 24% más elevada ( $p < 0,05$ ) en las ratas SHR-c ( $19,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ) que la observada en ratas WKY-c ( $14,7 \pm 1,9 \mu\text{M}$ ). Por otro lado, la concentración plasmática de angiotensina II fue dos veces mayor en SHR-c ( $3705 \pm 381 \text{ pg/mL}$ ) en comparación a las WKY-c ( $1277 \pm 156 \text{ pg/mL}$ ) ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la determinación de IL6 y TNF- $\alpha$  en plasma, los resultados no mostraron diferencias entre las diferentes cepas de rata (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Concentraciones plasmáticas de malondialdehído (MDA), angiotensina II, interleucina 6 (IL6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en ratas WKY-c y SHR-c de 21 semanas de edad. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  indican diferencias entre grupos.

#### 4.1.4. Microbiota fecal de ratas controles normotensas e hipertensas

La concentración media de ADN extraído de las muestras de heces fue de  $230,1 \pm 5,5$  ng/ $\mu$ L. Los parámetros utilizados para evaluar la pureza de ADN no evidenciaron contaminación por proteínas ( $A_{260}/A_{280} = 1,9 \pm 0,01$ ) ni por fenoles, sales o polisacáridos ( $A_{260}/A_{230} = 2,3 \pm 0,02$ ). Como resultado de la secuenciación por Illumina MiSeq se obtuvo una media de  $158\ 006 \pm 9804$  lecturas que pasaron el filtro de calidad (Phread > 30). Del total de lecturas, el  $99,9 \pm 0,001\%$  se alinearon a nivel de reino;  $98,6 \pm 0,05\%$  a nivel de filo;  $97,5 \pm 0,12\%$  a nivel de clase;  $97,2 \pm 0,12\%$  a nivel de orden;  $92,7 \pm 0,24\%$  a nivel de familia;  $90,0 \pm 0,27\%$  a nivel de género y  $48,0 \pm 0,87\%$  a nivel de especie (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Lecturas alineadas a cada nivel taxonómico. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM del porcentaje total de lecturas.

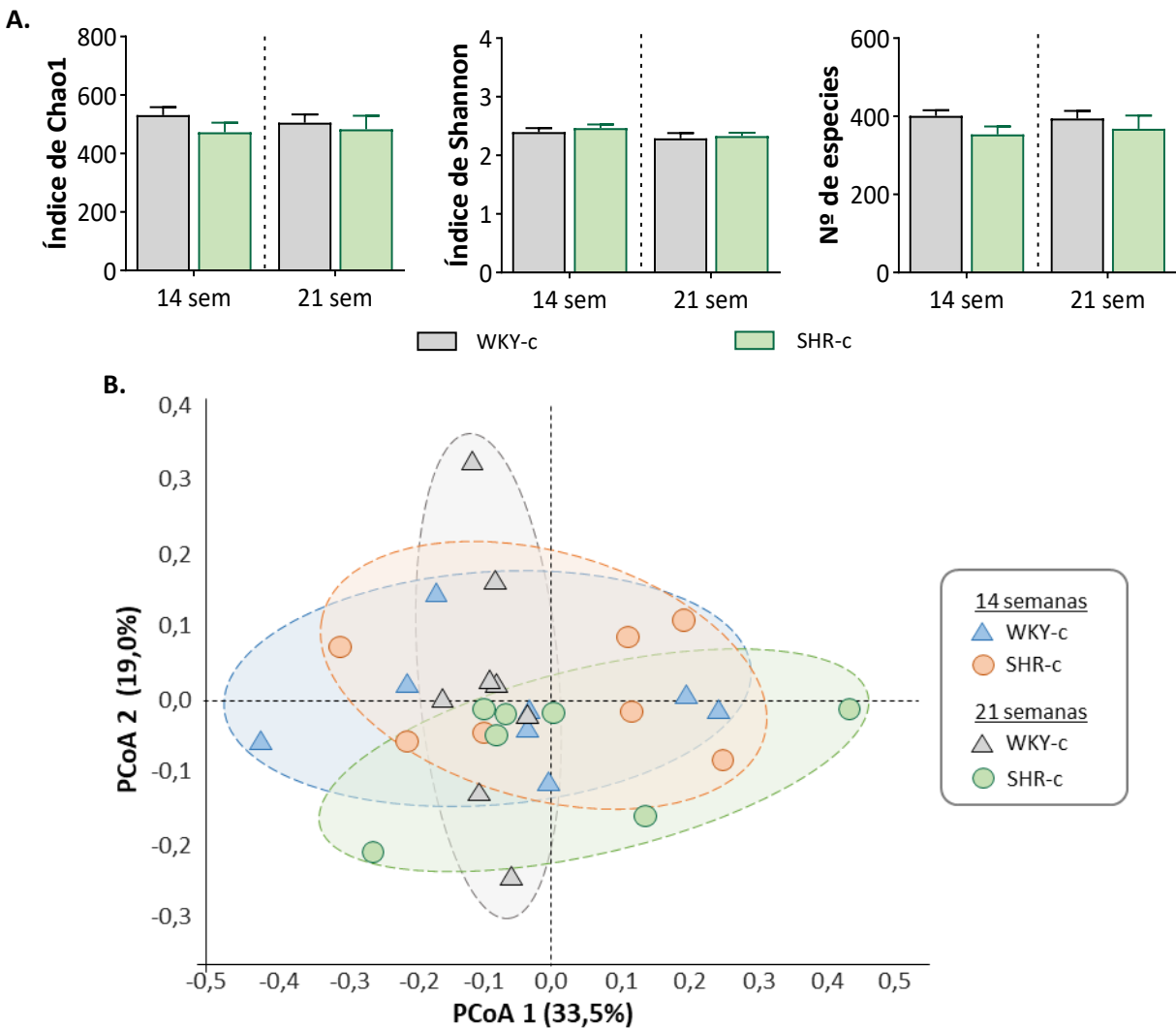
##### 4.1.4.1. Diversidad alfa y beta

Se estudió la diversidad alfa a partir del índice de riqueza de Chao1, el índice de diversidad de Shannon y el número total de especies. El análisis se realizó mediante un ANOVA de dos vías con prueba *post-hoc* de Bonferroni, considerando que la diversidad alfa podría verse afectada por dos factores: el efecto de la cepa (normotensa o hipertensa) y el efecto de la edad (14 o 21 semanas), o por la interacción de

## Resultados

ambos factores (cepa \* edad). Los resultados indicaron que la diversidad alfa fue similar entre WKY-c y SHR-c a las 14 y 21 semanas de edad ( $p > 0,05$ ), sin efecto de la edad ni de la interacción (Figura 4.3A).

El estudio de la diversidad beta se basó en la matriz de distancias de Bray-Curtis a nivel de género. El análisis permutacional multivariado de la varianza (PERMANOVA:  $F = 1,41$ ;  $p = 0,139$ ) y el análisis de similitudes (ANOSIM:  $R = 0,07$ ;  $p = 0,129$ ) de la matriz de distancias, no mostraron diferencias entre la composición de la comunidad bacteriana de WKY-c y SHR-c a las 14 y 21 semanas de edad. El ordenamiento de la distancia de Bray-Curtis entre los grupos se graficó mediante el análisis de coordenadas principales y se muestra en la Figura 4.3B.



**Figura 4.3.** Diversidad alfa (A) a las 14 y 21 semanas de edad expresada como la media  $\pm$  SEM de los índices de Chao1, Shannon y el número de especies de la microbiota fecal de ratas WKY-c ( $n = 8$ ) y ratas espontáneamente SHR -c ( $n = 7$ ). Diversidad beta (B) en ratas WKY-c y SHR-c a las 14 y 21 semanas de edad se muestra mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA).

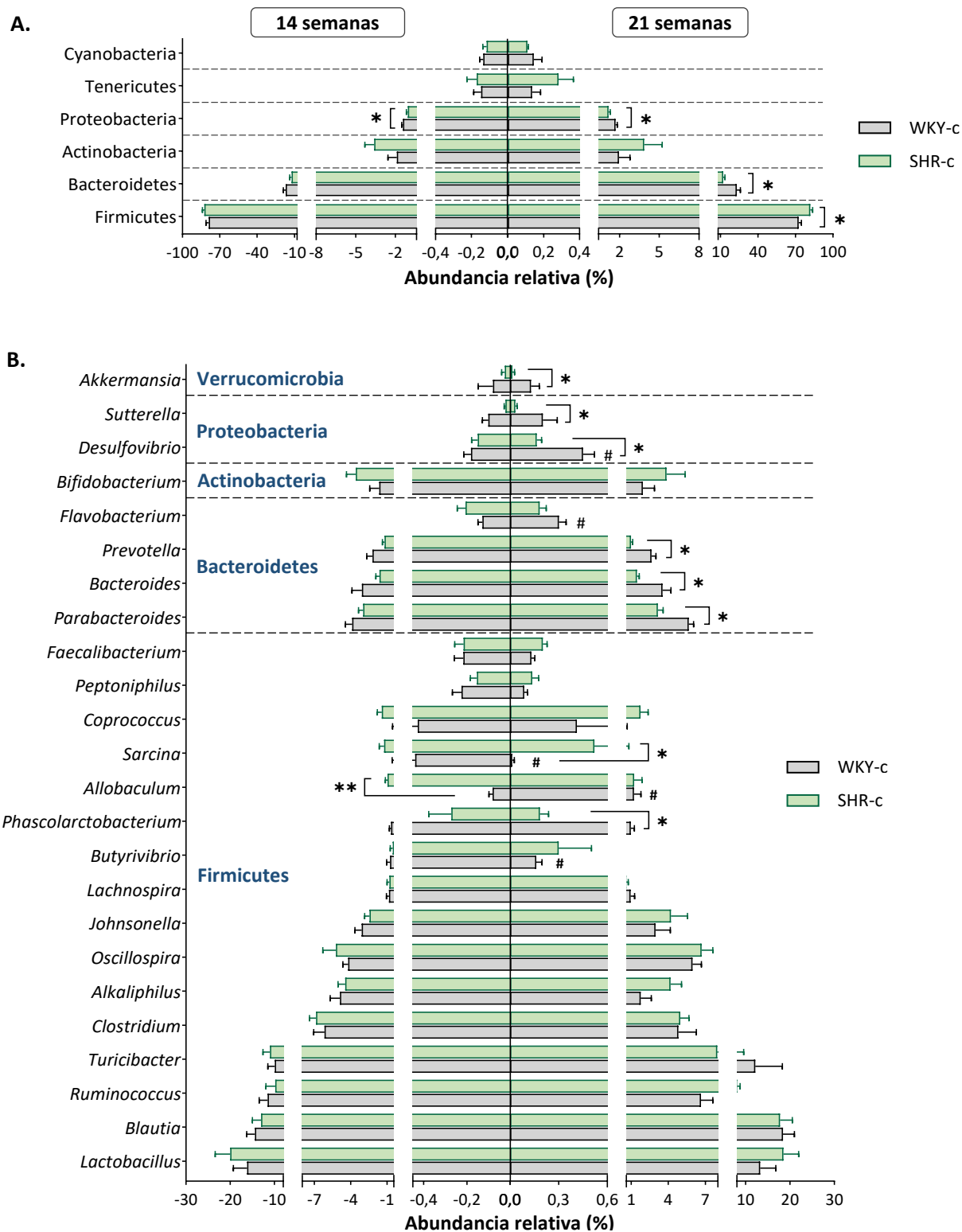
#### 4.1.4.2. Composición de la microbiota fecal de ratas controles normotensas e hipertensas

La composición de la microbiota fecal se evaluó a partir de la abundancia relativa de cada nivel taxonómico. Se seleccionó un nivel taxonómico alto (filo) y uno bajo (género) para estudiar las diferencias en la composición de la microbiota fecal entre ratas normotensas e hipertensas.

A nivel de filo, tanto en las ratas WKY-c como en las SHR-c de 14 semanas de edad, se observó un predominio de Firmicutes (WKY-c: 78,9%; SHR-c: 82,5%), seguido de Bacteroidetes (WKY-c: 17,1%; SHR-c: 12,3%), Actinobacteria (WKY-c: 1,89%; SHR-c: 3,60%) y Proteobacteria (WKY-c: 1,42%; SHR-c: 1,05%), representando el resto de filos menos del 1% del total de bacterias fecales. No se encontraron diferencias significativas entre WKY-c y SHR-c, excepto en Proteobacterias, las cuales fueron más abundantes en WKY-c ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.4A). A las 14 semanas de edad, la composición a nivel de género fue similar entre WKY-c y SHR-c, destacando *Lactobacillus* (WKY-c: 16,3%; SHR-c: 19,9%), *Blautia* (WKY-c: 14,4%; SHR-c: 13,0%), *Ruminococcus* (WKY-c: 11,5%; SHR-c: 9,8%) y *Turicibacter* (WKY-c: 9,9%; SHR-c: 11,0%). Sin embargo, se hallaron diferencias significativas en el género *Allobaculum*, observándose una mayor abundancia en el grupo SHR-c respecto a WKY-c ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.4B).

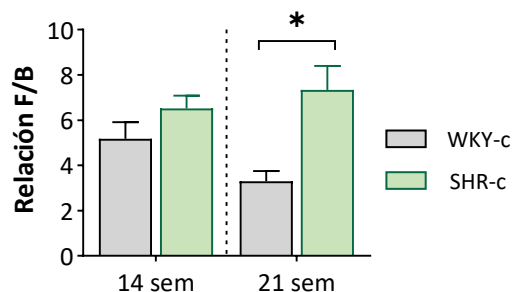
A las 21 semanas de edad, los filos mayoritarios mostraron un patrón similar al identificado a las 14 semanas. A las 21 semanas de edad, la comparación entre WKY-c y SHR-c reveló una mayor abundancia de Firmicutes en SHR-c (WKY-c: 72,5%; SHR-c: 82,0%  $p = 0,014$ ) y una mayor abundancia de Bacteroidetes en ratas WKY-c (WKY-c: 23,1%; SHR-c: 12,2%  $p = 0,003$ ). La diferencia encontrada en el filo Proteobacterias se mantuvo a las 21 semanas de edad ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.4A). A nivel de género, los taxones más abundantes a las 21 semanas de edad fueron *Blautia* (WKY-c: 18,4%; SHR-c: 17,8%), *Lactobacillus* (WKY-c: 13,3%; SHR-c: 18,5%), *Turicibacter* (WKY-c: 12,2%; SHR-c: 8,0%) y *Ruminococcus* (WKY-c: 6,7%; SHR-c: 8,1%). La comparación entre grupos permitió determinar una mayor abundancia de *Phascolarctobacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Desulfovibrio*, *Sutterella* y *Akkermansia*; así como una menor abundancia de *Sarcina* en WKY-c en comparación con lo encontrado en SHR-c ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.4B).

En el estudio de la microbiota fecal de WKY-c y SHR-c también se analizó el efecto de la edad sobre la abundancia relativa bacteriana de cada grupo. Los resultados no indicaron cambios relacionados con la edad a nivel de filo (Figura 4.4A). Sin embargo, las ratas WKY-c de 21 semanas de edad presentaron un incremento de los géneros *Phascolarctobacterium*, *Allobaculum*, *Flavobacterium* y *Desulfovibrio*, así como una reducción de *Butyrivibrio* y *Sarcina* respecto a lo obtenido a las 14 semanas de edad ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.4B).



**Figura 4.4.** Abundancia relativa a nivel de filo (A) y género (B) en ratas WKY-c (n = 8) y SHR-c (n = 7) a las 14 y 21 semanas de edad. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  con FDR < 5% indican diferencias WKY-c y SHR-c de la misma edad; mientras que, # $p < 0,05$  con FDR < 5% indica las diferencias relacionadas a la edad dentro de la misma cepa de ratas.

Por otro lado, el análisis de la relación entre Firmicutes y Bacteroidetes (F/B) no mostró diferencias entre WKY-c y SHR-c a las 14 semanas de edad. Sin embargo, a las 21 semanas de edad la relación F/B en SHR-c fue aproximadamente el doble de la determinada en WKY-c ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Relación entre Firmicutes y Bacteroidetes (F/B) en ratas WKY-c y SHR-c a las 14 y 21 semanas de edad. Resultados expresados como la media  $\pm$  SEM de la relación F/B en WKY-c ( $n = 8$ ) y SHR-c ( $n = 7$ ). \* $p < 0,05$  con FDR  $< 5\%$ .

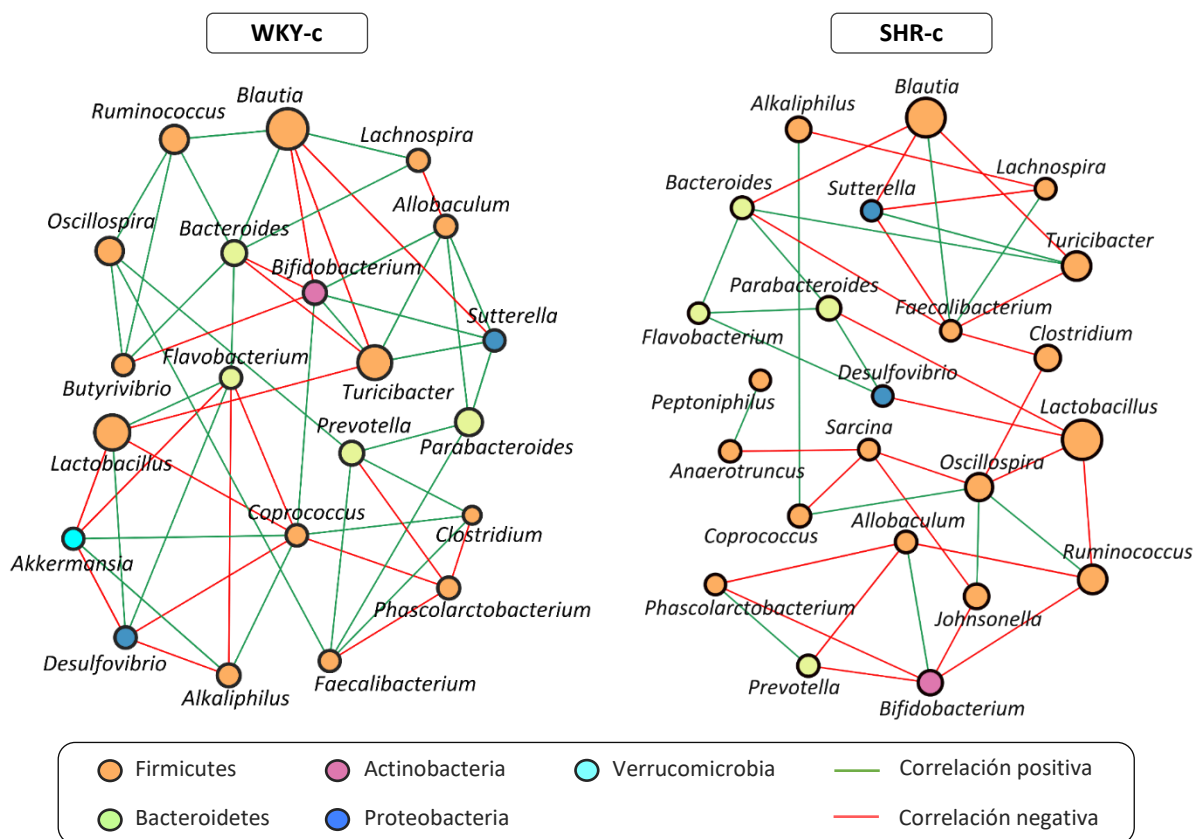
#### 4.1.4.3. Interacciones bacterianas en la microbiota fecal de ratas control normotensas e hipertensas

Las interacciones entre los géneros bacterianos de la microbiota fecal en cada grupo fueron estudiadas mediante un análisis de correlación de rangos de Spearman a partir del cual se elaboraron redes de co-ocurrencia, donde fueron consideradas solo las correlaciones significativas. Las correlaciones positivas ( $\rho > 0,6$  y  $p < 0,05$ ) indican posibles relaciones de cooperación o interdependencia, mientras que las negativas ( $\rho < -0,6$  y  $p < 0,05$ ) sugieren una relación competitiva entre bacterias. La red microbiana del grupo WKY-c estuvo conformada por 21 géneros (nodos) y 53 interacciones (aristas), mientras que la red del grupo SHR-c incluyó 23 géneros y 41 interacciones (Figura 4.6). Las métricas de red mostraron un mayor grado de conectividad y una red más densa en el grupo WKY-c que la obtenida para el grupo SHR-c (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Métricas de las redes de co-ocurrencia de WKY-c y SHR-c.

	WKY-c	SHR-c
<b>Número de nodos</b>	21	23
<b>Número de aristas</b>	53	41
Correlación positiva	33	16
Correlación negativa	20	25
<b>Grado de conectividad</b>	5,05	3,56
<b>Coficiente de agrupamiento</b>	0,27	0,22
<b>Densidad de la red</b>	0,126	0,081

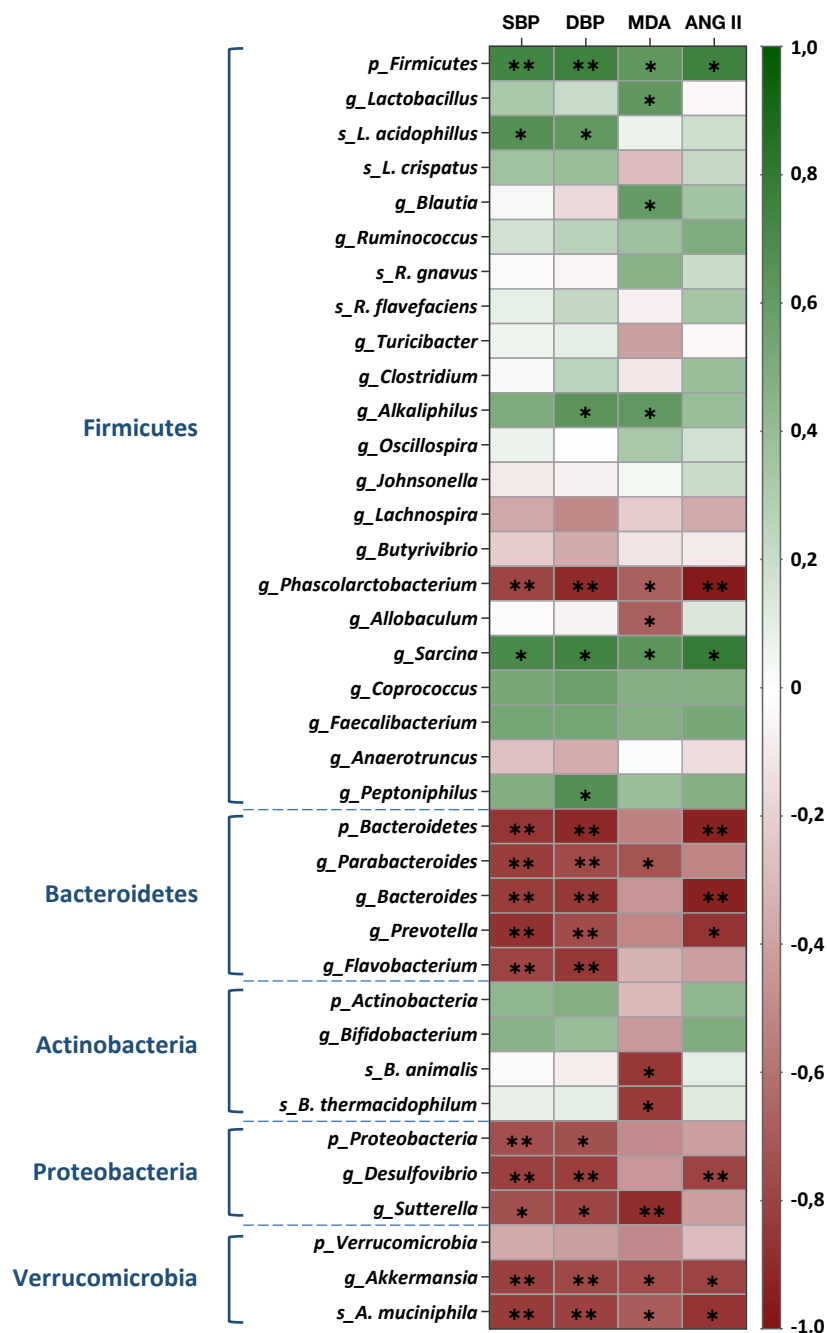
Resultados obtenidos mediante el complemento NetworkAnalyzer del programa Cytoscape versión 3.9.1. para las redes bacterianas de la microbiota fecal de WKY-c ( $n = 8$ ) y ratas SHR-c ( $n = 7$ ).



**Figura 4.6.** Red de interacciones bacterianas en la microbiota fecal de WKY-c y SHR-c a las 21 semanas de edad. El código de color de los nodos indica el filo al que pertenece cada género, mientras que el tamaño del nodo es proporcional a su abundancia relativa.

#### 4.1.5. Taxones bacterianos relacionados con la presión arterial en ratas controles normotensas e hipertensas

La asociación entre las bacterias de la microbiota fecal y la presión arterial en WKY-c y SHR-c a las 21 semanas de edad se estimó mediante el análisis de correlación de rangos de Spearman (Figura 4.7). Se estableció una asociación directa entre la abundancia relativa del filo Firmicutes, incluidos el género *Sarcina* y la especie *Lactobacillus acidophilus*, con la PAS y la PAD ( $\rho > 0,6$  y  $p < 0,05$ ). Aunque esta asociación positiva también se estableció para los géneros *Alkaliphilus* y *Peptoniphilus*, la correlación sólo fue significativa con la PAD ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, se estableció una asociación inversa ( $\rho < -0,6$  y  $p < 0,05$ ) entre los valores de PAS y PAD con la abundancia relativa del filo Bacteroidetes, incluidos los géneros *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Flavobacterium* y con el filo Proteobacteria, incluidos los géneros *Desulfovibrio* y *Sutterella*. A pesar de que el filo Verrucomicrobia no presentó una correlación significativa con la presión arterial, su género *Akkermansia* y la especie *Akkermansia muciniphila* se asociaron inversamente con PAS y PAD ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar que, del filo Firmicutes, sólo el género *Phascolarctobacterium* presentó una relación inversa y significativa con la presión arterial (Figura 4.7)



**Figura 4.7.** Mapa de calor de la correlación de rango de Spearman entre los taxones bacterianos de la microbiota fecal de las ratas SHR-c y WKY-c y la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD), el malondialdehído (MDA) y la angiotensina II (ANG II) a las 21 semanas de edad. Los colores van del rojo (correlación negativa) al verde (correlación positiva). \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  indican correlaciones estadísticamente significativas.

También se realizó el análisis de correlación de rangos de Spearman para estimar la asociación entre los taxones bacterianos de la microbiota fecal y las concentraciones plasmáticas de MDA y angiotensina II en ratas hipertensas y normotensas. La Figura 4.7 muestra que el filo Firmicutes, junto con los géneros



## Resultados

*Lactobacillus*, *Blautia*, *Alkaliphilus* y *Sarcina* mostraron una asociación directa con el MDA ( $\rho > 0,6$  y  $p < 0,05$ ); mientras que sólo el filo Firmicutes y *Sarcina* se correlacionaron directamente con la angiotensina II ( $\rho > 0,6$  y  $p < 0,05$ ). Por el contrario, los géneros *Phascolarctobacterium*, *Allobaculum*, *Parabacteroides*, *Sutterella* y *Akkermansia*, junto con las especies *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium thermacidophilum* y *Akkermansia muciniphila* se correlacionaron inversamente con valores más bajos de peroxidación lipídica ( $\rho < -0,6$  y  $p < 0,05$ ). Mientras que el filo Bacteroidetes y los géneros *Phascolarctobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Desulfovibrio* y *Akkermansia* presentaron una asociación inversa con angiotensina II ( $\rho < -0,6$  y  $p < 0,05$ ).

### 4.2. EFECTO DEL CONSUMO DE ACEITUNAS SOBRE LA MICROBIOTA FECAL DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS

#### 4.2.1. Efecto del consumo de aceitunas sobre el peso corporal de ratas normotensas e hipertensas

Se analizó el efecto de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg sobre el peso corporal en ratas normotensas e hipertensas. En ratas WKY-o, el peso corporal después de siete semanas de tratamiento con aceitunas fue similar al observado en las ratas del grupo control. De igual forma, el peso corporal de las ratas SHR administradas con aceitunas no reveló diferencias significativas en comparación con las ratas SHR del grupo control (Tabla 4.3). Adicionalmente, se encontró que el peso corporal de las ratas hipertensas a las 21 semanas de edad fue un 7% menor que el peso de ratas normotensas de la misma edad, independiente del tratamiento recibido.

**Tabla 4.3.** Efecto de la administración diaria de aceitunas arbequina durante siete semanas sobre el peso corporal, consumo de pienso, ingesta de agua y presión arterial en las ratas WKY y SHR respecto a sus controles.

	WKY-c	WKY-o	SHR-c	SHR-o
Peso corporal (g)	347 ± 10 <sup>a</sup>	345 ± 7 <sup>a</sup>	325 ± 4 <sup>a</sup>	323 ± 8 <sup>a</sup>
Consumo de pienso (g/día)	18,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	17,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	17,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	16,8 ± 0,5 <sup>a</sup>
Ingesta de agua (mL/día)	21,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	20,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	30,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	29,9 ± 1,5 <sup>b</sup>
PAS (mmHg)	152 ± 2 <sup>a</sup>	153 ± 4 <sup>a</sup>	228 ± 4 <sup>b</sup>	208 ± 7 <sup>c</sup>
PAD (mmHg)	109 ± 4 <sup>a</sup>	106 ± 5 <sup>a</sup>	177 ± 5 <sup>b</sup>	158 ± 4 <sup>c</sup>

Resultados expresados como media ± SEM en ratas WKY-c (n = 8) y del grupo WKY-o (n = 7) así como en ratas SHR-c (n = 7) y del grupo SHR-o (n = 7). PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. Los valores con letras distintas indican diferencias entre grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Efecto del consumo de aceitunas sobre la ingesta de pienso y de agua de ratas normotensas e hipertensas

El consumo diario de pienso se mantuvo estable, tanto en ratas WKY como en SHR, durante todo el periodo del estudio. Como se indica en la Tabla 4.3, los grupos que recibieron la administración con aceitunas (WKY-o y SHR-o) mantuvieron un consumo diario similar al de sus respectivos controles (WKY-c y SHR-c).

Con respecto a la ingesta de agua, tampoco se encontraron diferencias entre el volumen de agua consumido por los grupos WKY-o y SHR-o en comparación a lo ingerido por sus controles. La diferencia de la ingesta de agua entre WKY y SHR hallada a las 14 semanas de edad ( $p < 0,05$ ), se mantuvo durante todo el estudio (Tabla 4.3).

#### 4.2.3. Efecto sobre la presión arterial de ratas normotensas e hipertensas

La evaluación del efecto de la administración con aceitunas sobre la presión arterial de ratas normotensas e hipertensas mostró resultados diferentes para cada cepa de rata. Los resultados obtenidos en ratas normotensas indicaron que la presión arterial se mantuvo estable durante todo el período de estudio. En particular, los valores de PAS y PAD registrados en el grupo WKY-o después de siete semanas de tratamiento con aceitunas resultaron similares a los del grupo WKY-c (Tabla 4.3).

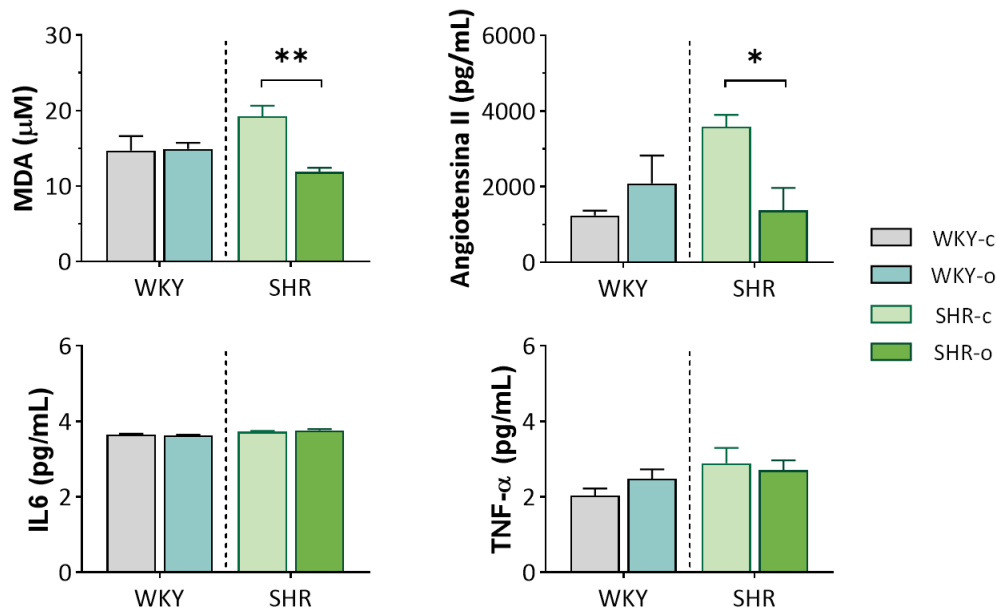
Por otro lado, los resultados indicaron que el tratamiento con aceitunas durante siete semanas redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) la presión arterial en las ratas SHR. Estos cambios correspondieron a un descenso estimado de 20 mmHg en la PAS y de 19 mmHg en la PAD del grupo SHR-o, en comparación con los valores determinados en SHR-c al final del experimento (Tabla 4.3).

#### 4.2.4. Efecto de la administración de aceitunas sobre biomarcadores asociados a la presión arterial en ratas normotensas e hipertensas

La administración con aceitunas durante siete semanas sobre los marcadores plasmáticos estudiados tuvo efectos diferentes en cada cepa de rata. En ratas WKY, la administración de aceitunas no tuvo ningún efecto sobre la concentración plasmática de MDA en el grupo WKY-o ( $14,7 \pm 1,9 \mu\text{M}$ ) y fue similar a la encontrada en el grupo WKY-c ( $14,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ). Con respecto a los resultados de angiotensina II en plasma, la concentración determinada en el grupo WKY-o ( $2360 \pm 490 \text{ pg/mL}$ ) fue mayor que la observada en WKY-c ( $1277 \pm 156 \text{ pg/mL}$ ); no obstante, el análisis estadístico no indicó diferencias significativas ( $p = 0,08$ ). Tampoco se hallaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de las citocinas proinflamatorias IL6 y TNF- $\alpha$  entre los grupos de ratas administradas con aceitunas y el grupo control (Figura 4.8).

## Resultados

En ratas SHR, la administración de aceitunas redujo significativamente la concentración plasmática de MDA en el grupo SHR-o ( $11,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ) en un 39% en comparación a lo determinado en SHR-c ( $19,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ). Además, indujo la disminución de la concentración de angiotensina II en un 32% en el grupo tratado ( $2487 \pm 356 \text{ pg/mL}$ ) con respecto a lo cuantificado en el grupo control ( $3705 \pm 380 \text{ pg/mL}$ ). Por su parte, no se encontraron diferencias en la concentración plasmática de IL6 y TNF- $\alpha$  entre los grupos SHR-o y SHR-c (Figura 4.8).



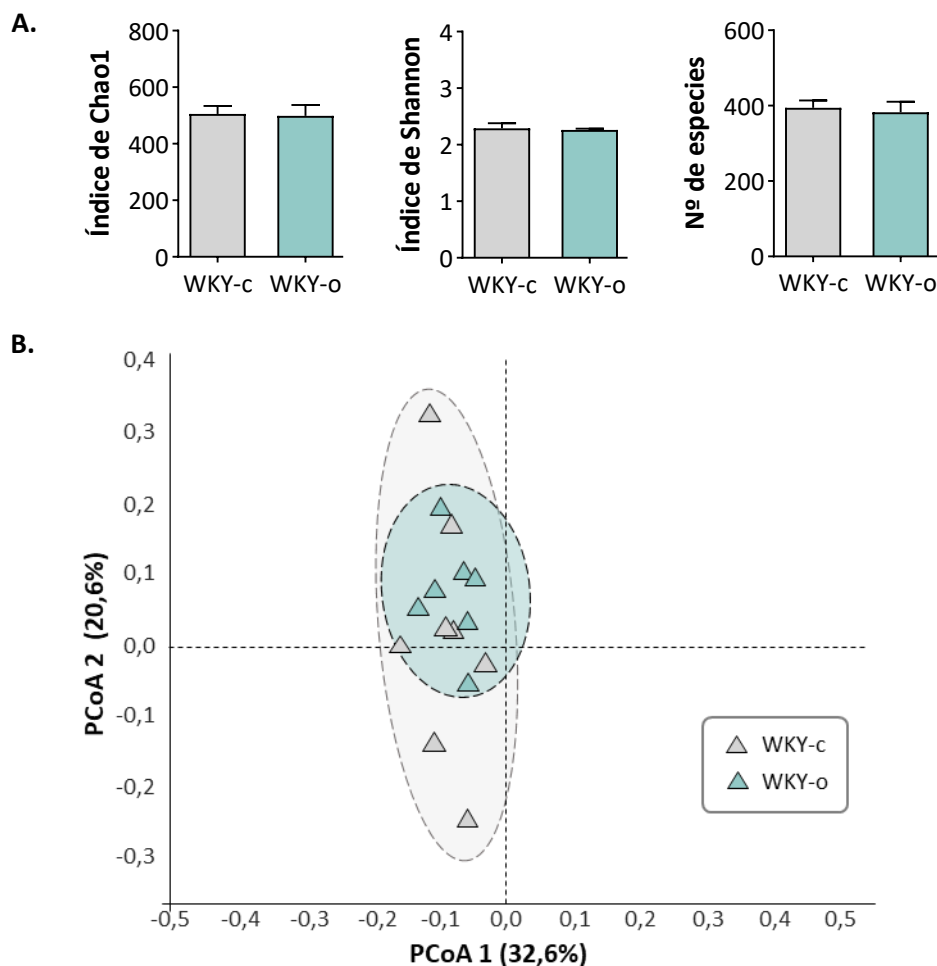
**Figura 4.8.** Efecto del consumo diario de aceitunas durante siete semanas sobre las concentraciones plasmáticas de malondialdehído (MDA), angiotensina II, interleucina 6 (IL6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en ratas WKY (WKY-c, n = 8; WKY-o, n = 7) y SHR (SHR-c, n = 7; SHR-o, n = 7). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  indican diferencias entre grupos.

### 4.2.5. Efecto de la ingesta de aceitunas sobre la microbiota fecal de ratas normotensas e hipertensas

El efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la microbiota fecal de ratas WKY y SHR, se analizó a partir de los cambios en la diversidad y la composición bacteriana de los grupos tratados con aceitunas (WKY-o; SHR-o) respecto a sus controles (WKY-c; SHR-c).

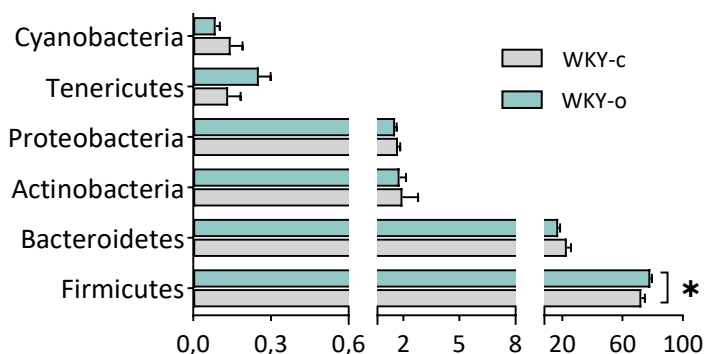
#### 4.2.5.1. Cambios en la microbiota fecal de ratas normotensas controles y tratadas con aceitunas

El análisis de la diversidad alfa mediante los índices de Chao1, Shannon y el número de especies, no mostró diferencias significativas entre WKY-c y WKY-o (Figura 4.9A). De igual forma, la diversidad beta no se vio afectada por el tratamiento con aceitunas. Las pruebas PERMANOVA ( $F = 1,29$ ;  $p = 0,234$ ) y ANOSIM ( $R = 0,15$ ;  $p = 0,187$ ) no indicaron diferencias entre las comunidades bacterianas de WKY-c y WKY-o (Figura 4.9B).



**Figura 4.9.** Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la diversidad de la microbiota fecal de ratas WKY-c (n = 8) y WKY-o (n = 7). La diversidad alfa (A) se expresa como la media  $\pm$  SEM del índice de Chao1, Shannon y el número de especies. La diversidad beta (B) se muestra mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA).

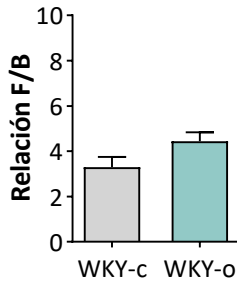
La administración con aceitunas promovió cambios en la abundancia relativa de taxones bacterianos del grupo WKY-o. A nivel de filo, las ratas WKY-o presentaron un aumento significativo de la abundancia relativa de Firmicutes (WKY-c: 72,52% y WKY-o: 78,33%) en comparación a lo observado en WKY-c (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la abundancia relativa a nivel de filo en ratas de los grupos WKY-c (n = 8) y WKY-o (n = 7). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p$  < 0,05 con FDR < 5% indican diferencias entre grupos.

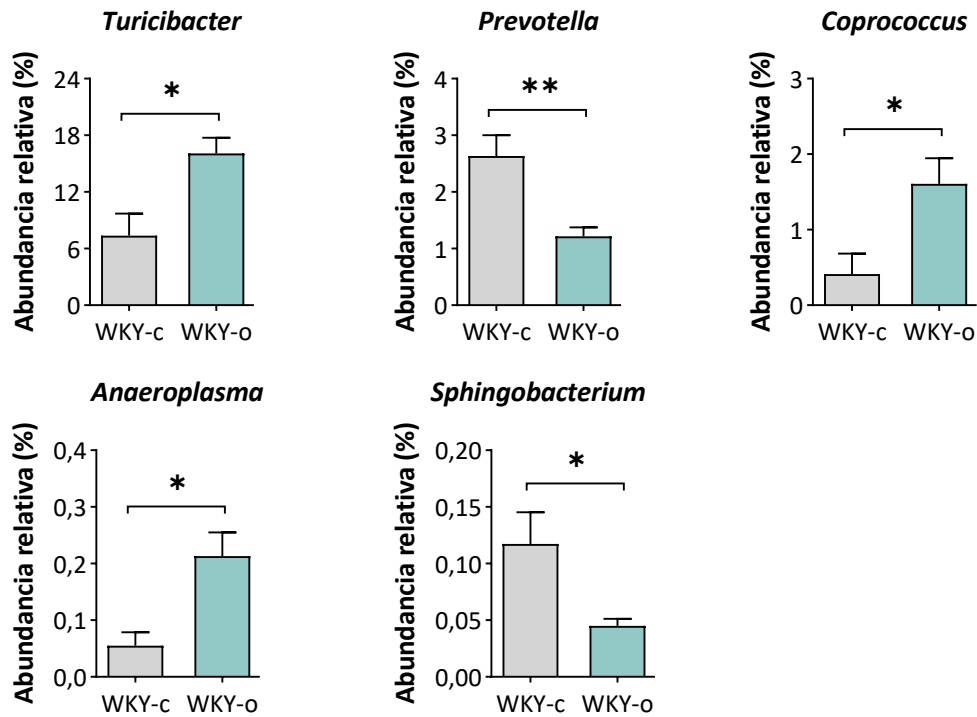
## Resultados

A pesar del incremento del filo Firmicutes, el análisis de la relación F/B no mostró diferencias entre WKY-c y WKY-o (Figura 4.11).

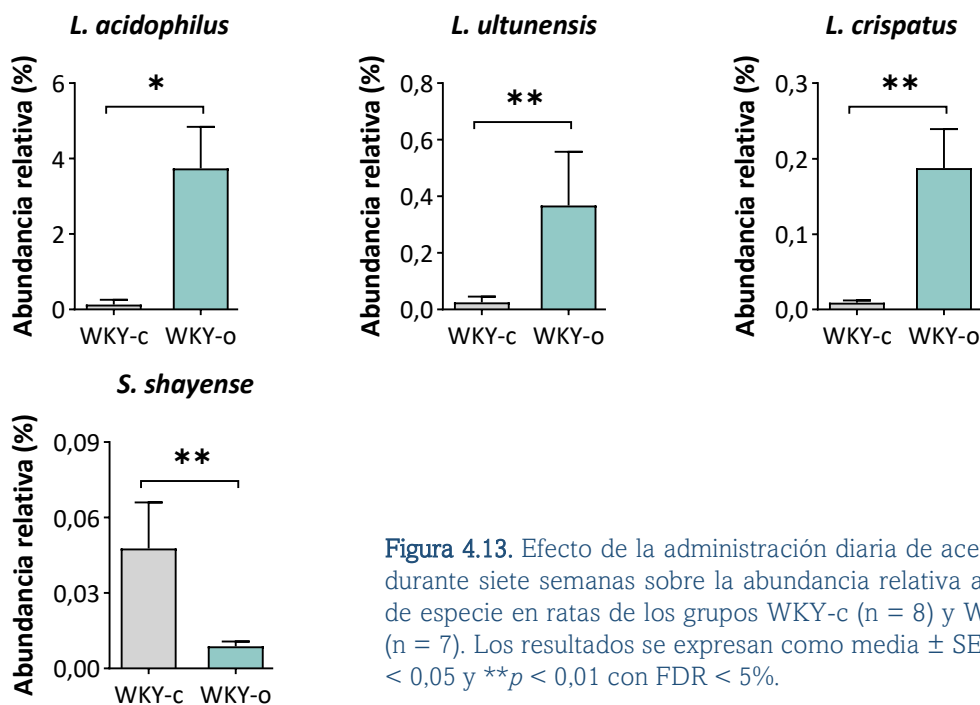


**Figura 4.11.** Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la relación Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) en ratas de los grupos WKY-c (n = 8) y WKY-o (n = 7). Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El tratamiento también incrementó significativamente la abundancia de los géneros *Turicibacter*, *Coprococcus* y *Anaeroplasma* y redujo la abundancia de *Prevotella* y *Sphingobacterium* (Figura 4.12). En el estudio de los efectos del tratamiento con aceitunas se incluyó el análisis a nivel de especie. Los resultados indicaron que la administración de aceitunas favoreció el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus ultunensis* y *Lactobacillus crispatus*, mientras que disminuyó la abundancia de *Sphingobacterium shayense* (Figura 4.13).



**Figura 4.12.** Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la abundancia relativa a nivel de género en ratas de los grupos WKY-c (n = 8) y WKY-o (n = 7). Los resultados se expresan como media ± SEM. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  con FDR < 5%.



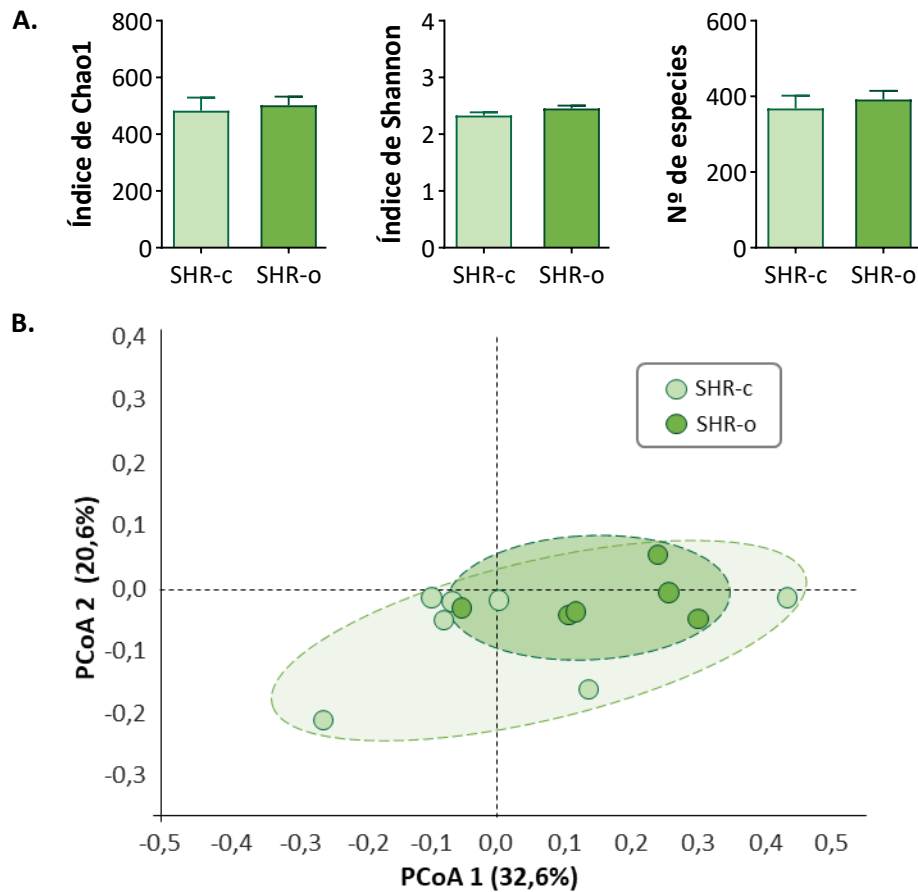
**Figura 4.13.** Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la abundancia relativa a nivel de especie en ratas de los grupos WKY-c (n = 8) y WKY-o (n = 7). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  con FDR < 5%.

#### 4.2.5.2. Cambios en la microbiota fecal de ratas hipertensas controles y tratadas con aceitunas

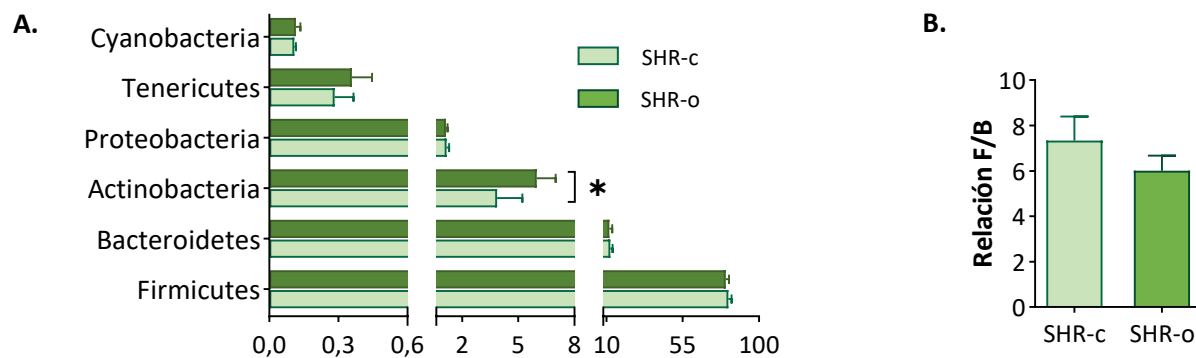
En las ratas hipertensas no se encontraron cambios en la diversidad de la microbiota fecal debidos a la administración de aceitunas. La administración de aceitunas no modificó ninguna de las métricas de diversidad alfa en el grupo SHR-o comparado con los resultados del grupo SHR-c (Figura 4.14A). El análisis de la diversidad beta tampoco identificó diferencias entre las comunidades bacterianas de SHR-o y SHR-c, según las pruebas (PERMANOVA:  $F = 2,47$ ;  $p = 0,423$  y ANOSIM:  $R = 0,18$ ;  $p = 0,472$ ) (Figura 4.14B).

El estudio de la composición de la microbiota fecal de ratas SHR-o, a nivel taxonómico, mostró que la administración con aceitunas favoreció significativamente el crecimiento del filo Actinobacteria comparado con los resultados obtenidos en SHR-c (SHR-c: 3,09% y SHR-o: 5,99%) (Figura 4.15A). La administración con aceitunas no tuvo efectos sobre la abundancia de Firmicutes ni Bacteroidetes y en consecuencia la relación F/B no se vio afectada (Figura 4.15B).

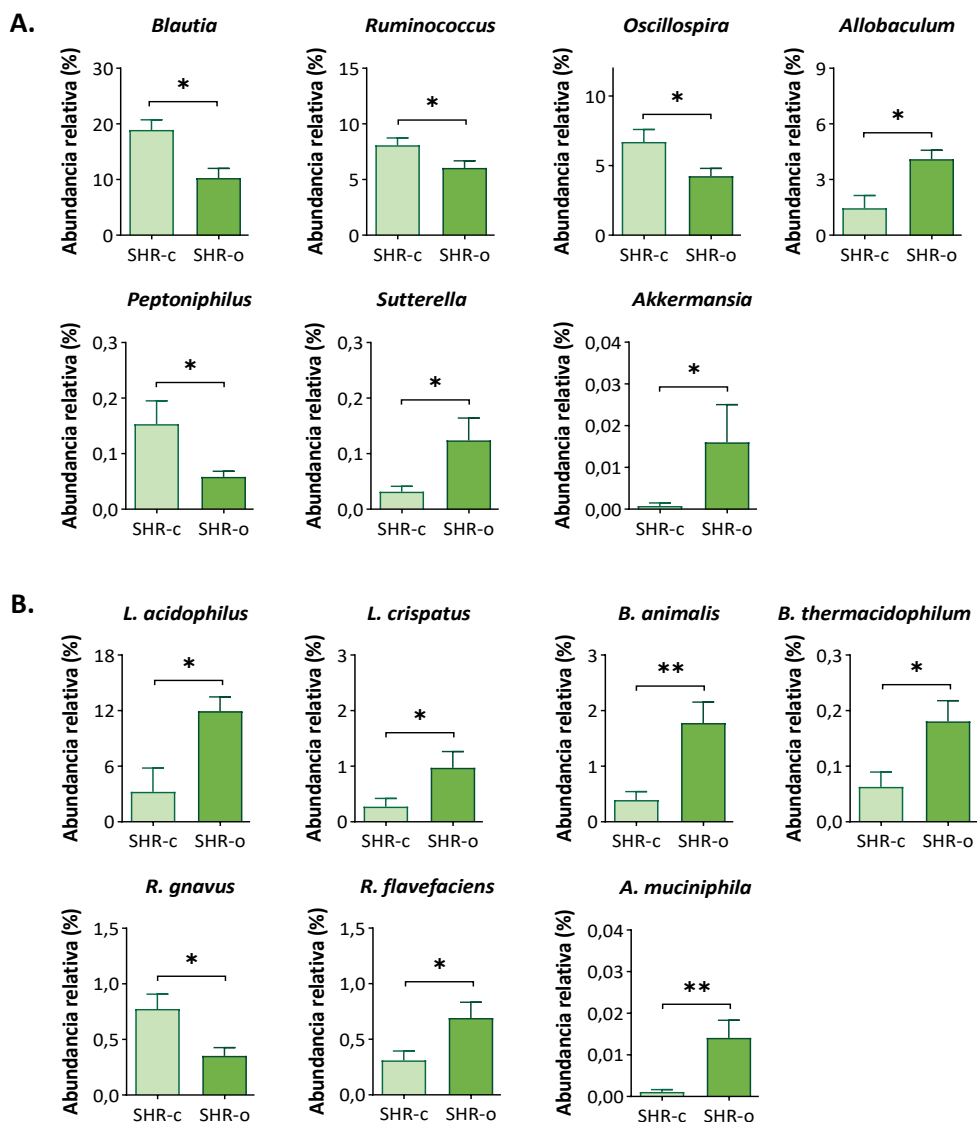
Por otro lado, la administración de aceitunas en SHR-o incrementó la abundancia de los géneros *Allobaculum*, *Sutterella* y *Akkermansia*; además de reducir crecimiento de *Peptoniphilus*, *Blautia*, *Oscillospira* y *Ruminococcus* ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.16A). A nivel de especie, la ingesta de aceitunas aumentó significativamente la abundancia de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium thermacidophilum*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Akkermansia muciniphila*, mientras que redujo la abundancia de *Ruminococcus gnavus* (Figura 4.16B)



**Figura 4.14.** Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre la diversidad de la microbiota fecal de ratas de los grupos SHR-c (n = 7) y SHR-o (n = 6). (A) La diversidad alfa se expresa como la media  $\pm$  SEM del índice de Chao1, Shannon y el número de especies. (B) La diversidad beta se muestra mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA).



**Figura 4.15.** Efecto de la administración diaria de aceitunas durante siete semanas sobre: (A) la abundancia relativa a nivel de filo y (B) la relación Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) en ratas de los grupos SHR-c (n = 7) y SHR-o (n = 6). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  con FDR < 5% indican diferencias entre grupos.



**Figura 4.16.** Efecto de la administración diaria de aceitunas durante 7 semanas, sobre la abundancia relativa a nivel de género (A) y especie (B) en ratas de los grupos SHR-c (n = 7) y SHR-o (n = 6). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  con FDR < 5%.

#### 4.2.5.3. Cambios en la interacción bacteriana de la microbiota fecal de ratas normotensas e hipertensas tratadas con aceitunas

La red de co-ocurrencia del grupo WKY-o, después de siete semanas de suplementación diaria con aceitunas, incluyó 25 géneros bacterianos (nodos) y 56 interacciones significativas (Figura 4.17), con un grado de conectividad de 4,48 y una densidad de red de 0,093 (Tabla 4.4). Estos resultados en comparación a lo observado en la red de las ratas WKY-c presentan un menor grado de conectividad (Tabla 4.2); no obstante la red de las ratas WKY-o muestra un mayor número de correlaciones positivas.



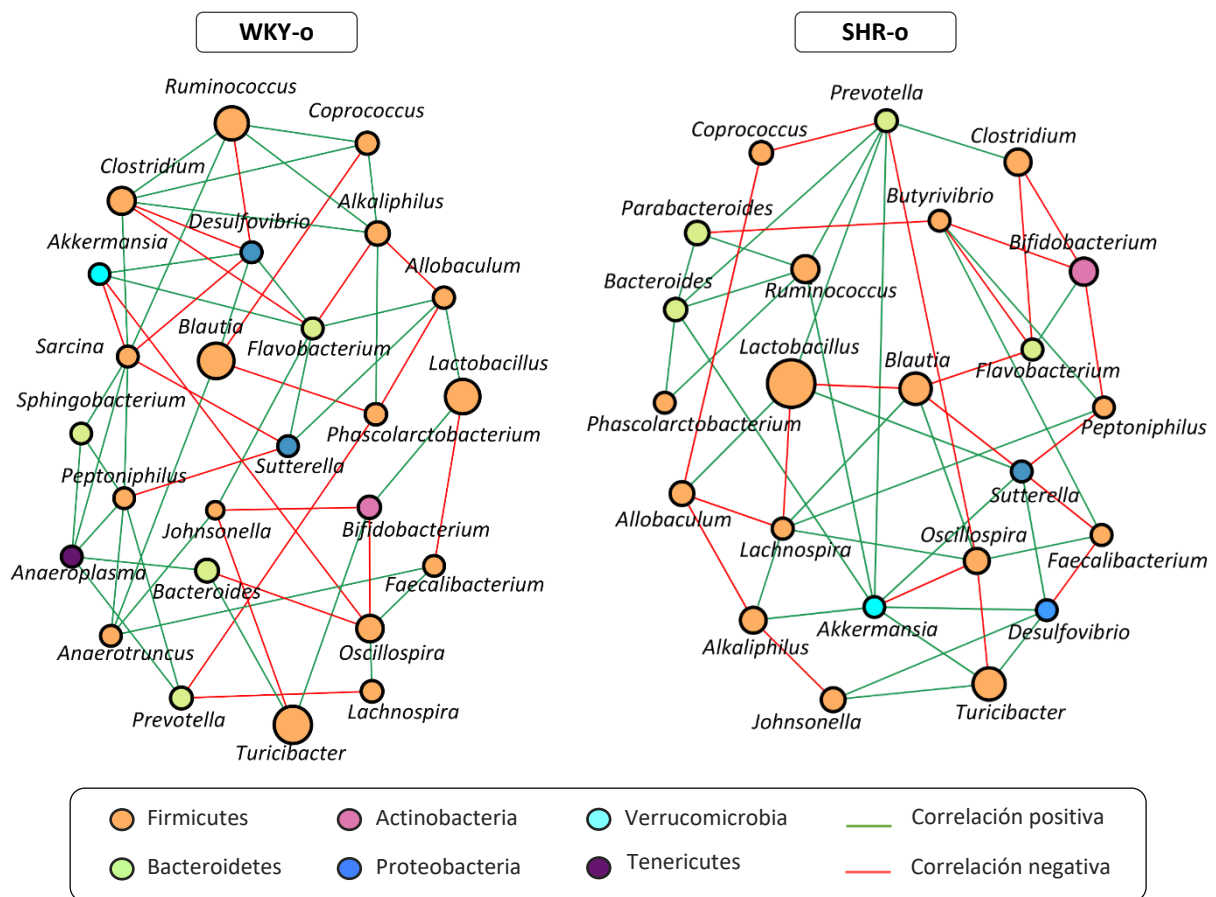
## Resultados

**Tabla 4.4.** Métricas de las redes de co-ocurrencia de WKY-o y SHR-o.

	WKY-o	SHR-o
Número de nodos	25	23
Número de aristas	56	52
Correlación positiva	37	31
Correlación negativa	19	21
Grado de conectividad	4,48	4,52
Coefficiente de agrupamiento	0,133	0,162
Densidad de la red	0,093	0,103

Resultados obtenidos mediante el complemento NetworkAnalyzer del programa Cytoscape versión 3.9.1 para las redes bacterianas de la microbiota fecal de ratas WKY-o ( $n = 7$ ) y SHR-o ( $n = 6$ ).

En el grupo SHR-o, después de siete semanas de administración con aceitunas, la red microbiana incluyó 23 géneros relacionados por 52 interacciones significativas (Figura 4.17). Además, se identificó un mayor grado de conectividad (4,52) en comparación con el grupo control (3,56). Cabe destacar que la administración de aceitunas favoreció la presencia de Akkermansia dentro de la red (grado 8), así como el establecimiento de un mayor número de correlaciones positivas entre taxones.



**Figura 4.17.** Red de interacciones bacterianas en la microbiota fecal de WKY-o y SHR-o a las 21 semanas de edad. El código de color de los nodos indica el filo al que pertenece cada género, mientras que el tamaño del nodo es proporcional a su abundancia relativa.

### 4.3. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL: CONSUMO DIARIO DE ACEITUNAS EN ADULTOS SANOS

#### 4.3.1. Características basales de los participantes del estudio

Del panel de voluntarios del CIM-Sant Pau se eligió un total de 40 participantes. En la figura 4.18 se muestra el proceso que los participantes siguieron durante el estudio, desde la etapa de reclutamiento hasta la evaluación final, de acuerdo con las guías clínicas del Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) (Dwan *et al.*, 2010). Se aleatorizaron 40 participantes a cada brazo de la investigación, ningún participante presentó efectos adversos y todos los participantes completaron la recopilación de datos al final de ambos periodos.

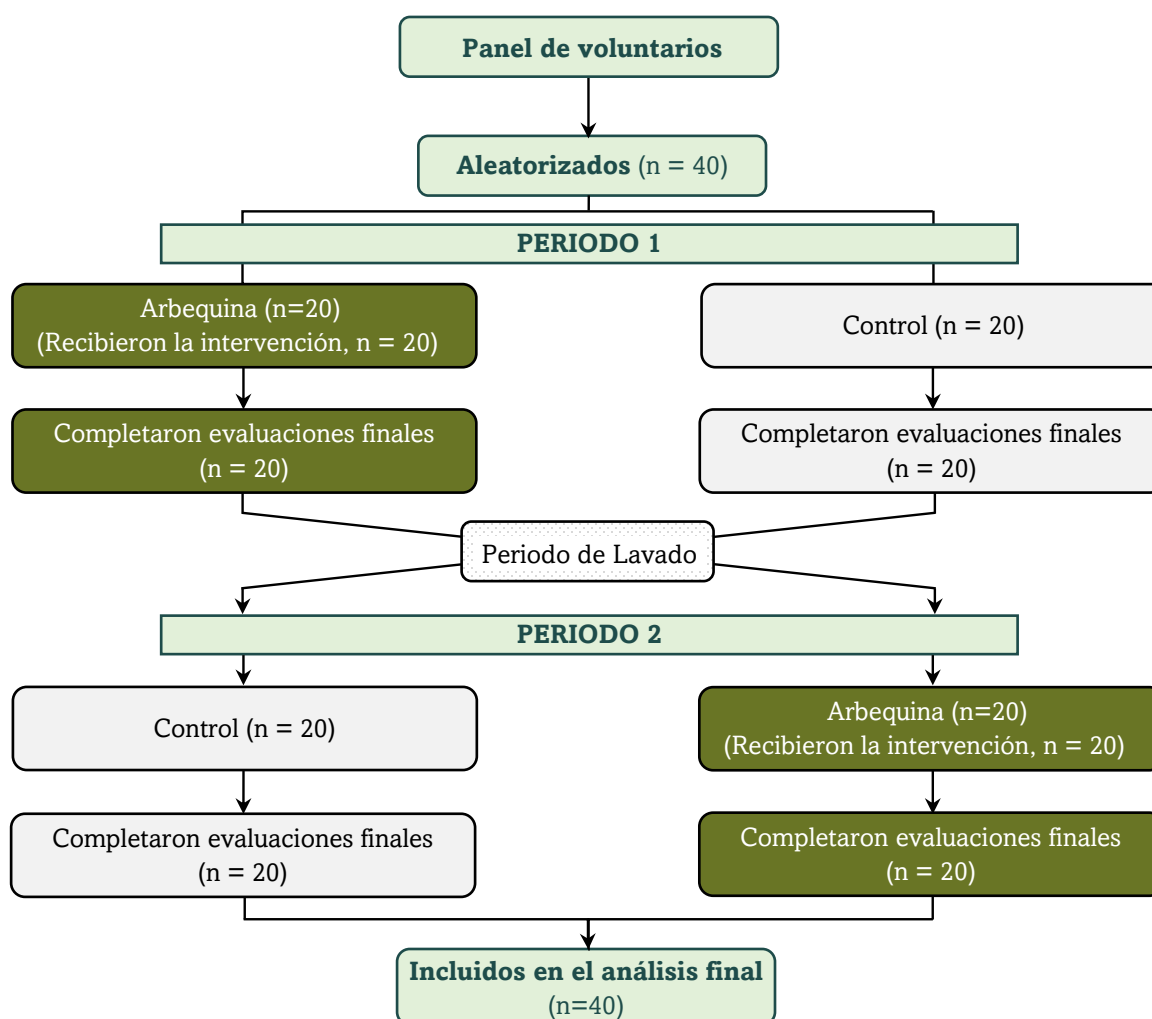


Figura 4.18. Esquema CONSORT del proceso de los participantes a través de las fases de este estudio.

## Resultados

Una vez terminado el reclutamiento de los voluntarios, todos los participantes asistieron al CIM-Sant Pau para realizar la evaluación inicial del estudio. En las tablas 4.5 y 4.6 se muestran las características basales de los participantes distribuidos por secuencia de aleatorización, según las recomendaciones para estudios de diseño cruzado (Dwan *et al.*, 2010).

Entre de los 40 participantes aleatorizados, el estudio incluyó 18 mujeres y 22 hombres, con una edad media  $40,5 \pm 0,76$  años y un índice de masa corporal (IMC) medio de  $26,23 \pm 0,47$  kg/m<sup>2</sup>. Las características antropométricas basales fueron similares entre las mujeres de la secuencia Control – Arbequina (C/A) y la secuencia Arbequina – Control (A/C). Mientras que en los hombres, el peso corporal, el IMC y el perímetro abdominal fueron mayores en los participantes de la secuencia (A/C). Al inicio del estudio, todos los participantes presentaron valores de presión arterial dentro del rango normal y fueron similares en ambas secuencias del estudio, tal como se detalla en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.** Características antropométricas y clínicas de los participantes al inicio del estudio según secuencia de aleatorización.

	Control - Arbequina (n=20)	Arbequina - Control (n=20)	Total (n=40)
<b>Sexo, n (%)</b>			
Hombres	10 (50%)	12 (60%)	22 (55%)
Mujeres	10 (50%)	8 (40%)	18 (45%)
<b>Edad (años ± SEM)</b>			
Hombres	40,3 ± 1,6	40,1 ± 2,2	40,2 ± 1,4
Mujeres	38,2 ± 1,5	44,3 ± 3,2	40,9 ± 1,7
<b>Peso corporal (kg ± SEM)</b>			
Hombres	74,86 ± 3,52	85,67 ± 2,07	80,78 ± 2,10
Mujeres	68,39 ± 2,34	68,41 ± 2,81	68,39 ± 1,77
<b>Estatura (cm ± SEM)</b>			
Hombres	170,80 ± 1,79	173,08 ± 2,08	172,05 ± 1,20
Mujeres	164,90 ± 1,30	160,88 ± 1,90	163,11 ± 1,15
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup> ± SEM)</b>			
Hombres	25,40 ± 0,73	28,52 ± 0,41	27,12 ± 0,46
Mujeres	25,15 ± 0,82	26,30 ± 0,67	25,66 ± 0,55
<b>Perímetro abdominal (cm ± SEM)</b>			
Hombres	88,30 ± 2,99	97,58 ± 3,00	93,36 ± 2,31
Mujeres	81,60 ± 4,53	83,94 ± 2,66	82,64 ± 2,72
<b>Signos vitales</b>			
FC (lpm)	68,85 ± 1,13	68,55 ± 1,13	68,70 ± 0,80
FR (rpm)	12,0 [12,0 - 12,0]	12,0 [12,0 - 14,0]	2,0 [12,0 - 14,0]
<b>Presión arterial (mmHg ± SEM)</b>			
PAS (mmHg)	113,2 ± 2,0	119,7 ± 2,5	116,4 ± 1,7
PAD (mmHg)	62,8 ± 1,8	65,8 ± 1,7	64,3 ± 1,3

Valores expresados como n (%), media ± SEM o mediana [p25 - p75], IMC, índice de masa corporal; FC, frecuencia cardiaca; FR, frecuencia respiratoria; PAD, presión arterial diastólica; PAS, presión arterial sistólica; lpm, latidos por minuto; rpm, respiraciones por minuto.

Debido a que la ingesta de 60 aceitunas implica una cantidad superior a la consumida usualmente, se incluyeron en el estudio pruebas hematológicas y de bioquímica clínica para evaluar la tolerancia al producto de la intervención y controlar la seguridad de los participantes durante el estudio. En la tabla 4.6 se puede observar que al inicio del estudio todos los participantes presentaron valores normales y que fueron homogéneos entre las dos secuencias de aleatorización.

**Tabla 4.6.** Variables hematológicas y bioquímicas al inicio del estudio, según secuencia de aleatorización.

	Control - Arbequina (n=20)	Arbequina - Control (n=20)	Total (n=40)
<b>Hematología</b>			
Eritrocitos (x 10 <sup>12</sup> /L)	4,58 ± 0,10	4,81 ± 0,12	4,69 ± 0,08
Hemoglobina (g/L)	136,75 ± 2,97	140,60 ± 3,67	138,68 ± 2,35
Hematocrito (L/L)	0,40 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,41 ± 0,01
VCM (fL)	87,67 ± 0,66	86,50 ± 0,95	87,08 ± 0,58
CCMH (g/L)	339,49 ± 1,81	334,13 ± 3,01	336,77 ± 1,78
HCM (pg)	29,93 ± 0,37	29,27 ± 0,38	29,60 ± 0,27
RDW (%)	12,8 [12,4 - 13,4]	12,7 [12,3 - 13,2]	12,8 [12,4 - 13,3]
Leucocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	6,96 ± 0,31	6,78 ± 0,35	6,87 ± 0,23
Neutrófilos (x 10 <sup>9</sup> /L)	3,81 ± 0,16	3,76 ± 0,15	3,79 ± 0,11
Eosinófilos (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,19 [0,10 - 0,29]	0,18 [0,14 - 0,26]	0,18 [0,11 - 0,29]
Basófilos (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,04 [0,04 - 0,06]	0,05 [0,04 - 0,05]	0,05 [0,04 - 0,05]
Monocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,55 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,56 ± 0,02
Linfocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	2,28 ± 0,11	2,03 ± 0,13	2,15 ± 0,09
Plaquetas (x 10 <sup>9</sup> /L)	256,5 [220 - 292]	337,0 [325 - 346]	246,0 [215 - 278]
VPM (fL)	8,4 [8,0 - 9,1]	9,1 [8,5 - 9,6]	8,8 [8,2 - 9,4]
<b>Bioquímica clínica</b>			
Glucosa (mmol/L)	4,61 ± 0,09	4,62 ± 0,09	4,61 ± 0,06
TAG (mmol/L)	0,89 [0,72 - 1,34]	0,84 [0,59 - 1,03]	0,88 [0,63 - 1,12]
CT (mmol/L)	4,93 ± 0,18	4,46 ± 0,20	4,70 ± 0,14
HDL-c (mmol/L)	1,35 ± 0,07	1,26 ± 0,06	1,30 ± 0,05
LDL-c (mmol/L)	2,98 ± 0,18	2,78 ± 0,18	2,88 ± 0,13
VLDL-c (mmol/L)	0,41 [0,33 - 0,61]	0,39 [0,28 - 0,48]	0,41 [0,29 - 0,52]
Sodio (mmol/L)	139,5 [139,0 - 141,0]	140,0 [140,0 - 140,3]	140,0 [139,0 - 141,0]
Ácido Úrico (μmol/L)	260,5 [232,5 - 316,5]	304,5 [239,5 - 338,5]	283,0 [234,5 - 334,5]
Urea (mmol/L)	5,06 ± 0,26	4,93 ± 0,21	4,99 ± 0,17
Creatinina (μmol/L)	63,0 [60,0 - 69,7]	67,0 [62,5 - 76,0]	66,5 [60,8 - 72,5]
AST (U/L)	15,0 [13,0 - 18,3]	18,0 [16,0 - 21,0]	17,0 [14,0 - 21,0]
ALT (U/L)	14,0 [11,0 - 25,3]	19,5 [12,5 - 25,3]	16,0 [11,0 - 25,3]
Fosfatasa alcalina (U/L)	65,00 ± 2,61	66,08 ± 2,92	65,55 ± 1,95
Proteínas totales (g/L)	68,99 ± 0,56	68,82 ± 0,49	68,91 ± 0,37

Valores expresados como media ± SEM o mediana [p25 - p75]. VCM, volumen corpuscular medio; CCMH, concentración de hemoglobina corpuscular media; HCM, hemoglobina corpuscular media; RDW, amplitud de distribución eritrocitaria; VPM, volumen plaquetario medio; TAG, triglicéridos; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL-c, colesterol de lipoproteínas de baja densidad; VLDL-c, colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; AST, aspartato transaminasa; ALT, alanina transaminasa.

## Resultados

### 4.3.2. Principales medidas de resultado

#### 4.3.2.1. Efecto del consumo de aceitunas sobre el peso corporal de adultos sanos

Se analizaron los pesos medios de los participantes de cada secuencia (C/A y A/C) para identificar cambios significativos al final de la fase control o de la fase arbequina. Se utilizó la prueba ANOVA de una vía para medidas repetidas, considerando como referencia los valores iniciales de cada periodo (0 y 45 días).

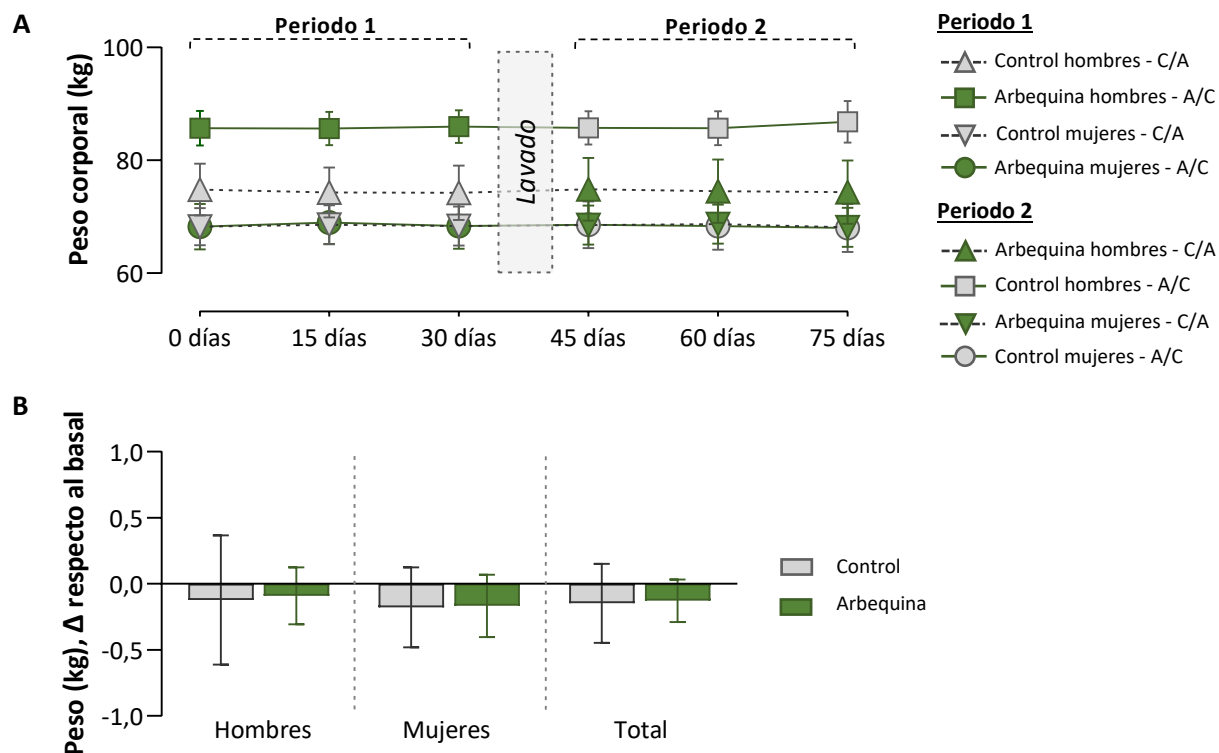
Los resultados obtenidos de los 20 participantes de cada secuencia no evidenciaron cambios significativos al final de la fase control ni al final de la fase arbequina (Tabla 4.7). A continuación, se analizó el cambio de peso de los participantes distribuidos por sexo en cada secuencia. En los hombres no se encontraron variaciones significativas en el peso corporal durante el estudio, los resultados tanto en la secuencia C/A como en la secuencia A/C, no presentaron diferencias significativas en ninguna de las fases. Por otro lado, el peso corporal de las mujeres en la secuencia C/A no mostró cambios significativos a lo largo del estudio; no obstante, en las mujeres de la secuencia A/C durante la fase control (periodo 2) se detectó una reducción significativa de 0,6 kg de peso corporal (Tabla 4.7 y Figura 4.19A).

**Tabla 4.7.** Peso corporal de los participantes del estudio distribuidos por secuencia, periodo y sexo.

	Periodo 1				Periodo 2			
	0 días	15 días	30 días	<i>p</i>	45 días	60 días	75 días	<i>p</i>
<b>Control-Arbequina (C/A)</b>								
<b>Peso corporal (kg)</b>								
Todos (n = 20)	71,5 ± 2,9	71,5 ± 2,8	71,3 ± 3,0	0,792	71,7 ± 3,3	71,6 ± 3,3	71,3 ± 3,3	0,058
Hombres (n = 10)	74,8 ± 4,6	74,3 ± 4,4	74,3 ± 4,8	0,526	74,9 ± 5,6	74,6 ± 5,6	74,4 ± 5,6	0,112
Mujeres (n = 10)	68,2 ± 3,3	68,6 ± 3,5	68,4 ± 3,5	0,677	68,6 ± 3,5	68,7 ± 3,5	68,2 ± 3,5	0,205
<b>Arbequina-Control (A/C)</b>								
<b>Peso corporal (kg)</b>								
Todos (n = 20)	78,7 ± 03,1	79,0 ± 2,9	78,9 ± 3,1	0,534	78,9 ± 3,1	78,8 ± 3,1	79,3 ± 3,5	0,592
Hombres (n = 12)	85,7 ± 3,1	85,6 ± 2,9	86,0 ± 2,9	0,604	85,8 ± 2,9	85,7 ± 3,0	86,8 ± 3,7	0,364
Mujeres (n = 8)	68,3 ± 4,1	69,0 ± 3,8	68,4 ± 4,0	0,104	68,6 ± 4,2	68,4 ± 4,2	68,0 ± 4,3 <sup>#</sup>	0,024

Valores expresados como media ± SEM. <sup>#</sup>*p* < 0,05 cuando se compara con la medición inicial del periodo. En cada periodo se empleó la prueba ANOVA para medidas repetidas, ajustada con prueba post-hoc de Bonferroni.

El peso corporal medio de los 22 participantes hombres se redujo en  $0,12 \pm 0,49$  kg durante la fase control, mientras que durante la fase arbequina se observó una disminución de  $0,09 \pm 0,22$  kg. En el caso de las 18 participantes mujeres, el peso corporal al final de las fases control y arbequina se redujo en comparación a la medición inicial en  $0,18 \pm 0,30$  kg y  $0,17 \pm 0,24$  kg, respectivamente. En conjunto, los 40 participantes presentaron una reducción de  $0,15 \pm 0,30$  kg al finalizar la fase control y de  $0,13 \pm 0,16$  kg al final de la fase arbequina (Figura 4.19B).



**Figura 4.19.** Efecto del consumo diario de aceitunas arbequina sobre el peso corporal de los participantes. (A) Peso de los participantes por secuencia de aleatorización y periodo, distribuidos por sexo. (B) Cambio de peso corporal al final de cada fase respecto al inicial, por sexo y total de los participantes. C/A, secuencia Control – Arbequina; A/C, secuencia Arbequina – Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM.

#### 4.3.2.2. Efecto del consumo de aceitunas sobre la presión arterial de adultos sanos

Se analizaron las variaciones de la presión arterial en cada secuencia y periodo del estudio. Todas las mediciones realizadas durante la investigación estuvieron dentro de los valores normales de PA para un adulto sano.

La PAS de los participantes aleatorizados en la secuencia C/A ( $n = 20$ ) se mantuvo estable a lo largo del estudio y las variaciones halladas tanto en la fase control como en la fase arbequina no fueron significativas. Del mismo modo, la PAS de los participantes de la secuencia A/C ( $n = 20$ ) fueron similares en ambas fases del estudio. Adicionalmente, se analizaron las variaciones de la PAS de los participantes distribuidos por sexo. Los resultados de hombres y mujeres en ambas secuencias, no mostraron diferencias significativas entre las medición basal, la medición a los 15 días y a los 30 días, en ninguna de las fases (Tabla 4.8 y Figura 4.20A). Al final de la fase control todos los participantes hombres ( $n = 22$ ) presentaron un incremento de  $2,05 \pm 1,64$  mmHg, mientras que al finalizar la fase arbequina presentaron una reducción de  $0,50 \pm 1,80$  mmHg. En el caso de las participantes mujeres ( $n = 18$ ), la PAS se incrementó en  $3,17 \pm 2,08$  mmHg y  $1,22 \pm 2,24$  mmHg al

## Resultados

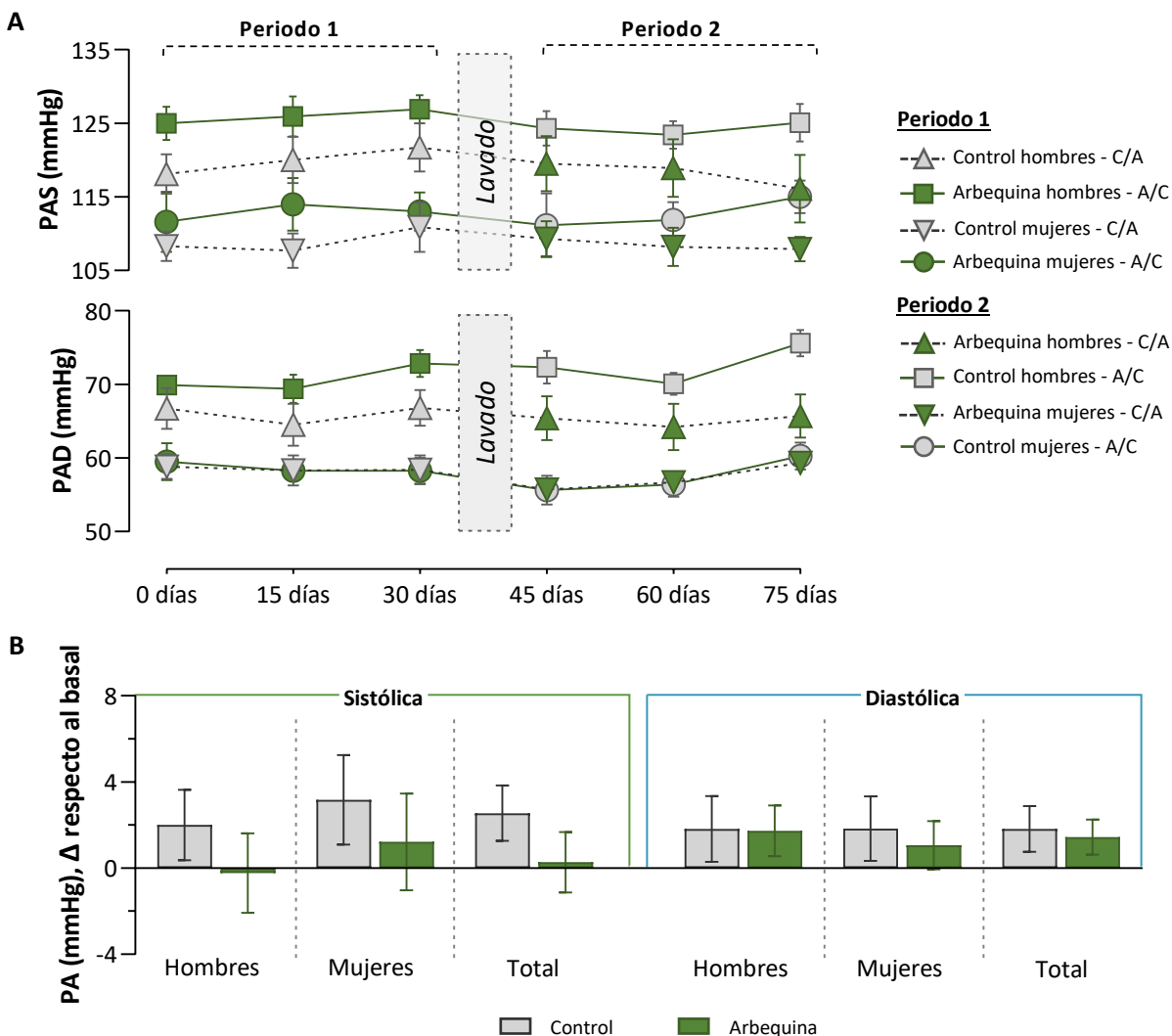
final de las fases control y arbequina, respectivamente. Para el total de participantes ( $n = 40$ ), el incremento al final de la fase control fue de  $2,55 \pm 1,28$  mmHg y de  $0,28 \pm 1,40$  al final de la fase arbequina (Figura 4.20B).

**Tabla 4.8.** Presión arterial sistólica y diastólica de los participantes del estudio distribuidos por secuencia, periodo y sexo.

	Periodo 1				Periodo 2			
	0 días	15 días	30 días	<i>p</i>	45 días	60 días	75 días	<i>p</i>
<b>Control-Arbequina (C/A)</b>								
<b>PAS (mmHg)</b>								
Todos ( $n = 20$ )	113,2 ± 2,0	113,9 ± 2,4	116,3 ± 2,6	0,117	114,7 ± 2,5	113,6 ± 2,6	112,0 ± 2,6	0,407
Hombres ( $n = 10$ )	118,1 ± 2,7	120,0 ± 3,2	121,7 ± 3,3	0,310	119,5 ± 3,8	118,9 ± 3,9	115,0 ± 2,2	0,459
Mujeres ( $n = 10$ )	108,3 ± 2,0	107,7 ± 2,3	110,9 ± 3,4	0,295	109,3 ± 2,4	108,2 ± 2,6	107,9 ± 1,7	0,828
<b>PAD (mmHg)</b>								
Todos ( $n = 20$ )	62,8 ± 1,8	61,4 ± 1,9	62,6 ± 1,8	0,527	60,6 ± 1,9	60,5 ± 1,9	62,7 ± 1,8	0,243
Hombres ( $n = 10$ )	66,7 ± 2,8	64,5 ± 2,9	66,8 ± 2,4	0,451	65,4 ± 3,0	64,2 ± 3,1	65,7 ± 2,9	0,686
Mujeres ( $n = 10$ )	58,8 ± 1,7	58,3 ± 2,1	58,4 ± 2,0	0,931	55,7 ± 0,9	56,7 ± 1,4	59,3 ± 1,6	0,116
<b>Arbequina-Control (A/C)</b>								
<b>PAS (mmHg)</b>								
Todos ( $n = 20$ )	119,7 ± 2,5	121,2 ± 2,5	121,8 ± 2,2	0,480	119,1 ± 2,6	118,6 ± 2,0	121,1 ± 2,1	0,463
Hombres ( $n = 12$ )	125,0 ± 2,3	125,9 ± 2,7	126,9 ± 1,9	0,699	124,3 ± 2,4	121,4 ± 2,1	125,1 ± 2,6	0,765
Mujeres ( $n = 8$ )	111,6 ± 4,1	114,0 ± 3,6	116,4 ± 4,1	0,591	111,1 ± 4,4	109,8 ± 3,0	115,0 ± 2,2	0,550
<b>PAD (mmHg)</b>								
Todos ( $n = 20$ )	65,8 ± 1,7	65,0 ± 1,7	67,0 ± 2,1	0,296	65,6 ± 2,4	64,3 ± 1,9	69,5 ± 2,1* <sup>#</sup>	0,005
Hombres ( $n = 12$ )	69,9 ± 1,2	69,4 ± 1,9	72,8 ± 1,9	0,140	72,3 ± 2,2	69,1 ± 1,7	75,6 ± 1,8	0,068
Mujeres ( $n = 8$ )	59,5 ± 2,5	58,3 ± 0,7	58,3 ± 1,7	0,653	55,6 ± 2,0	56,4 ± 1,7	60,3 ± 1,9	0,106

Valores expresados como media ± SEM. PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. En cada periodo se empleó ANOVA para medidas repetidas ajustada con prueba post-hoc de Bonferroni.

Respecto a la PAD, se observó que en la secuencia C/A las variaciones para el total de participantes ( $n = 20$ ), no fueron significativas en ninguna de las fases. Tampoco se hallaron diferencias significativas cuando se realizó el análisis de medidas repetidas por sexo. Sin embargo, la PAD de los participantes asignados a la secuencia A/C ( $n = 20$ ), presentó un incremento significativo al final de la fase control (periodo 2), comparada con la medición inicial y la medición a los 15 días. Al analizar las variaciones según sexo no se encontraron cambios significativos de la PAD en la fase arbequina ni en la fase control; no obstante, se observó un incremento no significativo durante la fase control (Tabla 4.8 y Figura 4.20A). En la Figura 4.20B se muestra el cambio de la PAD respecto a la medición inicial en cada fase del estudio. El cambio durante la fase control para hombres ( $n = 22$ ), mujeres ( $n = 18$ ) y el total de participantes ( $n = 40$ ) fue un incremento de 1,8 mmHg aproximadamente, mientras que durante la fase arbequina, el incremento en los hombres fue de  $1,73 \pm 1,17$  mmHg, en mujeres de  $1,06 \pm 1,12$  mmHg y de  $1,44 \pm 0,81$  mmHg para el total de participantes.



**Figura 4.20.** Efecto de la intervención sobre la presión arterial (PA) de los participantes. (A) PAS y PAD de los participantes por secuencia de aleatorización y periodo, distribuidos por sexo. (B) Cambio de PAS y PAD al final de cada fase respecto al inicial, por sexo y total de los participantes. C/A, secuencia Control – Arbequina; A/C, secuencia Arbequina – Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM.

#### 4.3.2.3. Efecto del consumo de aceitunas sobre el perfil lipídico de adultos sanos

Se analizaron los cambios en el perfil lipídico en sangre de todos los participantes en cada fase del estudio, según su secuencia de aleatorización y su distribución por sexo (Tabla 4.9). Adicionalmente, se ha calculado el cambio en la concentración media de lípidos de los 40 participantes al final de la fase control y al final de la fase arbequina. Cabe destacar que todas las mediciones realizadas a los participantes estuvieron dentro de los valores normales para un adulto sano. Las concentraciones de triglicéridos (TG) en sangre de todos los participantes se mantuvieron estables a lo largo del estudio, en ambas secuencias y sin variaciones significativas, tanto en la fase control como en la fase arbequina. Tampoco se encontraron



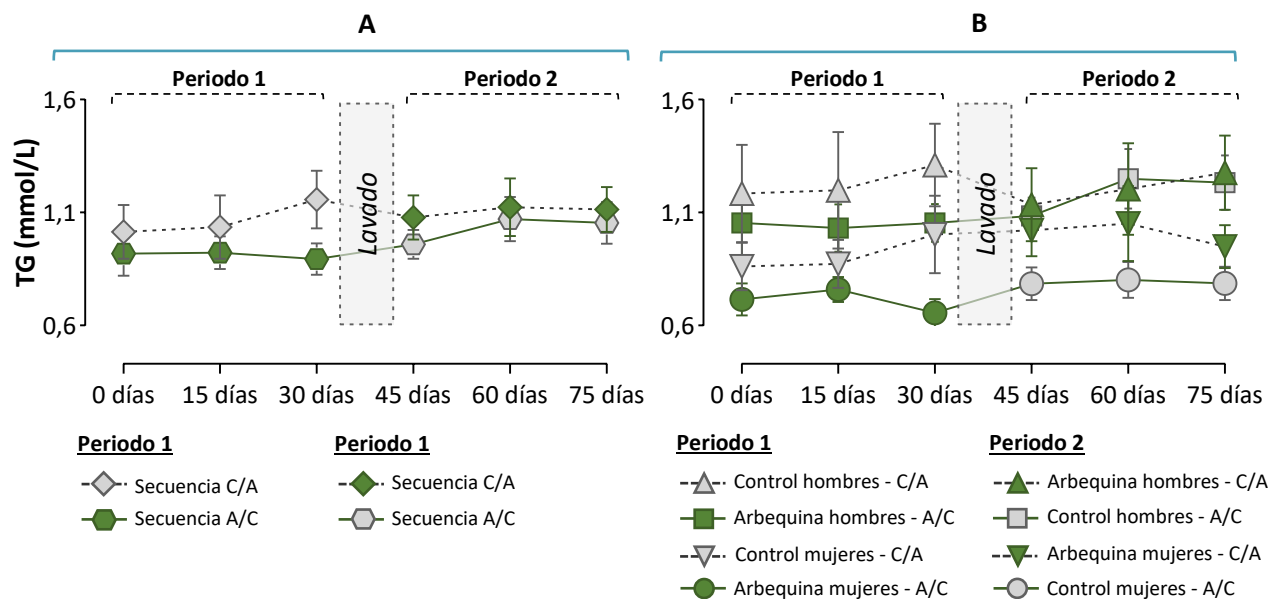
## Resultados

cambios significativos en ninguna de las fases, cuando se analizaron las variaciones de TG por secuencia y por sexo (Tabla 4.9 y Figura 4.21). Por otro lado, cuando se calculó el cambio en la concentración de TG de los 40 participantes, se observó que al final de la fase control presentaron un incremento de  $0,07 \pm 0,05$  mmol/L, mientras que al final de la fase arbequina el incremento fue de  $0,01 \pm 0,04$  mmol/L (Figura 4.23).

**Tabla 4.9.** Perfil lipídico de los participantes del estudio distribuidos por secuencia, periodo y sexo.

	Periodo 1				Periodo 2			
	0 días	15 días	30 días	<i>p</i>	45 días	60 días	75 días	<i>p</i>
<b>Control-Arbequina (C/A)</b>								
<b>TG (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	0,94 (0,75; 1,17)	0,91 (0,71; 1,15)	1,03 (0,82; 1,30)	0,222	1,00 (0,82; 1,21)	1,06 (0,84; 1,33)	1,03 (0,85; 1,25)	0,751
Hombres (n = 10)	1,08 (0,74; 1,59)	1,01 (0,66; 1,54)	1,21 (0,89; 1,64)	0,282	1,03 (0,74; 1,44)	1,17; (0,80; 1,71)	1,17 (0,85; 1,62)	0,266
Mujeres (n = 10)	0,81 (0,62; 1,05)	0,81 (0,60; 1,09)	0,88 (0,61; 1,29)	0,685	0,96 (0,74; 1,25)	0,95 (0,68; 1,32)	0,91 (0,71; 1,15)	0,727
<b>CT (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	4,83 ± 0,16	4,80 ± 0,16	4,80 ± 0,20	0,924	4,69 ± 0,15	4,61 ± 0,19	4,43 ± 0,14 <sup>#</sup>	0,010
Hombres (n = 10)	4,86 ± 0,24	4,89 ± 0,23	4,89 ± 0,31	0,984	4,89 ± 0,26	4,88 ± 0,32	4,60 ± 0,26	0,096
Mujeres (n = 10)	4,82 ± 0,22	4,72 ± 0,23	4,73 ± 0,26	0,727	4,53 ± 0,16	4,40 ± 0,21	4,29 ± 0,15	0,093
<b>LDL-c (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	2,90 ± 0,17	3,03 ± 0,17	2,98 ± 0,19	0,416	2,77 ± 0,16	2,68 ± 0,17	2,48 ± 0,14 <sup>#</sup>	0,001
Hombres (n = 10)	2,92 ± 0,24	3,27 ± 0,25	3,16 ± 0,29	0,092	3,07 ± 0,29	3,02 ± 0,30	2,70 ± 0,26 <sup>#</sup>	0,008
Mujeres (n = 10)	2,88 ± 0,24	2,80 ± 0,22	2,81 ± 0,25	0,690	2,54 ± 0,14	2,40 ± 0,16	2,31 ± 0,13	0,064
<b>HDL-c (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	1,35 ± 0,08	1,33 ± 0,07	1,29 ± 0,07	0,282	1,38 ± 0,08	1,38 ± 0,07	1,37 ± 0,08	0,889
Hombres (n = 10)	1,15 ± 0,09	1,15 ± 0,07	1,12 ± 0,09	0,864	1,24 ± 0,10	1,24 ± 0,08	1,19 ± 0,09	0,396
Mujeres (n = 10)	1,54 ± 0,08	1,51 ± 0,09	1,45 ± 0,09	0,212	1,52 ± 0,10	1,52 ± 0,11	1,54 ± 0,11	0,748
<b>VLDL-c (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	0,43 (0,34; 0,53)	0,42 (0,33; 0,53)	0,48 (0,38; 0,60)	0,164	0,46 (0,38; 0,56)	0,49 (0,39; 0,61)	0,47 (0,39; 0,57)	0,869
Hombres (n = 10)	0,49 (0,34; 0,72)	0,47 (0,31; 0,71)	0,56 (0,41; 0,76)	0,070	0,48 (0,35; 0,67)	0,54 (0,37; 0,79)	0,54 (0,39; 0,75)	0,795
Mujeres (n = 10)	0,37 (0,29; 0,48)	0,37 (0,28; 0,51)	0,41 (0,28; 0,59)	0,751	0,44 (0,34; 0,58)	0,44 (0,32; 0,61)	0,42 (0,33; 0,53)	0,690
<b>Arbequina-Control (A/C)</b>								
<b>TG (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	0,84 (0,69; 1,02)	0,88 (0,75; 1,02)	0,84 (0,71; 1,00)	0,728	0,95 (0,81; 1,12)	0,99 (0,83; 1,19)	0,99 (0,83; 1,17)	0,645
Hombres (n = 12)	0,95 (0,71; 1,29)	0,98 (0,79; 1,22)	1,02 (0,85; 1,22)	0,755	1,10 (0,90; 1,35)	1,17 (0,91; 1,50)	1,17 (0,95; 1,45)	0,641
Mujeres (n = 8)	0,69 (0,55; 0,87)	0,75 (0,62; 0,89)	0,64 (0,51; 0,80)	0,154	0,76 (0,60; 0,97)	0,78 (0,63; 0,96)	0,76 (0,61; 0,95)	0,930
<b>CT (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	4,51 ± 0,20	4,55 ± 0,21	4,40 ± 0,22	0,111	4,58 ± 0,19	4,65 ± 0,18*	4,67 ± 0,20	0,018
Hombres (n = 12)	4,55 ± 0,23	4,47 ± 0,22	4,40 ± 0,24	0,228	4,57 ± 0,18	4,77 ± 0,22*	4,62 ± 0,21	0,020
Mujeres (n = 8)	4,45 ± 0,37	4,67 ± 0,42	4,41 ± 0,41	0,064	4,58 ± 0,40	4,46 ± 0,30	4,75 ± 0,41	0,398
<b>LDL -c(mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	2,80 ± 0,19	2,84 ± 0,19	2,72 ± 0,19	0,806	2,84 ± 0,17	3,02 ± 0,16	2,88 ± 0,18	0,065
Hombres (n = 12)	2,89 ± 0,21	2,86 ± 0,21	2,84 ± 0,23	0,855	2,92 ± 0,18	3,19 ± 0,18*	2,92 ± 0,18*	0,037
Mujeres (n = 8)	2,68 ± 0,36	2,81 ± 0,38	2,53 ± 0,31	0,171	2,72 ± 0,35	2,77 ± 0,30	2,81 ± 0,37	0,617
<b>HDL-c (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	1,25 ± 0,06	1,25 ± 0,07	1,20 ± 0,07	0,136	1,27 ± 0,06	1,30 ± 0,06	1,32 ± 0,07	0,284
Hombres (n = 12)	1,14 ± 0,06	1,12 ± 0,06	1,09 ± 0,06	0,100	1,10 ± 0,06	1,12 ± 0,06	1,13 ± 0,07	0,063
Mujeres (n = 8)	1,42 ± 0,07	1,49 ± 0,08	1,41 ± 0,12	0,311	1,50 ± 0,07	1,50 ± 0,09	1,57 ± 0,10	0,473
<b>VLDL-c (mmol/L)</b>								
Todos (n = 20)	0,39 (0,32; 0,47)	0,40 (0,35; 0,47)	0,39 (0,33; 0,46)	0,475	0,45 (0,38; 0,53)	0,45 (0,37; 0,54)	0,46 (0,39; 0,55)	0,825
Hombres (n = 12)	0,44 (0,33; 0,59)	0,45 (0,36; 0,56)	0,48 (0,39; 0,56)	0,670	0,52 (0,43; 0,64)	0,52 (0,40; 0,68)	0,55 (0,44; 0,68)	0,798
Mujeres (n = 8)	0,32 (0,25; 0,40)	0,34 (0,29; 0,41)	0,29 (0,24; 0,37)	0,158	0,35 (0,27; 0,44)	0,36 (0,29; 0,44)	0,35 (0,28; 0,44)	0,910

Valores expresados como media ± SEM o media geométrica (IC 95%). TAG, triglicéridos; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL-c, colesterol de lipoproteínas de baja densidad; VLDL-c, colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad. En cada periodo se empleó ANOVA para medidas repetidas con prueba post-hoc de Bonferroni. \**p* < 0,05 cuando se compara con la evaluación anterior; <sup>#</sup>*p* < 0,05 cuando se compara con la medición al inicio del periodo.

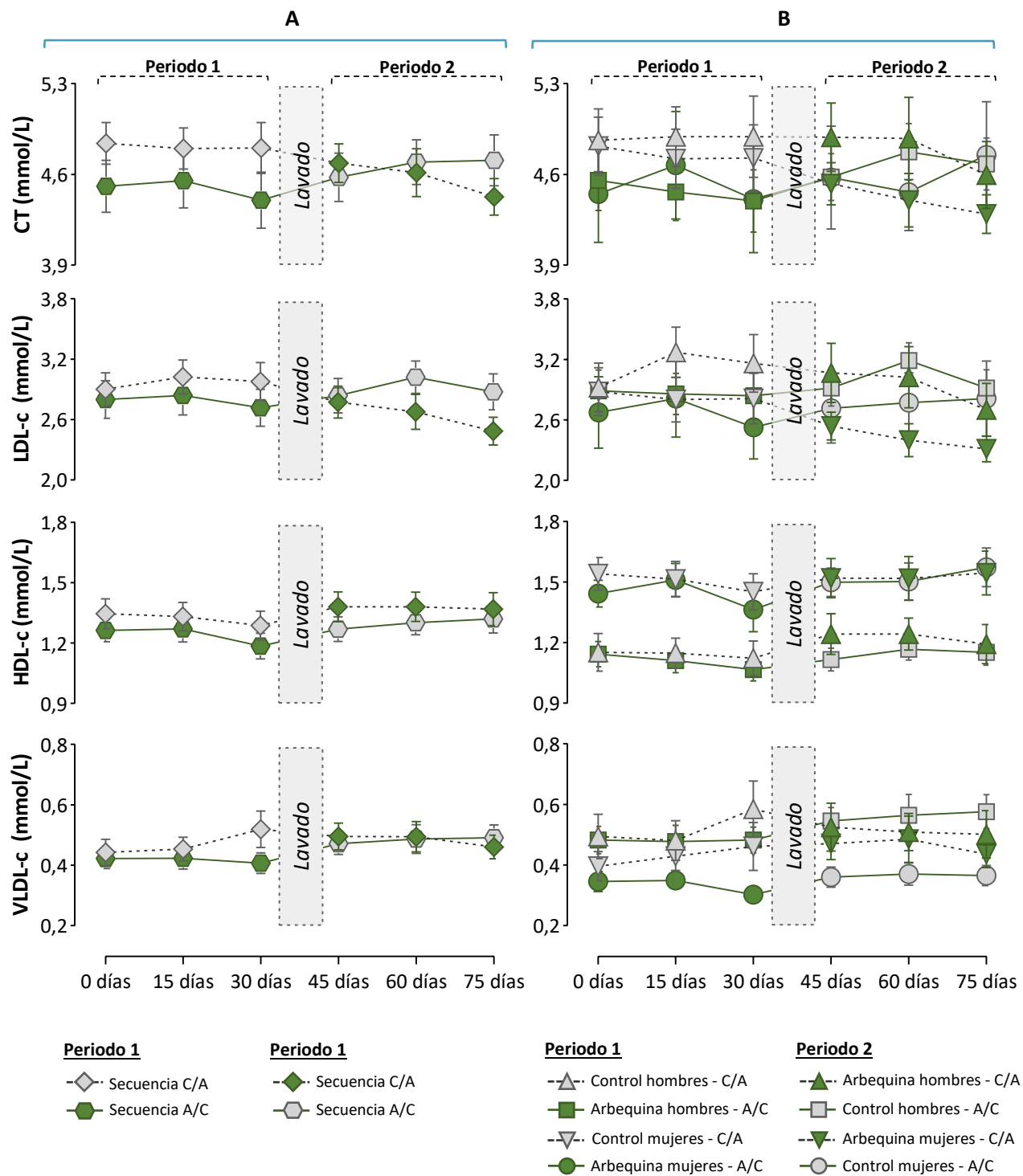


**Figura 4.21.** Concentración plasmática de triglicéridos (TG) durante las fases del estudio. (A) Concentración de TG por secuencia de aleatorización distribuidos por sexo. (B) Concentración de TG por secuencia de aleatorización. C/A, secuencia Control – Arbequina; A/C, secuencia Arbequina – Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM.

Respecto al colesterol total (CT), se encontró que en los participantes de la secuencia C/A ( $n = 20$ ) el CT se redujo significativamente después de 30 días de consumo regular de aceitunas arbequina (periodo 2). Cuando se realizó el análisis en cada fase según el sexo, no se hallaron variaciones significativas en hombres o mujeres durante la fase control; mientras que, durante la fase arbequina se identificó una tendencia decreciente ( $p > 0,05$ ) en las concentraciones de CT en sangre (Tabla 4.9 y Figura 4.22).

En los participantes de la secuencia A/C ( $n = 20$ ), durante la fase arbequina (periodo 1) también se halló una reducción del CT, aunque no significativa. Durante la fase control se observó que el CT se incrementó significativamente a los 15 días; y a pesar de que a los 30 días la concentración de CT también fue mayor respecto a las mediciones iniciales, esta diferencia no fue estadísticamente relevante. En los participantes hombres aleatorizados en la secuencia A/C ( $n = 12$ ), también se observó un incremento de CT en la medición realizada a los 15 días de la fase control; mientras que en las mujeres ( $n = 8$ ), a pesar de la tendencia decreciente del CT en la fase arbequina, las variaciones encontradas no tuvieron significancia estadística (Tabla 4.9 y Figura 4.22).

Cuando se calculó el cambio en la concentración de CT de todos los participantes ( $n = 40$ ) al final de cada fase, se identificó un incremento de  $0,05 \pm 0,06$  mmol/L en la fase control y una disminución de  $0,17 \pm 0,05$  mmol/L en la fase arbequina, en comparación a sus respectivas mediciones iniciales (Figura 4.23).

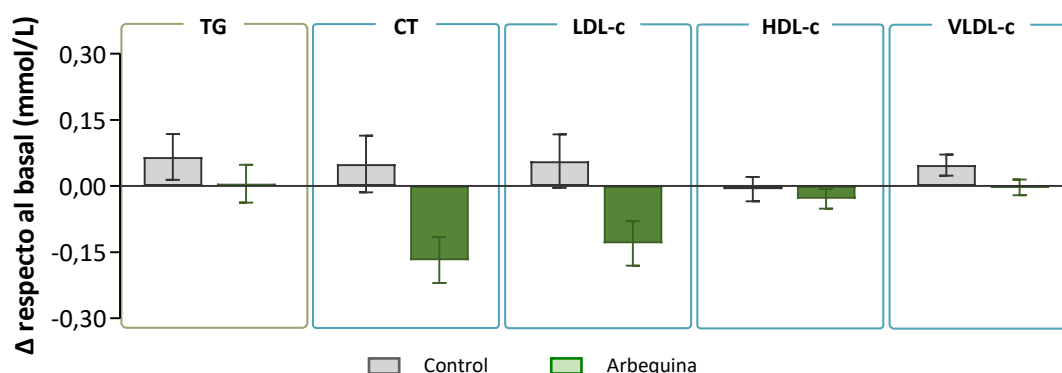


**Figura 4.22.** Concentraciones de colesterol en sangre durante las fases del estudio. (A) Colesterol en sangre por secuencia de aleatorización distribuidos por sexo. (B) Colesterol en sangre por secuencia de aleatorización. C/A, secuencia Control – Arbequina; A/C, secuencia Arbequina – Control. TG, triglicéridos; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL-c, colesterol de lipoproteínas de baja densidad; VLDL-c, colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM.

Por otro lado, los resultados de las concentraciones de colesterol LDL (LDL-c) en los participantes de la secuencia C/A ( $n = 20$ ) indicaron que el consumo de aceitunas durante 30 días (periodo 2) promovió una reducción significativa de LDL-c, en comparación con la medición basal. El análisis realizado por sexo demostró que en los hombres de esta secuencia ( $n = 10$ ), el LDL-c también se redujo de forma significativa al final de la fase arbequina, mientras que en las mujeres ( $n = 10$ ) solo se identificó una tendencia decreciente de LDL-c ( $p = 0,064$ ) durante la fase en la que consumieron aceitunas arbequina.

En los participantes de la secuencia A/C ( $n = 20$ ), los resultados de LDL-c en sangre se mantuvieron estables y la comparación de las mediciones inicial, a los 15 y 30 días de cada periodo, no mostró diferencias significativas. Cuando se analizaron las variaciones de LDL-c por sexo se encontró que los hombres durante la fase arbequina presentaron un incremento significativo, el cual volvió a las concentraciones iniciales a los 30 días. En las mujeres de la secuencia A/C, las variaciones de LDL-c a lo largo del estudio no fueron significativas (Tabla 4.9 y Figura 4.22).

El cálculo del cambio en la concentración de LDL-c de los 40 participantes al final de la fase control identificó un incremento de  $0,06 \pm 0,06$  mmol/L, respecto a su medición basal. Mientras que, el cambio en la concentración de LDL-c al final de la fase arbequina fue una reducción de  $0,13 \pm 0,05$  mmol/L (Figura 4.23).



**Figura 4.23.** Cambios en el perfil lipídico al final de cada fase respecto al inicial de los participantes. TG, triglicéridos; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL-c, colesterol de lipoproteínas de baja densidad; VLDL-c, colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de la diferencia de la medición final menos la medición inicial.

En cuanto a las concentraciones de colesterol HDL (HDL-c) en sangre, los participantes asignados a las secuencias C/A y A/C no presentaron variaciones significativas, tanto en la fase control como en la fase arbequina. El análisis realizado por sexo tampoco reveló diferencias significativas entre las mediciones de HDL-c dentro de cada fase del estudio, en ninguna de las secuencias (Tabla 4.9 y Figura 4.22).

## Resultados

El cambio al final de la fase control respecto a su valor inicial fue una reducción de  $0,01 \pm 0,03$  mmol/L de HDL-c; un cambio similar se detectó al final de la fase arbequina, donde la reducción de HDL-c fue de  $0,03 \pm 0,02$  mmol/L (Figura 4.23).

Respecto al colesterol asociado a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c), el análisis de las variaciones dentro de cada fase del estudio no mostró diferencias significativas en ninguna de las secuencias de aleatorización. Tampoco se encontraron variaciones significativas cuando se realizó el análisis según el sexo de los participantes (Tabla 4.9 y Figura 4.22). Cuando se calculó el cambio en las concentraciones de VLDL-c de los 40 participantes al final cada fase del estudio, se halló un incremento de  $0,05 \pm 0,02$  mmol/L al final de la fase control, mientras que al final de la fase arbequina la concentración de VLDL-c fue similar a la medición inicial (Figura 4.23).

### 4.3.2.4. Efecto del consumo de aceitunas sobre la peroxidación lipídica de adultos sanos

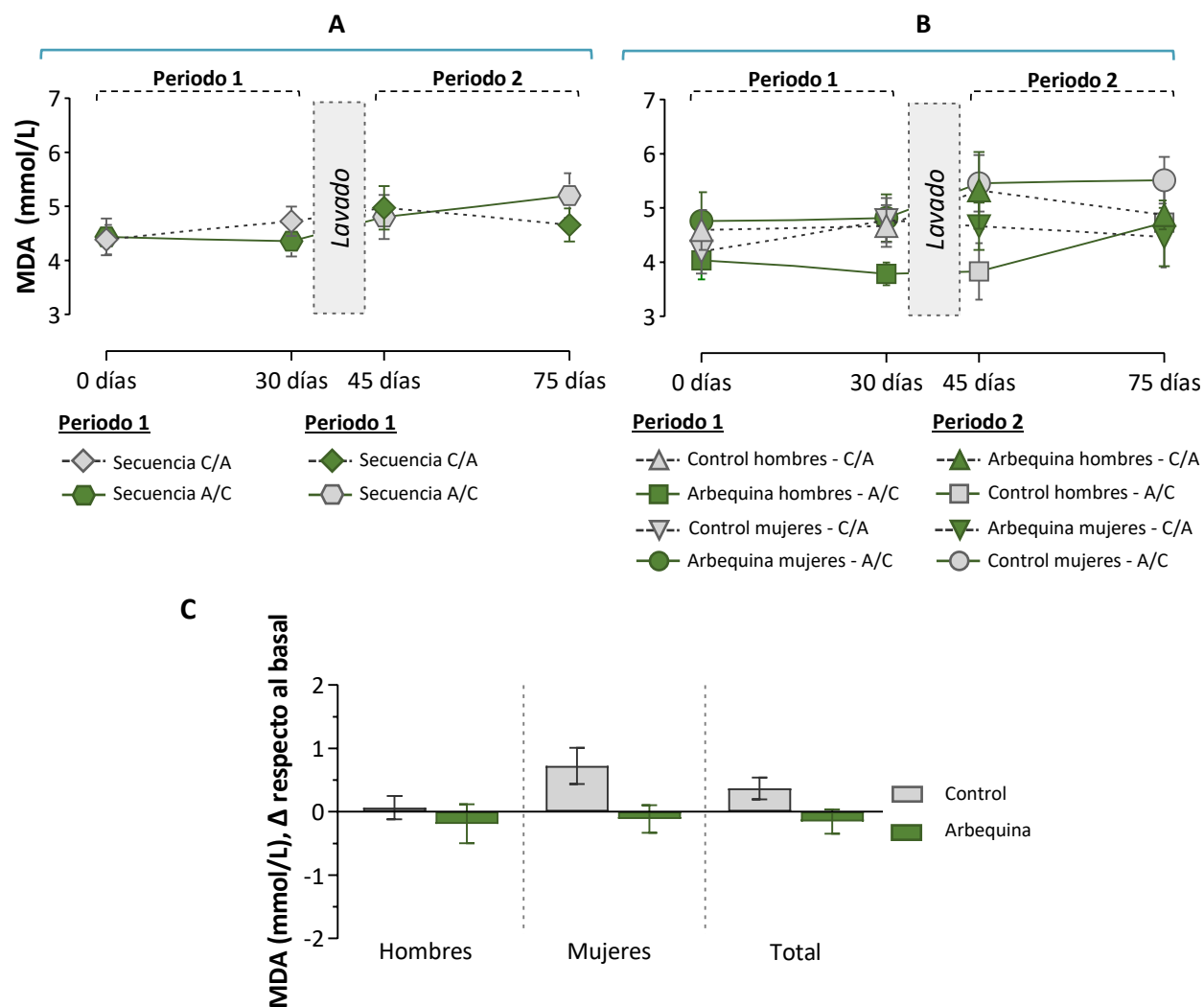
Se analizaron las variaciones en la concentración plasmática de malondialdehído de los participantes asignados a las secuencias C/A y A/C. Los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguna de las fases del estudio (Tabla 4.10 y Figura 4.24A). El posterior análisis considerando la distribución por sexo, tampoco encontró diferencias dentro de cada fase del estudio. Solo en las mujeres de la secuencia A/C se determinó un incremento no significativo de MDA durante la fase control (Figura 4.24B).

El cálculo del cambio en la concentración de MDA de los 40 participantes al final de la fase control permitió identificar un aumento de  $0,37 \pm 0,17$  mmol/L, mientras que al final de la fase arbequina se encontró una reducción de  $0,15 \pm 0,19$  mmol/L (Figura 4.24).

**Tabla 4.10.** Concentraciones plasmáticas de malondialdehído de los participantes del estudio distribuidos por secuencia, periodo y sexo.

	Periodo 1			Periodo 2		
	0 días	30 días	<i>p</i>	45 días	75 días	<i>p</i>
<b>Control-Arbequina (C/A)</b>						
<b>MDA (mmol/L)</b>						
Todos (n = 20)	4,28 (3,81; 4,96)	4,17 (4,15; 5,31)	0,384	4,69 (4,13; 5,83)	4,70 (4,01; 5,30)	0,365
Hombres (n = 10)	4,58 (3,74; 5,45)	4,61 (3,77; 5,57)	0,689	4,78 (3,89; 5,47)	4,80 (4,10; 5,50)	0,618
Mujeres (n = 10)	4,03 (3,26; 5,13)	4,06 (3,85; 5,71)	0,313	4,48 (3,67; 5,65)	4,67 (3,24; 5,69)	0,617
<b>Arbequina-Control (A/C)</b>						
<b>MDA (mmol/L)</b>						
Todos (n = 20)	4,45 (3,95; 5,67)	4,99 (4,33; 6,07)	0,132	4,06 (3,72; 5,16)	4,30 (3,76; 4,95)	0,614
Hombres (n = 12)	4,27 (3,55; 5,98)	4,67 (3,83; 5,80)	0,812	5,18 (4,30; 6,60)	5,28 (4,56; 6,47)	0,854
Mujeres (n = 8)	4,01 (3,20; 4,87)	3,67 (3,28; 4,29)	0,337	3,57 (2,59; 5,07)	4,09 (2,78; 6,69)	0,054

Valores expresados como media geométrica (IC 95%). MDA, malondialdehído. En cada periodo se empleó ANOVA para medidas repetidas con prueba post-hoc de Bonferroni



**Figura 4.24.** Concentración plasmática de malondialdehído (MDA) durante las fases del estudio. (A) Concentración de MDA por secuencia de aleatorización. (B) Concentración de MDA por secuencia de aleatorización y distribuidos por sexo. (C) Cambios en la concentración de MDA por sexo y total de participantes. C/A, secuencia Control – Arbequina; A/C, secuencia Arbequina – Control.

#### 4.3.2.5. Determinación del efecto de la intervención nutricional sobre las principales medidas de resultado

Después de los análisis exploratorios de las variables del estudio, realizados dentro de cada fase y según el sexo de los participantes, se realizó el análisis del efecto de la intervención nutricional con aceitunas sobre el peso corporal, la presión arterial, el perfil lipídico y la concentración de MDA en plasma (Tabla 4.11), mediante un modelo lineal de efectos mixtos (SAS v 9.4). Debido a que en los resultados de los análisis exploratorios realizados para cada una de estas variables (Tablas 4.7 – 4.10), dentro de cada secuencia y fase, mostraron que la respuesta a la intervención podría ser diferente para hombres y mujeres, se incluyó el sexo como efecto fijo y se analizó la interacción tratamiento \* sexo.

## Resultados

---

Además, para todas las variables se analizaron los efectos de arrastre, periodo y secuencia. En ninguno de los casos se encontró un efecto significativo.

La intervención nutricional con 60 aceitunas arbequina durante 30 días no tuvo un efecto significativo sobre el peso corporal de los participantes del estudio (Tabla 4.11). Tanto al final de la fase control, como al final de la fase arbequina, los participantes presentaron un peso corporal medio similar (aproximadamente 75 kg). La inclusión del sexo dentro del modelo fue significativa ( $p = 0,006$ ); no obstante, los resultados del efecto de la interacción tratamiento \* sexo no evidenciaron un efecto diferente relacionado con el sexo de los participantes.

El efecto del consumo diario de aceitunas sobre la PAS y PAD de los participantes no fue significativo (Tabla 4.11). La inclusión del sexo como factor fijo en los correspondientes modelos, evidenció que la PAS y PAD de hombres y mujeres son significativamente diferentes. Sin embargo, la interacción tratamiento \* sexo no fue significativa.

A continuación, se analizó el efecto del consumo regular de aceitunas durante 30 días sobre el perfil lipídico de los participantes del estudio.

Los resultados mostraron que el consumo diario de aceitunas arbequina durante 30 días evitó el incremento de TG en sangre. En la Tabla 4.11 se puede observar que la concentración de TG al final de la fase control fue de 1,01 IC95%(0,88 ; 1,16) mmol/L, mientras que al final de la fase arbequina la concentración de TG fue de 0,93 IC95%(0,82 ; 1,06) mmol/L, siendo la diferencia de mínimos cuadrados (DMMC) entre las intervenciones de 0,12 IC95%(0,01 ; 0,22) mmol/L ( $p = 0,034$ ).

Además, el análisis demostró que el consumo de aceitunas reduce el colesterol total después de 30 días. Se encontró que la concentración media de CT en sangre, al final de la fase control fue  $4,75 \pm 0,13$  mmol/L, lo cual fue mayor a lo determinado al final de la fase arbequina ( $4,44 \pm 0,12$  mmol/L). Esto representó una DMMC de 0,31 IC95%(0,17 ; 0,45) mmol/L de CT (Tabla 4.11).

Por otro lado, el consumo diario de aceitunas durante 30 días redujo significativamente la concentración de LDL-c en sangre (Tabla 4.11). La concentración media de LDL-c después de 30 días en la fase control fue de  $2,93 \pm 0,13$  mmol/L; mientras que después de 30 días en la fase arbequina, la concentración media de LDL-c fue de  $2,68 \pm 0,11$  mmol/L. La DMMC entre los cambios encontrados en la fase control y la fase arbequina fue de 0,25 IC95%(0,14 ; 0,36) mmol/L de LDL-c.

El consumo de aceitunas no tuvo un efecto significativo sobre el HDL-c en sangre, las concentraciones halladas al final de la fase control y arbequina fueron  $1,30 \pm 0,05$  mmol/L y  $1,28 \pm 0,05$  mmol/L, respectivamente (Tabla 4.11).

**Tabla 4.11.** Diferencia desde el inicio de las fases control, arbequina y efecto del consumo de arbequinas sobre el peso corporal, la presión arterial, el perfil lipídico y la concentración de MDA en adultos sanos.

	Control		Diferencia dentro de la fase control	Arbequina		Diferencia dentro de la fase arbequina	Diferencia entre las fases	Valor <i>p</i> entre fases
	inicial	final		inicial	final			
Peso corporal (kg)	75,20 ± 2,14	75,05 ± 2,25	-0,15 (-0,75 ; 0,46)	75,21 ± 2,29	75,10 ± 2,30	-0,13 (-0,45 ; 0,20)	-0,04 (-0,76 ; 0,69)	0,923
<b>Presión arterial</b>								
PAS (mmHg)	116,13 ± 1,69	118,68 ± 1,68	2,55 (-0,05 ; 5,15)	117,08 ± 1,77	117,35 ± 1,89	0,28 (-2,56 ; 3,11)	1,33 (-1,83 ; 4,48)	0,400
PAD (mmHg)	64,20 ± 1,51	66,03 ± 1,49	1,83 (-0,32 ; 3,97)	63,15 ± 1,32	64,67 ± 1,39	1,52 (-0,10 ; 3,14)	1,35 (-1,02 ; 3,73)	0,257
<b>Perfil lipídico</b>								
TG (mmol/L)	0,94 (0,83 ; 1,08)	1,01 (0,88 ; 1,16)	0,10 (-0,03 ; 0,23)	0,91 (0,80 ; 1,05)	0,93 (0,82 ; 1,06)	0,03 (-0,10 ; 0,16)	0,12 (0,01 ; 0,22)	0,034
CT (mmol/L)	4,71 ± 0,12	4,75 ± 0,13	0,04 (-0,08 ; 0,17)	4,61 ± 0,12	4,44 ± 0,12	-0,17 (-0,28 ; -0,07)*	0,31 (0,17 ; 0,45)	< 0,0001
LDL-c (mmol/L)	2,87 ± 0,12	2,93 ± 0,13	0,05 (-0,07 ; 0,18)	2,81 ± 0,11	2,68 ± 0,11	-0,13 (-0,23 ; -0,03) *	0,25 (0,14 ; 0,36)	0,009
HDL-c (mmol/L)	1,31 ± 0,05	1,30 ± 0,05	-0,004 (-0,06 ; 0,05)	1,32 ± 0,05	1,28 ± 0,05	-0,05 (-0,09 ; 0,001)	0,02 (-0,02 ; 0,07)	0,302
VLDL-c (mmol/L)	0,44 (0,38 ; 0,50)	0,47 (0,41 ; 0,54)	0,10 (-0,03 ; 0,22)	0,42 (0,37 ; 0,48)	0,43 (0,38 ; 0,59)	0,02 (-0,10 ; 0,15)	0,13 (0,02 ; 0,23)	0,021
<b>Peroxidación lipídica</b>								
MDA (mmol/L)	4,37 (3,94 ; 4,85)	4,75 (4,31 ; 5,24)	0,12 (-0,01 ; -0,23)*	4,48 (4,03 ; 4,99)	4,35 (3,97 ; 4,77)	-0,04 (-0,15 ; 0,06)	0,14 (0,01 ; 0,28)	0,042

Los valores de todos los participantes (n = 40) al inicio y final en cada fase son expresados como media ± SEM o media geométrica (IC 95%). Las diferencias son la estimación de la diferencia de la media de mínimos cuadrados (IC 95%). TG, triglicéridos; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL-c, colesterol de lipoproteínas de baja densidad; VLDL-c, colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; MDA, malondialdehído. El análisis utilizado para determinar el efecto de la intervención nutricional con aceitunas arbequina fue el procedimiento mixto (SAS v 9.4) con el método de estimación de máxima verosimilitud restringida (REML). \**p* < 0,05.



## Resultados

---

Con relación al efecto de la intervención nutricional sobre la concentración de VLDL-c, los resultados mostraron que el consumo de aceitunas arbequina durante 30 días evitó su incremento en sangre. La concentración de VLDL-c al final de la fase control fue de 0,47 IC95%(0,41 ; 0,54) mmol/L, mientras que al final de la fase arbequina la concentración de VLDL-c fue de 0,43 IC95%(0,38 ; 0,59). La DMMC entre los efectos entre las fases control y arbequina fue de 0,13 IC95%(0,02 ; 0,23) mmol/L (Tabla 4.11).

La inclusión del sexo como factor fijo en los modelos de las variables del perfil lipídico reveló diferencias significativas entre hombres y mujeres para las concentraciones de TG ( $p = 0,002$ ), HDL-c ( $p < 0,001$ ) y VLDL-c ( $p = 0,002$ ) en sangre. Sin embargo, el análisis del efecto de la interacción tratamiento \* sexo no evidenció una respuesta diferente a la intervención entre hombres y mujeres.

Por otra parte, se observó que el consumo diario de aceitunas durante 30 días previene el incremento de la concentración plasmática de MDA en adultos sanos. Al final de la fase control, los 40 participantes presentaron una concentración de 4,75 IC95%(4,31 ; 5,24) mmol/L de MDA, la cual fue superior a la determinada al final de la fase arbequina (4,35 IC95%(3,97 ; 4,77) mmol/L). La DMMC entre los efectos de cada fase fue de 0,14 IC95%(0,01 ; 0,23) mmol/L (Tabla 4.11). En este modelo también se incluyó el sexo como factor fijo, el resultado obtenido mostró que las concentraciones de MDA en sangre son diferentes entre hombres y mujeres. A pesar de esta diferencia, la interacción tratamiento \* sexo no evidenció una respuesta diferente al tratamiento entre hombres y mujeres.

### 4.3.3. Efecto del consumo de aceitunas sobre la hematología y la bioquímica clínica de adultos sanos

Debido a que la ingesta de 60 aceitunas implica una cantidad superior a la consumida usualmente, se incluyeron en el estudio pruebas hematológicas y de variables bioquímicas para evaluar la tolerancia al producto de la intervención y controlar la seguridad de los participantes durante el estudio. En la Tabla 4.12 se muestran los resultados de las diferencias entre las mediciones iniciales y finales, así como el efecto de la intervención sobre las variables hematológicas y bioquímicas.

Las mediciones de las variables hematológicas de todos los participantes se mantuvieron estables y dentro del rango normal durante todo el estudio. Tanto al final de la fase control como de la fase arbequina, no se encontraron cambios significativos respecto a sus mediciones iniciales.

**Tabla 4.12.** Diferencia desde el inicio de las fases control, arbequina y efecto del consumo de arbequinas sobre las variables hematológicas y bioquímicas en adultos sanos.

	Control		Diferencia dentro de la fase control	Arbequina		Diferencia dentro de la fase arbequina	Diferencia entre las fases	Valor <i>p</i> entre fases
	inicial	final		inicial	final			
<b>Hematología</b>								
Eritrocitos (x 10 <sup>12</sup> /L)	4,82 ± 0,13	4,86 ± 0,12	0,04 (-0,04 ; 0,12)	4,56 ± 0,11	4,55 ± 0,10	-0,01 (-0,11 ; 0,09)	0,31 (-0,01 ; 0,62)	0,059
Hemoglobina (g/L)	139,75 ± 4,03	140,55 ± 3,34	0,80 (-1,63 ; 3,23)	136,15 ± 3,23	135,00 ± 3,34	-1,15 (-3,29 ; 0,99)	5,55 (-4,01 ; 15,11)	0,247
Hematocrito (L/L)	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,041	0,001 (-0,008 ; 0,007)	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,003 (-0,012 ; 0,007)	0,02 (-0,01 ; 0,04)	0,179
VCM (fL)	86,04 ± 1,09	85,62 ± 1,05	-0,42 (-0,93 ; 0,08)	88,04 ± 0,73	87,54 ± 3,43	-0,51 (-1,27 ; 0,26)	-1,92 (-4,50 ; 0,67)	0,141
CCMH (g/L)	334,82 ± 2,81	337,69 ± 2,88	2,87 (-2,09 ; 7,84)	339,55 ± 2,66	338,95 ± 2,68	-0,60 (-5,33 ; 4,13)	-1,27 (-9,21 ; 6,70)	0,751
HCM (pg)	29,01 ± 0,40	29,00 ± 0,41	-0,01 (-0,34 ; 0,32)	29,92 ± 0,41	29,67 ± 0,38	-0,25 (-0,61 ; 0,11)	-0,67 (-1,80 ; 0,47)	0,243
RDW (%)	12,89 (12,61 ; 13,19)	12,98 (12,67 ; 13,30)	0,01 (-0,003 ; 0,02)	12,86 (12,61 ; 13,12)	12,88 (12,59 ; 13,18)	0,002 (-0,02 ; 0,03)	0,01 (-0,04 ; 0,06)	0,629
Leucocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	7,02 ± 0,29	6,64 ± 0,17	-0,38 (-0,93 ; 0,16)	6,84 ± 0,27	6,68 ± 0,24	-0,24 (-0,50 ; 0,02)	-0,04 (-0,62 ; 0,54)	0,894
Neutrófilos (x 10 <sup>9</sup> /L)	3,81 ± 0,19	3,51 ± 0,14	-0,30 (-0,74 ; 0,15)	4,04 ± 0,29	3,75 ± 0,19	-0,28 (-0,59 ; 0,03)	-0,24 (-0,71 ; 0,22)	0,297
Eosinófilos (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,20 (0,16 ; 0,25)	0,20 (0,16 ; 0,26)	0,02 (-0,25 ; 0,30)	0,19 (0,14 ; 0,25)	0,15 (0,11 ; 0,21)	-0,30 (-0,65 ; 0,05)	0,41 (-0,16 ; 0,97)	0,152
Basófilos (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,047 (0,038 ; 0,058)	0,046 (0,037 ; 0,058)	-0,02 (-0,30 ; 0,27)	0,047 (0,039 ; 0,056)	0,045 (0,036 ; 0,056)	-0,06 (-0,34 ; 0,23)	0,04 (-0,40 ; 0,48)	0,841
Monocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,55 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,02 (-0,03 ; 0,06)	0,55 ± 0,03	0,55 ± 0,03	-0,01 (-0,06 ; 0,05)	0,03 (-0,07 ; 0,12)	0,580
Linfocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	2,31 ± 0,11	2,14 ± 0,12	-0,18 (-0,36 ; 0,004)	2,09 ± 0,11	2,01 ± 0,11	-0,14 (-0,30 ; 0,02)	0,13 (-0,19 ; 0,44)	0,430
Plaquetas (x 10 <sup>9</sup> /L)	228,4 (205,8 ; 253,4)	232,8 (209,0 ; 259,3)	0,03 (-0,04 ; 0,09)	245,0 (227,0 ; 264,4)	243,4 (226,1 ; 262,1)	-0,01 (-0,06 ; 0,04)	-0,07 (-0,25 ; 0,12)	0,477
VPM (fL)	9,00 (8,65 ; 9,36)	8,88 (8,58 ; 9,21)	-0,02 (-0,04 ; 0,001)	8,41 (8,03 ; 8,80)	8,51 (8,12 ; 8,93)	0,02 (-0,01 ; 0,04)	0,06 (-0,02 ; 0,14)	0,139
<b>Marcadores bioquímicos</b>								
Glucosa (mmol/L)	4,70 ± 0,11	4,61 ± 0,08	-0,09 (-0,26 ; 0,09)	4,69 ± 0,12	4,45 ± 0,14	-0,23 (-0,40 ; -0,06)*	0,16 (-0,16 ; 0,48)	0,314
Sodio (mmol/L)	139,6 (138,7 ; 140,6)	138,8 (138,1 ; 139,5)	-0,009 (-0,018 ; 0,0001)	139,1 (138,1 ; 140,1)	138,3 (137,6 ; 139,1)	-0,008 (-0,016 ; 0,0002)	0,01 (-0,01 ; 0,02)	0,372
Ácido Úrico (μmol/L)	275,4 (255,4 ; 297,0)	284,5 (260,6 ; 310,5)	0,05 (-0,03 ; 0,12)	269,4 (247,0 ; 293,9)	283,5 (260,4 ; 308,6)	0,07 (0,01 ; 0,14)*	0,01 (-0,05 ; 0,06)	0,864
Urea (mmol/L)	5,30 ± 0,23	5,26 ± 0,29	-0,05 (-0,60 ; 0,51)	5,10 ± 0,22	4,99 ± 0,28	-0,11 (-0,45 ; 0,23)	0,27 (-0,54 ; 1,07)	0,510
Creatinina (μmol/L)	70,55 (65,10 ; 76,46)	71,84 (65,82 ; 78,41)	0,03 (-0,02 ; 0,07)	66,70 (62,28 ; 71,44)	66,29 (62,51 ; 70,30)	-0,01 (-0,05 ; 0,04)	0,12 (-0,03 ; 0,26)	0,119
AST (U/L)	17,09 (15,49 ; 18,85)	18,24 (16,49 ; 20,18)	0,09 (-0,02 ; 0,20)	16,22 (14,41 ; 18,25)	17,12 (14,86 ; 19,73)	0,08 (-0,06 ; 0,22)	0,09 (-0,15 ; 0,33)	0,453
ALT (U/L)	19,14 (14,82 ; 24,73)	17,61 (13,89 ; 22,33)	-0,12 (-0,37 ; 0,13)	15,98 (12,94 ; 19,72)	16,03 (12,55 ; 20,48)	0,01 (-0,21 ; 0,22)	0,14 (-0,34 ; 0,61)	0,567
Fosfatasa alcalina (U/L)	65,16 ± 3,81	65,56 ± 3,80	0,40 (-1,94 ; 2,74)	64,87 ± 3,68	69,05 ± 4,32	4,18 (-0,06 ; 8,43)	-3,49 (-15,13 ; 8,15)	0,547
Proteínas totales (g/L)	69,03 ± 0,53	69,79 ± 0,59	0,76 (-0,04 ; 1,56)	68,82 ± 0,87	69,11 ± 0,74	0,29 (-1,11 ; 1,69)	0,68 (-1,24 ; 2,60)	0,478

Los valores de todos los participantes (n = 40) al inicio y final en cada fase son expresados como media ± SEM o media geométrica (IC 95%). Las diferencias son la estimación de la diferencia de la media de mínimos cuadrados (IC 95%). VCM, volumen corpuscular medio; CCMH, concentración de hemoglobina corpuscular media; HCM; hemoglobina corpuscular media; RDW, amplitud de distribución eritrocitaria; VPM, volumen plaquetario medio; AST, aspartato transaminasa; ALT, alanina transaminasa. El análisis utilizado para determinar el efecto de la intervención nutricional con aceitunas arbequina fue el procedimiento mixto (SAS v 9.4) con el método de estimación de máxima verosimilitud restringida (REML). \**p* < 0,05.

## Resultados

---

Respecto a las variables bioquímicas estudiadas, todas las mediciones realizadas a lo largo del estudio se mantuvieron dentro los valores normales. La glucosa no presentó cambios significativos al final de la fase control, mientras que al final de la fase arbequina se observó una reducción significativa del 5,1% comparado con la medición inicial (Tabla 4.12). A pesar de estas diferencias, la intervención con aceitunas no tuvo un efecto significativo del consumo de aceitunas sobre la concentración de glucosa en sangre.

También, se estudiaron las concentraciones de sodio, ácido úrico, urea y creatinina en sangre, como indicadores de la función renal. Los resultados no mostraron cambios significativos en las concentraciones de sodio, urea y creatinina al final de la fase control, ni al final de la fase arbequina. Por otro lado, la concentración de ácido úrico indicó un incremento significativo del 5% respecto a la concentración inicial en la fase arbequina. Sin embargo, la comparación entre fases no evidenció un efecto significativo del consumo de aceitunas sobre este marcador.

Para estudiar el efecto de la intervención nutricional sobre la función hepática se evaluaron durante el estudio las concentraciones de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina y las proteínas totales en sangre. El análisis de las concentraciones iniciales y finales no reveló un cambio significativo en ninguna de las fases para estas variables.

### 4.3.4. Parámetros de adherencia a la intervención

La adherencia a la intervención se confirmó mediante la determinación de polifenoles en muestras de orina como marcadores de ingesta de aceituna. Los resultados mostraron que las concentraciones urinarias de ácido *o*-cumárico, hidroxitirosol, hidroxitirosol sulfato, hidroxitirosol glucorónido, hidroxitirosol acetato, tirosol sulfato, salidroside, salidroside sulfato, salidroside glucorónido, luteolina, luteolina sulfato y luteolina glucorónido, aumentaron significativamente después del consumo diario de 60 aceitunas arbequina en comparación con los valores determinados al final de la fase control.

Los polifenoles con un mayor incremento después de la fase arbequina fueron los metabolitos del hidroxitirosol, seguidos por el tirosol sulfato y el hidroxitirosol acetato. Mientras que, las concentraciones de apigenina, rutina, oleuropeína y verbascósido estuvieron por debajo del límite de cuantificación (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Concentraciones urinarias de polifenoles al final de cada fase del estudio.

Polifenol	Control (nM)	Arbequina (nM)	<i>p</i>
Ácido vanílico	912,72 ± 151,09	1139,42 ± 313,02	0,446
Ácido vanílico sulfato	7492,25 ± 1509,76	6858,36 ± 1341,99	0,983
Ácido <i>o</i> -cumárico	28,8 ± 6,1	102,6 ± 25,6	0,021
Ácido <i>o</i> -cumárico sulfato	178,6 ± 37,7	509,1 ± 99,1	0,015
Ácido <i>o</i> -cumárico glucorónido	92,9 ± 31,8	270,0 ± 62,4	0,027
Ácido <i>p</i> -cumárico	259,4 ± 46,7	501,4 ± 181,9	0,262
Ácido <i>p</i> -cumárico sulfato	4214,3 ± 597,2	9427,6 ± 1933,6	0,047
Ácido <i>p</i> -cumárico glucorónido	435,6 ± 94,7	730,0 ± 165,4	0,241
Ácido cafeico	194,1 ± 46,2	449,6 ± 164,4	0,156
Ácido cafeico sulfato	356,0 ± 182,1	862,4 ± 240,9	0,084
Hidroxitirosol	21,6 ± 4,1	55,6 ± 13,6	0,064
Hidroxitirosol sulfato	154,7 ± 29,6	2957,9 ± 699,7	0,004
Hidroxitirosol glucorónido	160,9 ± 28,5	2347,7 ± 417,4	0,000
Hidroxitirosol-acetato	59,0 ± 7,6	115,8 ± 18,9	0,016
Hidroxitirosol-acetato sulfato	79,9 ± 10,7	129,0 ± 24,5	0,084
Hidroxitirosol-acetato glucorónido	48,3 ± 11,8	132,2 ± 55,9	0,202
Tirosol	33,9 ± 7,7	39,3 ± 5,89	0,527
Tirosol sulfato	260,0 ± 80,0	678,3 ± 113,1	0,030
Salidroside	7,1 ± 2,0	24,2 ± 5,0	0,012
Salidroside sulfato	3,2 ± 1,1	11,2 ± 2,6	0,219
Salidroside glucorónido	4,6 ± 1,5	16,7 ± 5,1	0,323
Luteolina	11,3 ± 0,6	19,1 ± 3,0	0,018
Luteolina sulfato	71,2 ± 9,9	175,0 ± 36,7	0,006
Luteolina glucorónido	12,9 ± 4,5	45,9 ± 13,9	0,027
Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	-	-	-
Apigenina	31,8 ± 8,7	17,2 ± 0,5	0,296
Apigenina sulfato	27,1 ± 4,6	102,1 ± 48,9	0,292
Quercetina	17,8 ± 0,86	17,4 ± 0,7	0,779
Quercetina sulfato	11,3 ± 1,3	12,8 ± 2,6	0,736
Rutina	-	-	-
Pinoresinol	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,3	0,636
Pinoresinol sulfato	16,5 ± 4,5	51,5 ± 13,7	0,035
Oleuropeína	-	-	-
Verbascósido	-	-	-
Catecol	21,4 ± 5,0	47,2 ± 15,7	0,211
Catecol sulfato	96,5 ± 66,5	142,9 ± 59,8	0,637

Valores expresados como media ± SEM de la concentración de polifenoles en orina. Existe diferencia estadística cuando  $p < 0,05$ .





## V. DISCUSIÓN

---

---



## 5. DISCUSIÓN

Estudios previos han descrito que el desarrollo de patologías cardiovasculares, entre ellas la hipertensión, van asociadas a cambios de la microbiota intestinal (Ussar *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2021; Pedersen *et al.*, 2021). Los mecanismos subyacentes por los cuales se han explicado estos cambios han sido varios, entre los que se puede destacar un desequilibrio en la producción de metabolitos derivados de la microbiota, alteraciones del sistema inmunitario, incremento de la actividad del sistema nervioso simpático, alteraciones en la integridad de la barrera intestinal, así como inflamación intestinal (Al Khodor *et al.*, 2017; Cookson, 2021).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito que la suplementación dietética con aceitunas de mesa arbequina tiene efectos antihipertensivos en ratas SHR, mientras que no modifica la presión arterial en ratas WKY (Franco-Ávila *et al.*, 2023). Con la finalidad de profundizar en el mecanismo por el cual la ingestión de aceitunas arbequinas produce esta reducción de presión arterial en la hipertensión, se ha estudiado la microbiota intestinal en ratas normotensas e hipertensas. Dado que se han atribuido a la microbiota intestinal efectos tanto hipertensivos como antihipertensivos (Cookson, 2021), se ha comparado el perfil de la microbiota fecal de ratas WKY y SHR. Para ello, se identificaron los taxones relacionados con la presión arterial y se analizaron los cambios en la composición de la microbiota fecal inducidos por la suplementación con aceitunas arbequina en ambas cepas de rata. Además, debido a que existe evidencia respecto a que el efecto antihipertensivo de los componentes de la *Olea europaea* L. está asociado a la reducción del estado oxidativo e inflamatorio, así como a la regulación del sistema renina-angiotensina (RAS) en SHR (Robles-Vera *et al.*, 2020a; Yang *et al.*, 2015; Massaro *et al.*, 2020; Vazquez *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2016), también se han analizado las concentraciones plasmáticas de MDA, ANG II, IL6 y TNF- $\alpha$ .

Nuestros resultados sobre la diversidad alfa y beta de la microbiota fecal de WKY-c y SHR-c, a las 14 y 21 semanas de edad, no evidenciaron diferencias entre estas cepas de rata. Hallazgos similares para la diversidad alfa han sido descritos por otros autores en el mismo modelo de hipertensión animal a las 12 y 15 semanas de edad (Abboud *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2021). Además, otros estudios realizados en ratas SHR muestran cambios en la riqueza y diversidad de especies a partir de las 25 semanas de edad (Robles-Vera *et al.*, 2020a; Xia *et al.*, 2021), lo que puede sugerir que la pérdida de diversidad en la microbiota fecal de ratas hipertensas puede ocurrir en animales de mayor edad que los utilizados en el presente estudio.



## Discusión

---

En cuanto a la composición de la microbiota fecal, nuestros resultados indicaron que a las 14 semanas, la composición de la microbiota fecal de WKY-c y SHR-c fue similar a nivel de filo. Sin embargo, a las 21 semanas de edad, la microbiota de las ratas SHR-c mostró una mayor abundancia de Firmicutes en comparación con las ratas WKY-c y en consecuencia la relación F/B también fue significativamente superior en SHR-c respecto a WKY-c. Este hallazgo es consistente con estudios previos que describieron el predominio de Firmicutes y una mayor relación F/B como una característica de la disbiosis intestinal en ratas SHR (Yang *et al.*, 2015; Toral *et al.*, 2019; Robles-Vera *et al.*, 2020b).

Dadas las diferencias en la composición de la microbiota fecal observadas entre WKY-c y SHR-c a las 21 semanas de edad, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre la abundancia relativa de los taxones bacterianos y las medidas de PA. Este análisis permitió identificar taxones bacterianos asociados a PA elevada, así como a valores normales PA. Se observó que dieciséis taxones presentaban una fuerte correlación con la BP en las ratas, de los cuales seis mostraron tener una asociación directa con la BP, mientras que diez exhibieron una relación inversa.

En el filo Firmicutes, los géneros *Sarcina*, *Alkaliphilus* y *Peptoniphilus*, así como la especie *Lactobacillus acidophilus*, exhibieron una asociación directa con la PA ya que su abundancia relativa estuvo incrementada en animales hipertensos. En línea con nuestros resultados, se ha descrito una asociación directa entre la elevada abundancia de *Sarcina* con el incremento de las concentraciones séricas de quimiocinas proinflamatorias, como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) (Conley *et al.*, 2016), mientras que *Alkaliphilus* se ha encontrado asociado negativamente con las concentraciones de propionato en muestras fecales de humanos (Gonzales-Zancada *et al.*, 2020). Con lo cual, el rol de *Sarcina* y *Alkaliphilus* en la microbiota fecal podría estar promoviendo la inflamación y el desequilibrio en la producción de AGCC, factores asociados a la hipertensión (Al Khodor *et al.*, 2017; Cookson, 2021).

Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la abundancia relativa del género *Lactobacillus* entre WKY-c y SHR-c, ni una correlación significativa con la PA. Sin embargo, encontramos una correlación significativa de la especie *Lactobacillus acidophilus* con PAS y PAD. Al respecto, la evidencia actual ha mostrado asociaciones directas e indirectas con diferentes enfermedades y en algunos casos, como en la diabetes tipo 2 y la obesidad, se han informado resultados contradictorios (De Filippis *et al.*, 2020). Algunos estudios sobre la microbiota intestinal de animales y humanos hipertensos han reportado un incremento de bacterias productoras de lactato (Robles-Vera *et al.*, 2020b). Sin embargo, existe evidencia que diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus* pueden inhibir la progresión de la enfermedad cardiovascular previniendo la producción

de MDA, lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) y superóxido dismutasa (SOD), al tiempo que reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL10 (Gao *et al.*, 2022).

Nuestros resultados también mostraron que una menor abundancia de *Phascolarctobacterium* en SHR-c respecto a WKY-c se asoció inversamente con la PAS y la PAD, lo que es consistente con los resultados de Guo *et al.* (2021) en el mismo modelo experimental de ratas. También se encontraron resultados similares en individuos hipertensos y en pacientes con enfermedad arterial coronaria, quienes presentaron una menor abundancia de *Phascolarctobacterium*, que la encontrada en poblaciones sanas (Wan *et al.*, 2021).

La abundancia reducida del filo Bacteroidetes también se ha descrito como una característica de la microbiota intestinal asociada con la hipertensión (Robles-Vera *et al.*, 2020b). Nuestros resultados mostraron que la menor abundancia relativa de cuatro géneros de este filo, tales como, *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Flavobacterium*, se correlacionó con valores de presión elevada. Esta asociación inversa entre *Parabacteroides* y la hipertensión arterial en SHR confirma lo descrito anteriormente por Adnan *et al.*, 2017. Otros autores también han señalado una menor abundancia de *Parabacteroides*, *Bacteroides* y *Flavobacterium* en la microbiota intestinal de ratas hipertensas (Robles-Vera *et al.*, 2020b; Gutiérrez-Calabrés *et al.*, 2020).

En nuestro estudio, el filo Proteobacteria y sus géneros *Desulfovibrio* y *Sutterella* también presentaron una asociación inversa con valores elevados de PA. Al respecto, se han informado resultados divergentes para *Desulfovibrio*, ya que su abundancia disminuyó en SHR de 9 meses en comparación con sus controles WKY (Gutiérrez-Calabrés *et al.*, 2020), pero se ha encontrado incrementada en ratas trasplantadas con microbiota de ratas espontáneamente hipertensas propensas a sufrir accidentes cerebrovasculares (Adnan *et al.*, 2017), así como en individuos hipertensos (Verhaar *et al.*, 2020). En el caso de *Sutterella*, los hallazgos de Guo *et al.* (2021) también indicaron una relación inversa entre la abundancia de esta bacteria en la microbiota intestinal de SHR y los valores de PAD. Además, otros estudios han informado de una asociación entre una mayor abundancia de *Sutterella* y valores de normales de PA en animales y humanos (Thomaz *et al.*, 2020; Dan *et al.*, 2019).

Otro hallazgo relevante de nuestro estudio fue la correlación inversa de la abundancia del género *Akkermansia* y la especie *Akkermansia muciniphila* con los valores elevados de PA. Resultados que concuerdan con lo observado anteriormente por Guo *et al.* (2021) y Robles-Vera *et al.* (2020b) en la misma cepa de ratas y en humanos.

## Discusión

---

Una vez identificados los componentes de la microbiota asociados a la PA, llevamos a cabo la segunda parte del estudio con el objetivo de evaluar el efecto de la suplementación con aceitunas sobre la microbiota fecal de ratas WKY y SHR. Primero confirmamos los resultados de Franco-Ávila *et al.* (2023) que muestran que la suplementación con aceitunas reduce la PA en SHR, con una reducción de 20 mmHg de la PAS y 19 mmHg de la PAD, pero no modifica la PA en ratas WKY. La dosis de aceitunas elegida (3,85 g/kg) equivale al consumo humano de 30 aceitunas arbequinas y es aproximadamente el doble de la ingesta diaria recomendada por la pirámide de la Dieta Mediterránea (Serra-Majen *et al.*, 2020). La dosis de aceitunas utilizada no afectó al peso corporal, probablemente porque las aceitunas de mesa tienen una baja densidad calórica (211 kcal en 100 g de porción comestible) que representan aproximadamente un 5% adicional de la ingesta energética diaria en las ratas suplementadas (WKY-o y SHR-o), respecto a sus controles (SHR-c).

Se sabe que algunos componentes de las aceitunas de mesa afectan la composición de la microbiota intestinal. Por ejemplo, el ácido oleico promueve la biodiversidad de las bacterias intestinales (Hidalgo *et al.*, 2018) y estimula la proliferación de especies productoras de AGCC, que tienen actividad antiinflamatoria y un papel en la reducción del colesterol total (Marcelino *et al.*, 2019). Además del ácido oleico, las aceitunas de mesa que se administraron en nuestro estudio contenían aproximadamente 1 g de polifenoles y 3,3 g de triterpenos pentacíclicos por kg de la parte comestible de la aceituna que podrían influir en la composición de la microbiota intestinal de WKY-o y SHR-o. En ese sentido, los polifenoles presentes en las aceitunas de mesa actúan como prebióticos al inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli* y estimular el crecimiento de bacterias probióticas como *Bifidobacterium* (Marcelino *et al.*, 2019). Además, la mayoría de los polifenoles ingeridos no se absorben en el intestino delgado, sino que llegan al intestino grueso, donde pueden promover el crecimiento de bacterias beneficiosas y convertirse en metabolitos activos con efectos posbióticos (Cortés-Martín *et al.*, 2020). Los triterpenos pentacíclicos también han demostrado tener propiedades similares cuando interactúan con la microbiota intestinal (Sun *et al.*, 2020).

Si bien la suplementación con aceitunas no modificó la PA en ratas WKY, sí se identificaron cambios en la composición de su microbiota fecal. A nivel de filo se observó un incremento aproximado del 6% en la abundancia del filo Firmicutes, además se han encontrado cambios en géneros pertenecientes a este filo, como el incremento de *Turicibacter* y *Coprococcus*. Entre los efectos beneficiosos de *Turicibacter* en la microbiota intestinal se han descrito la asociación inversa con la hipertensión (Guo *et al.*, 2021) y con las concentraciones de lípidos séricos en ratas (Song *et al.*, 2017), así como su papel protector frente a la enfermedad inflamatoria intestinal en modelos animales (Song

*et al.*, 2017). Por su parte, *Coprococcus* se ha descrito como un importante productor de AGCC, principalmente butirato, que puede mejorar la función de la barrera epitelial e inhibir la inflamación intestinal (Si *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2021).

Además, se observó que la suplementación con aceitunas redujo la abundancia de los géneros *Prevotella* y *Sphingobacterium* pertenecientes al filo Bacteroidetes. Nuestros resultados indicaron que *Prevotella* tiene una relación inversa con la PA y que solo en las ratas WKY, la suplementación con aceitunas reduce su abundancia. Respecto a su rol en la microbiota intestinal, *Prevotella* es considerada una bacterias comensal asociadas a elevados niveles de AGCC en el intestino, principalmente de acetato y succinato; cuya participación dentro de la comunidad bacteriana puede favorecer una mayor complejidad de interacciones entre taxones y que además, puede ejercer efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa (Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2015). Sin embargo, el incremento de algunas especies patobiontes se ha asociado con obesidad, síndrome metabólico, enfermedad inflamatoria intestinal, hipertensión y otras enfermedades (Li *et al.* 2017; Precup y Vodnar, 2019; Verhaar *et al.* 2020). Además, debido a que *Prevotella* posee una alta diversidad de especies y que su papel a nivel intestinal también depende de su interacción con otras bacterias de la comunidad microbiana (Precup y Vodnar, 2019; Tett *et al.*, 2021), quizás sean necesarios estudios más específicos para definir el efecto de la suplementación con aceitunas sobre esta bacteria. Respecto a *Sphingobacterium*, su reducción podría interpretarse como beneficiosa para la salud del hospedero, ya que una mayor abundancia de esta bacteria se ha identificado en la microbiota intestinal de pacientes con síndrome del intestino irritable (Chen *et al.*, 2023).

La suplementación con aceitunas en ratas WKY también ha incrementado la abundancia de *Anaeroplasma* (filo Tenericutes) para el cual se ha descrito un papel antiinflamatorio dentro de la microbiota intestinal ya que se ha demostrado que pueden inducir IgA y TGF- $\beta$ , importantes componentes de la inmunidad en las mucosa intestinal (Beller *et al.*, 2020).

En ratas hipertensas, nuestros resultados mostraron que la suplementación con aceitunas redujo la abundancia de *Peptoniphilus* y aumentó *Akkermansia* (*A. muciniphila*) y *Sutterella*, cambios que se han sugerido para mejorar la hipertensión (Guo *et al.*, 2021; Thomaz *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021). En particular, se ha sugerido que *Akkermansia* podría servir como un biomarcador de la disbiosis de la microbiota intestinal, y algunos estudios han informado una asociación entre el aumento de su abundancia relativa y la disminución de la prevalencia de hipertensión, obesidad y diabetes tipo 2 (Zhou *et al.*, 2021). En modelos de ratas hipertensas, la suplementación con quinoa (Guo *et al.*, 2021) o el tratamiento con minociclina (Yang *et al.*, 2015) redujo la PA, lo que se acompañó de una mayor

## Discusión

---

abundancia de *Akkermansia* en comparación con los animales de control. Además, se ha demostrado que este género está influenciado por componentes de la dieta, como el polifenol quercetina que fue capaz de aumentar *Akkermansia* en ratas Wistar que consumían una dieta alta en grasas y en sacarosa (Etxeberria *et al.*, 2015). Por otro lado, *Sutterella* también se incrementó después de la suplementación con wasabi, evitando así el desarrollo de hipertensión en un modelo de obesidad y síndrome metabólico en rata Wistar (Thomaz *et al.*, 2021). De acuerdo con nuestro estudio, estos autores también encontraron un aumento en la abundancia de *Allobaculum* (Thomaz *et al.*, 2021), un género productor de SCFA (Zhang *et al.*, 2012) *Allobaculum* también se ha asociado con una reducción de BP en SHR (Guo *et al.*, 2021; Robles-Vera *et al.*, 2020a; Thomaz *et al.*, 2021) y se ha descrito que media los efectos hipotensores de la berberina (Zhang *et al.*, 2012). Además, *Allobaculum* se asoció con el incremento de la expresión de proteínas de unión estrecha en el intestino grueso (Chen *et al.*, 2021) y se correlacionó negativamente con citoquinas proinflamatorias presentes en la sangre (Yue *et al.*, 2021). También observamos que la suplementación con aceitunas redujo la abundancia fecal de *Ruminococcus* y *Oscillospira*, ambos relacionados con la producción de trimetilamina, implicada en el desarrollo de la aterosclerosis (Wang *et al.*, 2015; Ishii *et al.*, 2018). La abundancia de *Ruminococcus* se correlaciona positivamente con la PA (Thomaz *et al.*, 2021) y la fibrilación auricular (Zuo *et al.*, 2019). Por otro lado, la abundancia de *Oscillospira* se correlaciona positivamente con la hipertensión, como se muestra en un modelo de rata Wistar de obesidad y síndrome metabólico (Thomaz *et al.*, 2021) así como en el modelo de rata con insuficiencia cardíaca espontáneamente hipertensa (Gutiérrez-Calabrés *et al.*, 2020). En conjunto, estos resultados sugieren que la reducción de la abundancia de *Ruminococcus* y *Oscillospira* inducida por la administración con aceitunas puede contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares.

En nuestros hallazgos, se observó que la suplementación con aceitunas de mesa estimuló el crecimiento de cepas probióticas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La importancia de su efecto sobre el aumento de la abundancia de *Lactobacillus acidophilus* radica en que, según se demostró en un ensayo clínico con pacientes de edad avanzada, esta especie se asoció con una reducción de la PA y una normalización de las concentraciones plasmáticas de colesterol total, triglicéridos, LDL y HDL (Cicero *et al.*, 2021). En ratas SHR, Hidalgo *et al.* (2018) demostraron que la suplementación con aceite de oliva redujo la PA sistólica, un efecto que se correlacionó bien con una mayor abundancia de *Lactobacillus* en la microbiota intestinal. Los triterpenos pentacíclicos de *Olea europaea* L. también promueven el crecimiento de *Lactobacillus* (Xue *et al.*, 2021), por lo que no se puede excluir un efecto de estos compuestos bioactivos. En nuestro estudio, el aumento de la abundancia de *Lactobacillus acidophilus* fue paralelo a un aumento de *Allobaculum*, tal como lo describen Mendes *et al.* (2018).

La administración de aceitunas también aumentó la abundancia del probiótico *Bifidobacterium*, un efecto también observado en animales suplementados con aceite de oliva (Zhao *et al.*, 2019). El género *Bifidobacterium* también se ha asociado con efectos protectores contra la hipertensión en SHR (Thomaz *et al.*, 2021). El consumo de aceitunas incrementó la abundancia de *Bifidobacterium animalis*, lo que puede ser relevante porque regula al alza la liberación de citocinas antiinflamatorias en la línea celular HT-29 del intestino humano (Presti *et al.*, 2015). Además, *Bifidobacterium animalis* puede promover la producción de acetato y modular el receptor Gpr43 implicado en la regulación de la PA (Horiuchi *et al.*, 2020).

Mediante el análisis de la red de co-ocurrencia, hemos podido examinar las interacciones entre microorganismos en la comunidad microbiana de cada grupo y determinar el número de conexiones que establece cada taxón, independientemente de su abundancia (Barberán *et al.*, 2012). Se han observado géneros con abundancia similar en WKY-c y SHR-c, pero con diferentes interacciones entre taxones. En SHR-c, las bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, a saber, *Coprococcus*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Lactobacillus*, *Allobaculum* y *Alkaliphilus* tienen menos conexiones con otras bacterias y principalmente establecen relaciones competitivas. Además, las bacterias del filo Bacteroidetes asociadas a valores normales de PA, muestran un menor número de interacciones dentro de la microbiota SHR-c. Asimismo, se observó que *Sutterella*, también asociada a un estado de normotensión, establece relaciones de cooperación en WKY-c, mientras que en SHR-c su rol es principalmente competitivo. La suplementación con aceitunas durante 7 semanas ha generado cambios en las interacciones de la microbiota fecal de SHR-o. Se encontró un incremento en el número de bacterias con participación significativa dentro de la comunidad, así como las relaciones cooperativas entre taxones. Por otra parte, además de los cambios en la abundancia relativa de algunos géneros, la administración de aceitunas ha modificado la relación de algunas bacterias. Por ejemplo, en el grupo SHR-o, *Lactobacillus* muestra relaciones simbióticas, mientras que en SHR-c sus interacciones fueron claramente competitivas. Además de aumentar la abundancia de *Akkermansia*, la suplementación con aceitunas favoreció una mayor conexión en la microbiota de los animales tratados. El estudio de co-ocurrencia indica que el consumo de aceitunas promueve una mayor interacción entre los géneros asociados a la PA normal con el resto de microorganismos de la comunidad bacteriana.

Nuestros resultados mostraron una mayor concentración de MDA en SHR-c en comparación con WKY-c a las 21 semanas de edad, lo que es consistente con hallazgos previos que indican que SHR desarrolla PA alta concomitantemente con un aumento de marcadores de estrés oxidativo (Massaro

## Discusión

---

*et al.*, 2020). También observamos que la concentración plasmática de ANG II en SHR-c es 3 veces mayor que en WKY-c como se informó anteriormente (Xie *et al.*, 2022) Además, el consumo de aceitunas provocó una disminución en las concentraciones plasmáticas de MDA (39%) y ANG II (32%) en SHR-o en comparación con SHR-c. Estos resultados son consistentes con otros estudios que indican que un efecto antihipertensivo en ratas SHR se relaciona con una disminución de los biomarcadores de estrés oxidativo tras la administración de un aceite de oliva virgen extra enriquecido con polifenoles (Vazquez *et al.*, 2019) y un extracto de hoja de olivo enriquecido con oleuropeína (Romero *et al.*, 2016)

Dada la implicación de la microbiota intestinal en la presión arterial (Yang *et al.*, 2015) realizamos un análisis de correlación entre los taxones bacterianos y las concentraciones de MDA y ANG II. La relación entre los taxones bacterianos con MDA y ANG II mostró una tendencia similar a la descrita para la microbiota fecal y BP. Entre las bacterias asociadas a MDA y ANG II, la suplementación con aceitunas redujo la abundancia relativa de *Blautia* y aumentó la abundancia relativa de los géneros *Allobaculum* y *Sutterella*, así como de las especies *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium thermacidophilum*, todas inversamente asociadas a MDA. Además, la abundancia relativa de *Akkermansia* y la especie *Akkermansia muciniphila*, inversamente relacionada con las concentraciones de MDA y ANG II, aumentó en el grupo suplementado. Cabe destacar que previamente se ha descrito una asociación entre *Akkermansia* y el sistema RAS (Lakshmanan *et al.*, 2022).

Entre los efectos de la ANG II que se relacionan con la hipertensión, se sabe que esta hormona es capaz de activar la vía MAPK a través del receptor ATR1 e iniciar la cascada de señalización que lleva a la producción de citocinas proinflamatorias (Romero *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2022). Sin embargo, en nuestro estudio, a pesar de observar una mayor concentración plasmática de ANG II en SHR-c, no se observaron diferencias en la concentración plasmática de IL6 y TNF- $\alpha$  en ningún grupo de ratas. Resultados similares fueron reportados para ANG II y citocinas inflamatorias en plasma de ratas WKY y SHR por Vázquez *et al.* (2019).

El efecto de los productos de la *Olea europaea* L. en la salud se ha estudiado ampliamente, especialmente asociado a su contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y sus compuestos bioactivos (Ghanbari *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2020; Antoniou y Hull, 2021). La calidad de los lípidos que contiene se ha asociado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, mayor sensibilidad a la insulina, mejora del perfil lipídico y de marcadores de inflamación; así como al control de la presión arterial (Hohmann *et al.*, 2015; Pastor *et al.*, 2021). Además, se han destacado las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales y cardioprotectoras para los polifenoles (Peyrol *et al.*,

2017; de Pablos *et al.*, 2019; Vijakumaran *et al.*, 2023) y para los triterpenos pentacíclicos de la oliva (Yu *et al.*, 2021; Papadaki y Tsimidou, 2022).

A pesar del gran número de investigaciones sobre las propiedades nutraceuticas de los compuestos del fruto de la oliva, la mayoría de estudios preclínicos y clínicos, se han centrado en el aceite de oliva; mientras que la evidencia respecto a los efectos del consumo de aceitunas de mesa sobre la salud, aun es limitada.

Por esta razón, como parte de los objetivos de esta tesis se ha planteado evaluar el efecto del consumo diario de 60 aceitunas arbequina sobre el peso corporal, la presión arterial, el perfil lipídico, la glicemia, los marcadores de la función hepática y renal, así como, sobre las características hematológicas de hombres y mujeres sanos.

La biodisponibilidad y el metabolismo de los compuestos bioactivos de los productos de la *Olea europaea* L. son factores importantes para estudiar sus efectos sobre la salud. Los estudios realizados en humanos respecto a la biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles han indicado que su absorción es dependiente de la dosis y de la matriz alimentaria (Alemán-Jiménez *et al.*, 2021). Para el hidroxitirosol se han informado tasas de absorción entre el 55% y 90%, siendo sus formas conjugadas, como el glucorónido y sulfato, las más detectadas en plasma y orina (Alemán-Jiménez *et al.*, 2021; Miro-Casas *et al.*, 2003). Se ha observado que la concentración plasmática de hidroxitirosol alcanza su valor máximo alrededor de los 30 minutos después de la ingesta oral, disminuyendo posteriormente a niveles indetectables aproximadamente una hora después. Además, se ha informado que este compuesto es eliminado del organismo unas 6 horas después de su consumo (Nikou *et al.*, 2022).

Kountouri *et al.* (2007) estudiaron las concentraciones plasmáticas de polifenoles en voluntarios sanos, después del consumo de 20 aceitunas Kalamata. En sus resultados describieron un incremento de 15% de tirosol y hasta el 50% de hidroxitirosol en plasma, una hora después del consumo (Kountouri *et al.*, 2007). Un estudio similar realizado en voluntarios sanos que consumieron 10 aceitunas Kalamata, informó un rápido incremento de hidroxitirosol de 18,5 veces su concentración plasmática basal, a los 30 minutos (Goldstein *et al.*, 2018).

Por otro lado, existe menos evidencia sobre la biodisponibilidad de los triterpenos pentacíclicos de la *Olea europaea* L. en humanos. Un estudio reciente realizado en adultos sanos que consumieron un aceite de oliva funcional (FOO) enriquecido con 389 mg/kg de ácidos triterpénicos, informó una biodisponibilidad aproximada de 6,25% para el ácido maslínico y de 0,7% para el ácido oleanólico. Además, describió una acumulación gradual de triterpenos en plasma, como resultado de dosis diarias



## Discusión

---

durante tres semanas, que pueden llegar a ser 3 o 4 veces superiores a lo determinado tras una sola dosis (de la Torre *et al.*, 2020).

La adherencia a la intervención es fundamental en los ensayos clínicos aleatorizados en nutrición ya que determina la cantidad de tratamiento o intervención que los participantes reciben y, por lo tanto, la validez interna y la interpretación de los resultados del estudio (Vitolins *et al.*, 2000). Existen diferentes métodos que se pueden utilizar para evaluar la adherencia a una intervención nutricional, estos pueden incluir el monitoreo en tiempo real del consumo de la intervención, formularios de seguimiento del consumo o la evaluación de la excreción de algún compuesto dietético o biomarcador (Lichtenstein *et al.*, 2021). En este ensayo, la adherencia a la intervención nutricional se ha realizado mediante la determinación de las concentraciones de polifenoles en orina.

En nuestros resultados los incrementos más notables, como resultado del consumo de aceitunas durante la fase de intervención, se observaron en las concentraciones de hidroxitirosol sulfato e hidroxitirosol glucorónido, que fueron 18 y 14 veces superiores a la concentración observada al final de la fase control, respectivamente. El hidroxitirosol en su forma libre también fue superior (1,6 veces) al encontrado en la fase control, no obstante la diferencia no tuvo significancia estadística. Estos resultados sugieren que los participantes cumplieron con el consumo de aceitunas durante la intervención, si se tienen en cuenta que el hidroxitirosol y sus metabolitos pueden ser considerados como marcadores de ingesta de los productos de la oliva (Garcia-Aloy *et al.*, 2019).

Además, se debe destacar que en este estudio se ha logrado determinar concentraciones urinarias de otros polifenoles de la aceituna que indican la adherencia de los participantes a la intervención. Tal es el caso del de ácido *o*-cumárico con sus conjugados glucorónido y sulfato, hidroxitirosol acetato, tirosol sulfato, salidroside, luteolina, luteolina sulfato, luteolina glucorónido y pinosresinol sulfato.

Dentro de los análisis de cada variable mediante el modelo lineal mixto se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres para los valores de presión arterial, triglicéridos, colesterol HDL y VLDL, así como en las concentraciones plasmáticas de malondialdehído.

Esto puede deberse al factor hormonal en la regulación de los mecanismos metabólicos del individuo, como en la fisiología del tejido adiposo, en la regulación de los centros reguladores del apetito y la saciedad y en la regulación energética, entre otros (Lizcano 2022). De hecho, se ha descrito que el estrógeno en mujeres puede contribuir a un mejor perfil lipídico antes de la menopausia en comparación con los hombres (Kamon *et al.*, 2022). A pesar de que nuestro estudio no fue diseñado para determinar el efecto de la intervención según el sexo, se realizaron análisis exploratorios a fin de

proporcionar nueva evidencia al respecto. Sin embargo, en nuestros resultados, el efecto de la intervención fue similar entre hombres y mujeres.

En los ensayos clínicos que han estudiado el efecto del consumo de aceite de oliva y de su contenido fenólico sobre la salud cardiovascular de hombres y mujeres, tampoco se han informado diferencias relacionadas con el sexo (Farras *et al.*, 2015; Pedret *et al.*, 2015, Fernández-Castillejo *et al.* 2016). Por otro lado, en estudios realizados solo en mujeres, se ha encontrado que el aceite de oliva enriquecido con polifenoles puede reducir el daño oxidativo del ADN en mujeres posmenopáusicas (Salvini *et al.*, 2007). También que la suplementación con 15 mg/día de hidroxitirosol redujo el peso y la grasa visceral en mujeres con obesidad y sobrepeso (Fytily *et al.*, 2022). Además, se ha observado que el consumo de 250 mg/día de extracto de oliva, durante un año puede reducir el colesterol total y LDL-c en mujeres posmenopáusicas (Filip *et al.*, 2015).

Los resultados de este trabajo han mostrado que el consumo diario de aceitunas durante un mes tiene un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico y las concentraciones de MDA. Además, se ha comprobado que la cantidad de aceitunas consumidas no influye en el peso corporal, no altera la presión arterial, no afecta la función renal ni la función hepática y tampoco modifica las variables hematológicas de los participantes.

Al analizar los efectos entre el consumo diario de 60 aceitunas arbequina durante 30 días y la fase control (sin intervención), nuestros resultados mostraron que los triglicéridos fueron más bajos después de la intervención con aceitunas (0,93 con IC95%(0,82 ; 1,06) mmol/L) que después de la fase control (1,01 con IC95%(0,88 ; 1,16) mmol/L). Los estudios realizados tanto en adultos sanos (Visser *et al.*, 2001; Marrugat *et al.*, 2004) como en individuos con alguna enfermedad cardiovascular (Fitó *et al.*, 2005; Visoli *et al.*, 2005; Fernández-Castillejo *et al.*, 2016; Farras *et al.*, 2015), que consumieron por al menos 3 semanas un aceite de oliva con un elevado contenido de polifenoles (entre 3,7 y 52,7 mg de polifenoles totales/día) no presentaron efectos sobre la concentración plasmática de triglicéridos. En otro estudio realizado por Sanchez-Rodriguez *et al.* (2018), quienes evaluaron el efecto del consumo de 30 mL de un aceite de oliva con una elevada concentración de polifenoles (487 ppm) y enriquecido con triterpenos de la oliva (339 ppm) durante 3 semanas, tampoco encontraron efectos sobre la concentración de triglicéridos (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2018). Sin embargo, en un ensayo realizado en pacientes prehipertensos que consumieron un extracto de hoja de olivo que contenía 136 mg de oleuropeína y 6 mg de hidroxitirosol diario, durante 6 semanas, se observó una reducción significativa de triglicéridos en plasma (Lockyer *et al.*, 2017). La evidencia existente podría sugerir que el efecto de los productos de la oliva sobre los triglicéridos plasmáticos

## Discusión

---

está asociado a su contenido de compuestos bioactivos. En nuestro estudio, el consumo de 60 aceitunas arbequina aporta aproximadamente 62,6 mg de polifenoles, de los cuales 28 mg fueron de hidroxitirosol, además de 192 mg de triterpenos pentacíclicos.

Por otro lado, al final de la intervención con aceitunas arbequina las concentraciones plasmáticas de colesterol total y LDL-c se redujeron en 0,17 IC95%(-0,28 ; -0,07) y 0,13 IC95%(-0,23 ; -0,03) mmol/L, respectivamente. Mientras que, no hubo diferencias entre el efecto de la fase control y la fase de intervención con aceitunas sobre el HDL-c. Nuestros hallazgos discrepan de lo encontrado en otros estudios que emplearon aceites de oliva con diferentes contenidos de compuestos bioactivos, en periodos de 3 o 4 semanas de intervención.

En el estudio NUTRAOLEUM se analizaron los efectos de tres aceites de oliva virgen extra, enriquecidos con diferentes concentraciones de polifenoles y triterpenos pentacíclicos, sobre el perfil lipídico de adultos sanos. Sus resultados indicaron que ninguno de los aceites tuvo un efecto sobre el colesterol total o LDL-c, y solo el aceite con una elevada concentración de polifenoles (490 ppm) y baja concentración de triterpenos (86 ppm) incrementó las concentraciones de HDL-c en mujeres (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). El estudio de Marrugat *et al.* (2004), indicó que el consumo diario de 25 mL de aceite de oliva con un contenido de 3,75 mg de polifenoles, no afectó el colesterol total ni el LDL-c en hombres sanos después de 3 semanas de intervención; no obstante, se incrementó la fracción HDL-c (Marrugat *et al.* 2004). Otro estudio realizado en adultos sanos analizó el efecto del consumo diario de 45 g de aceite de orujo de oliva con un elevado contenido de triterpenos (1082 mg/kg) y menos de 1 mg de polifenoles, durante 4 semanas, sobre el perfil lipídico. Sus resultados mostraron una reducción de LDL-c sin cambios en el colesterol total ni HDL-c (González-Rámila *et al.*, 2023). El estudio de Fitó *et al.* (2015) tampoco encontró efectos sobre el perfil lipídico de pacientes con enfermedad coronaria estable después de 3 semanas del consumo de 50 mL de aceite de oliva enriquecido con polifenoles (Fitó *et al.* 2015). En adultos hipercolesterolémicos se ha reportado que la ingesta diaria de 25 mL de aceite de oliva enriquecidos con sus propios polifenoles o fenoles del tomillo durante 3 semanas pueden reducir LDL-c (Fernández-Castillejo *et al.*, 2016).

Otros investigadores han estudiado el efecto de un consumo más prolongado de aceite de oliva virgen extra (AOVE) sin enriquecer, sobre el perfil lipídico. Weschenfelder *et al.* (2022) incluyeron 30 mL de aceite de oliva virgen extra en la dieta saludable de un grupo de pacientes con enfermedad coronaria estable, durante 12 semanas. Sus resultados no mostraron ningún efecto sobre el perfil lipídico (Weschenfelder *et al.*, 2022). Otra intervención realizada en un grupo de pacientes con depresión,

quienes consumieron 25 mL de AOVE durante 52 días, tampoco modificó las concentraciones de colesterol total o LDL-c; en cambio, incrementó la concentración de HDL-c (Foshati *et al.*, 2021).

Es interesante notar que nuestros resultados tienen mayor relación con el efecto sobre el perfil lipídico del consumo diario de un extracto de hojas de olivo con alto contenido de triterpenos (Lockyer *et al.*, 2017) y del consumo de un pate de oliva con elevado contenido de hidroxitirosol (Dinu *et al.*, 2021). En ambos casos se ha observado una mejora del perfil lipídico, con la reducción de colesterol total y LDL-c.

Por otra parte, nuestros hallazgos mostraron que la concentración plasmática de MDA fue menor después de los 30 días de la intervención con aceitunas arbequina (4,35 con IC95%(3,97 ; 4,77) mmol/L) que lo determinado al final de la fase control (4,75 con IC95%(4,31 ; 5,24) mmol/L). Estos resultados son consistentes con lo encontrado por Accardi *et al.* (2016), en un estudio piloto en el que 25 adultos sanos que consumieron 12 aceitunas de la variedad Nocellara del Belice durante 30 días, presentaron una reducción del 14% en las concentraciones de MDA en plasma comparadas con los valores basales. En el estudio de Accardi *et al.* (2016) las 12 aceitunas Nocellara de Belice equivalen aproximadamente a 100g de aceitunas (Accardi *et al.*, 2016), las cuales pueden aportar 53 mg diarios de hidroxitirosol (Ambra *et al.*, 2017), mientras que las 60 aceitunas Arbequina empleadas en nuestro estudio equivalen aproximadamente a 60 g de parte comestible con un contenido de 28,5 mg de hidroxitirosol. Otros ensayos controlados en que se evaluó el efecto del consumo de aceite de oliva enriquecido en polifenoles (aporte aproximado de 21 mg/día de polifenoles totales), no mostraron diferencias en las concentraciones de MDA en plasma (Visser *et al.*, 2001; Moschandreas *et al.*, 2002; Foshati *et al.*, 2021). Esta evidencia sugiere que un mayor consumo de polifenoles, especialmente de hidroxitirosol, puede prevenir la peroxidación lipídica en adultos sanos.

Respecto al efecto de la intervención sobre la glicemia de los participantes, nuestros resultados no mostraron diferencias entre la fase control y la fase de intervención con aceitunas. Sin embargo, se observó una reducción significativa dentro de la fase de intervención. Nuestros resultados son similares a lo reportado por otros ensayos controlados, donde evaluaron el efecto de la ingesta de aceites de oliva enriquecidos con polifenoles, sobre la glicemia de adultos sanos (Marrugat *et al.*, 2004; Weinbrenner *et al.*, 2004; Konstantinidou *et al.*, 2010), con cardiopatía coronaria estable (Fitó *et al.*, 2005; Fitó *et al.*, 2008) y con dislipidemia (Visoli *et al.*, 2005). En el estudio realizado por Santangelo *et al.* (2016) se ha reportado que la glicemia se redujo en pacientes con sobrepeso y diabetes mellitus

## Discusión

---

tipo 2 después de 4 semanas de consumo de aceite de oliva con alto contenido de polifenoles (Santangelo *et al.*, 2016).

Es importante resaltar que en este ensayo los participantes mantuvieron su dieta habitual y que solo se solicitó que durante el estudio restringieran el consumo de alimentos fuente de compuestos bioactivos. El consumo de 60 aceitunas arbequina, representó un aporte calórico de 126 kcal diarias durante 30 días. A pesar de lo cual no se observaron cambios significativos en el peso corporal de los participantes. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por las intervenciones de 3 semanas realizadas en adultos sanos (Visser *et al.*, 2001; Moschandreas *et al.* 2002) y adultos hipercolesterolémicos (Martín-Pelaez *et al.*, 2016). Estudios con más tiempo de intervención tampoco han informado efectos de los polifenoles del olivo sobre el peso corporal (de Bock *et al.*, 2013).

En nuestros resultados tampoco se observaron cambios en la PAS ni PAD como efecto de la ingestión de aceitunas. Cabe destacar que todos los participantes del estudio fueron adultos normotensos. Los ensayos aleatorizados realizados en individuos sanos (Konstantinidou, *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2015), con hipertensión leve (Moreno-Luna *et al.*, 2012), aterosclerosis (Widmer *et al.*, 2013), con un periodo de intervención de entre 3 y 6 semanas con aceites de oliva enriquecidos con polifenoles, tampoco mostraron cambios en la presión arterial. En nuestro ensayo, parte del interés en el estudio de la presión arterial, fue para comprobar que el consumo de aceitunas de mesa procesadas en salmuera no afecta la presión arterial de individuos sanos. Además, se comprobó que la intervención con aceitunas no alteró las concentraciones de sodio, ácido úrico, urea ni de creatinina indicando que durante el estudio la función renal se mantuvo estable. La intervención tampoco afectó las concentraciones de AST, ALT, fosfatasa alcalina ni las proteínas totales en plasma.

Basándonos en los resultados de este estudio, podemos afirmar que el consumo diario de aceitunas arbequina favorece un perfil lipídico saludable según las pautas para una salud cardiovascular ideal (Qureshi *et al.*, 2022).

Dentro de las fortalezas de este ensayo, se puede considerar el diseño cruzado, mediante el cual cada participante ha sido su propio control, reduciendo así el sesgo y asegurando así la validez interna del estudio. Además, se ha logrado mantener a los 40 participantes dentro del estudio con lo cual se ha conservado la potencia estadística, lo cual permite obtener conclusiones significativas sobre los efectos del estudio.



## VI. CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se han establecido las siguientes conclusiones:

### 6.1. Estudio preclínico en ratas normotensas e hipertensas

- El consumo diario durante 7 semanas de aceitunas arbequina a una dosis de 3,85 g/kg no indujo cambios ni en el peso corporal, ni en la ingestión de comida ni bebida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y normotensas (WKY) con respecto a sus controles. Sin embargo, la suplementación con este alimento disminuyó la presión arterial sistólica en 20 mmHg y la presión arterial diastólica en 19 mmHg en SHR sin producir ningún efecto en WKY.
- La determinación en plasma de biomarcadores asociados a presión arterial ha permitido establecer que, en ratas hipertensas controles, la peroxidación lipídica y la concentración de angiotensina II fue un 24% y un 66% superior que en ratas normotensas. No obstante, la suplementación con aceitunas disminuyó en un 39% la peroxidación lipídica y en un 32% la concentración de angiotensina II en los animales hipertensos, sin inducir cambios en los normotensos. El tratamiento no modificó las concentraciones de IL6 y TNF- $\alpha$  ni en SHR ni WKY.
- El análisis de la diversidad de la microbiota fecal entre ratas normotensas e hipertensas controles y tratadas muestra que la diversidad alfa y beta fue similar en ambas cepas a las 14 y las 21 semanas de edad. Al final del estudio, la relación Firmicutes/Bacteroidetes fue superior en las ratas SHR que en las WKY controles, y esta ratio no fue modificado por la suplementación con aceitunas.
- Se realizó un análisis de rangos de Spearman que permitió identificar taxones bacterianos asociados con valores de presión arterial, peroxidación lipídica y concentraciones de angiotensina II. Cabe destacar que los géneros *Phascolarctobacterium* y *Akkermansia* se encuentran incrementados en condiciones de presión arterial normal, menor peroxidación lipídica y menor concentración de angiotensina II, mientras que el filo Firmicutes y el género *Sarcina*, muestran una relación inversa con las tres variables indicadas. Con relación a la presión arterial, se observó una mayor abundancia relativa de los filos Bacteroidetes y Proteobacteria en los animales normotensos.
- La suplementación diaria con una dosis equivalente al consumo en humanos de 30 aceitunas arbequina modificó de forma diferente la microbiota fecal de ratas normotensas e hipertensas. Así, en ratas WKY, este alimento favoreció el incremento del filo Firmicutes, especialmente



## Conclusiones

---

de los géneros *Turicibacter*, *Prevotella*, *Coprococcus* y *Anaeroplasma* y de especies de *Lactobacillus*, inhibiendo el crecimiento de *Sphingobacterium*.

- En cambio, en las ratas hipertensas, el consumo diario de 3,85 mg/kg de aceitunas promovió modificaciones de la microbiota fecal asociados con los efectos antihipertensivos observados. En este sentido, destaca el incremento en la abundancia relativa de *Akkermansia* y *Sutterella* asociados con normotensión, así como la reducción de géneros inversamente relacionados como *Blautia* y *Peptoniphilus*. Asimismo, incrementó *Allobaculum* que se ha asociado a una menor peroxidación lipídica, y favoreció el crecimiento de especies probióticas como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis*.
- La elaboración de redes de co-ocurrencia, a partir del análisis de correlación de rangos de Spearman, permitió establecer las interacciones entre los géneros bacterianos en cada cepa. Los taxones microbianos de las ratas normotensas formaron un número elevado de correlaciones positivas, sugerentes de posibles relaciones de cooperación, que se incrementaron cuando esta cepa fue suplementada con aceitunas arbequina. En cambio, en las ratas hipertensas control se observó una menor interacción, formada mayormente por relaciones competitivas, que fue modificada con la suplementación con aceitunas al promover un incremento del número de relaciones de cooperación y favoreciendo la interacción de los géneros asociados con normotensión.

### 6.2. Intervención nutricional: consumo diario de aceitunas en adultos sanos

- El efecto de la ingestión diaria de aceitunas se ha evaluado en un estudio clínico abierto, aleatorizado, de diseño cruzado y de dos periodos, con 40 voluntarios sanos, 22 hombres y 18 mujeres. Los participantes han consumido 60 aceitunas arbequinas que aportan 126,6 kcal y contienen 1 g de proteína, 13 g de grasa total, 4 g de fibra dietética y 1 g de sodio al día. Además, proporcionan 192,8 mg de triterpenos pentacíclicos y 62,2 mg de polifenoles, de los cuales 28,5 mg son de hidroxitirosol, lo que es 5 veces superior a lo declarado por la EFSA para proteger los lípidos sanguíneos frente al estrés oxidativo (EFSA Panel, 2011).
- Los participantes del estudio cumplieron con el consumo de aceitunas durante la fase arbequina. Esto se evidenció mediante la determinación de las concentraciones urinarias de hidroxitirosol y sus metabolitos, la que fue aproximadamente 20 veces superior al final de los 30 días del consumo de aceitunas arbequina ( $2958 \pm 700$  nM), en comparación a lo cuantificado al final de la fase control ( $155 \pm 3$  nM).

- El consumo diario de 60 aceitunas arbequina durante 30 días incluida dentro de la dieta habitual de los participantes no afectó el peso corporal, tampoco la presión arterial sistólica, ni la presión diastólica de los adultos sanos que participaron en el estudio.
- Las variables hematológicas se mantuvieron estables y dentro de los valores normales para adultos sanos. Estos resultados demuestran que, el consumo de 60 aceitunas diarias durante un mes, no alteró la composición ni las características sanguíneas de los participantes del estudio.
- El estudio de los marcadores de función renal (sodio, ácido úrico, urea y creatinina) y función hepática (AST, ALT, fosfatasa alcalina y proteínas totales) en sangre, no han mostrado alteraciones después del consumo diario de 60 aceitunas arbequina.
- La intervención nutricional con 60 aceitunas arbequina no afectó la concentración de glucosa en sangre después de su consumo diario durante 30 días.
- La intervención nutricional con aceitunas tuvo un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico de los participantes, ya que disminuyó significativamente el colesterol total, LDL-c, triglicéridos, VLDL-c y la peroxidación lipídica, respecto el grupo control.
- El consumo regular de aceitunas durante 30 días previene la peroxidación lipídica, evitando el incremento de las concentraciones plasmáticas de malondialdehído en adultos sanos, en comparación con lo observado durante la fase control.

*En conclusión, el consumo regular de aceitunas promueve, en ratas SHR, una microbiota fecal compatible con su actividad antihipertensiva, y en voluntarios sanos mejora el perfil lipídico, sin incrementar el peso corporal ni PA. Los resultados sugirieren un papel cardioprotector para este alimento.*





## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

---



- Abboud FM, Cicha MZ, Ericsson A, Chapleau MW, Singh MV. Altering Early Life Gut Microbiota Has Long-Term Effect on Immune System and Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Front Physiol.* 2021;29;12:752924. doi: 10.3389/fphys.2021.752924
- AbuMweis SS, Jew S, Jones PJ. Optimizing clinical trial design for assessing the efficacy of functional foods. *Nutr Rev.* 2010;68(8):485-99. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00308.x
- Accardi G, Aiello A, Gargano V, Gambino CM, Caracappa S, Marineo S, Vesco G, Carru C, Zinellu A, Zarcone M, Caruso C, Candore G. Nutraceutical effects of table green olives: a pilot study with Nocellara del Belice olives. *Immun Ageing.* 2016;13:11. doi: 10.1186/s12979-016-0067-y
- Adnan S, Nelson JW, Ajami NJ, Venna VR, Petrosino JF, Bryan RM Jr, Durgan DJ. Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. *Physiol Genomics.* 2017;49(2):96-104. doi: 10.1152/physiolgenomics.00081.2016
- Al Samarraie A, Pichette M, Rousseau G. Role of the Gut Microbiome in the Development of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6):5420. doi: 10.3390/ijms24065420
- Alemán-Jiménez C, Domínguez-Perles R, Medina S, Prgomet I, López-González I, Simonelli-Muñoz A, Campillo-Cano M, Auñón D, Ferreres F, Gil-Izquierdo Á. Pharmacokinetics and bioavailability of hydroxytyrosol are dependent on the food matrix in humans. *Eur. J. Nutr.* 2021;60:905–915. doi: 10.1007/s00394-020-02295-0
- Alhadrami HA, Sayed AM, Sharif AM, Azhar EI, Rateb ME. Olive-Derived Triterpenes Suppress SARS COV-2 Main Protease: A Promising Scaffold for Future Therapeutics. *Molecules.* 2021;26(9):2654. doi: 10.3390/molecules26092654
- Ambra R, Natella F, Bello C, Lucchetti S, Forte V, Pastore G. Phenolics fate in table olives (*Olea europaea* L. cv. Nocellara del Belice) debittered using the Spanish and Castelvetro methods. *Food Res Int.* 2017;100:369-376. doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.027
- Anachad O, Taouil A, Taha W, Bennis F, Chegani F. The Implication of Short-Chain Fatty Acids in Obesity and Diabetes. *Microbiol Insights.* 2023;16:11786361231162720. doi: 10.1177/11786361231162720
- Antoniou C, Hull J. The Anti-cancer Effect of *Olea europaea* L. Products: a Review. *Curr Nutr Rep.* 2021;10(1):99-124. doi: 10.1007/s13668-021-00350-8.
- Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics.* 2008;24:282-284.
- Azzeh FS, Alshammari EM, Alazzeah AY, Jazar AS, Dabbour IR, El-Taani HA, Obeidat AA, Kattan FA, Tashtoush SH. Healthy dietary patterns decrease the risk of colorectal cancer in the Mecca Region, Saudi Arabia: a case-control study. *BMC Public Health.* 2017;17(1):607. doi: 10.1186/s12889-017-4520-4

- Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J.* 2012;6(2):343-51. doi: 10.1038/ismej.2011.119
- Barranco, D., Rallo, L. Olive cultivars in Spain. *HortTechnology.* 2000;10(1):107–110. doi: 10.21273/horttech.10.1.107
- Beller A, Kruglov A, Durek P, von Goetze V, Werner K, Heinz GA, Ninnemann J, Lehmann K, Maier R, Hoffmann U, Riedel R, Heiking K, Zimmermann J, Siegmund B, Mashreghi MF, Radbruch A, Chang HD. Specific microbiota enhances intestinal IgA levels by inducing TGF- $\beta$  in T follicular helper cells of Peyer's patches in mice. *Eur J Immunol.* 2020;50(6):783-794.
- Bennett, JA. The Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT): Guidelines for Reporting Randomized Trials. *Nursing Research.* 2005;54(2):128-132.
- Bianchi, G., Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2003;105(5), 229 – 242. doi: 10.1002/ejlt.200390046
- Blanco-Cabra N, Vega-Granados K, Moya-Andérico L, Vukomanovic M, Parra A, Álvarez de Cienfuegos L, Torrents E. Novel Oleanolic and Maslinic Acid Derivatives as a Promising Treatment against Bacterial Biofilm in Nosocomial Infections: An in Vitro and in Vivo Study. *ACS Infect Dis.* 2019;5(9):1581-1589. doi: 10.1021/acscinfecdis.9b00125
- Boskou, D. Table Olives: A Vehicle for the Delivery of Bioactive Compounds. *Journal of Experimental Food.* 2007;3(1), 1–7. doi: 10.4172/2472-0542.1000123
- Boskou, D., Camposeo, S., Clodoveo, M. L. (2015). Table Olives as Sources of Bioactive Compounds. June. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50014-8>
- Brown AW, Li P, Bohan Brown MM, Kaiser KA, Keith SW, Oakes JM, Allison DB. Best (but oft-forgotten) practices: designing, analyzing, and reporting cluster randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(2):241-8. doi: 10.3945/ajcn.114.105072
- Buñag RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol.* 1973;34:279–282.
- Chen H, Ou R, Tang N, Su W, Yang R, Yu X, Zhang G, Jiao J, Zhou X. Alternation of the gut microbiota in irritable bowel syndrome: an integrated analysis based on multicenter amplicon sequencing data. *J Transl Med.* 2023;21(1):117. doi: 10.1186/s12967-023-03953-7
- Chen Y, Yang B, Stanton C, Ross RP, Zhao J, Zhang H, Chen W. Bifidobacterium pseudocatenulatum Ameliorates DSS-Induced Colitis by Maintaining Intestinal Mechanical Barrier, Blocking Proinflammatory Cytokines, Inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling, and Altering Gut Microbiota. *J Agric Food Chem.* 2021;69(5):1496-1512. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06329

Cicero AFG, Fogacci F, Bove M, Giovannini M, Borghi C. Impact of a short-term synbiotic supplementation on metabolic syndrome and systemic inflammation in elderly patients: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Eur J Nutr.* 2021;60(2):655-663. doi: 10.1007/s00394-020-02271-8

Conley MN, Wong CP, Duyck KM, Hord N, Ho E, Sharpton TJ. Aging and serum MCP-1 are associated with gut microbiome composition in a murine model. *PeerJ.* 2016;4:e1854. doi: 10.7717/peerj.1854.

Conte P, Fadda C, Del Caro A, Urgeghe PP, Piga A. Table Olives: An Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality. *Foods.* 2020;9(4):514. doi: 10.3390/foods9040514

Cookson TA, Bacterial-induced blood pressure reduction: mechanisms for the treatment of hypertension via the gut, *Front. Cardiovasc. Med.* 2021, 8, 721393. doi: 10.3389/fcvm.2021.721393

Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology.* 2008;246(1):24-33. doi: 10.1016/j.tox.2007.10.029

Cortés-Martín A, Selma MV, Tomás-Barberán FA, González-Sarrias A, Espín JC. Where to Look into the Puzzle of Polyphenols and Health? The Postbiotics and Gut Microbiota Associated with Human Metabotypes. *Mol Nutr Food Res.* 2020;64(9):e1900952. doi: 10.1002/mnfr.201900952

Crisante F, Taresco V, Donelli G, Vuotto C, Martinelli A, D'Ilario L, Pietrelli L, Francolini I, Piozzi A. Antioxidant hydroxytyrosol-based polyacrylate with antimicrobial and antiadhesive activity versus staphylococcus epidermidis. *Adv Exp Med Biol.* 2016;901:25-36. doi: 10.1007/5584\_2015\_5013

Dan X, Mushi Z, Baili W, Han L, Enqi W, Huanhu Z, Shuchun L. Differential Analysis of Hypertension-Associated Intestinal Microbiota. *Int J Med Sci.* 2019;16(6):872-881. doi: 10.7150/ijms.29322

de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Hornedo-Ortega R, Cano M, Arguelles S. Hydroxytyrosol protects from aging process via AMPK and autophagy; a review of its effects on cancer, metabolic syndrome, osteoporosis, immune-mediated and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res.* 2019;143:58-72. doi: 10.1016/j.phrs.2019.03.005

Diarte C, Iglesias A, Romero A, Casero T, Ninot A, Gatiús F, et al. Ripening-related cell wall modifications in olive (*Olea europaea* L.) fruit: A survey of nine genotypes. *Food Chem.* 2021;338:127754.

Dinu M., Pagliai G., Scavone F., Bellumori M., Cecchi L., Nediani C., et al. Effects of an olive by-product called pâté on cardiovascular risk factors. *J. Am. Coll. Nutr.* 2021;40:617–623. doi: 10.1080/07315724.2020.1813060



## Bibliografia

---

Dwan K, Li T, Altman DG, Elbourne D. CONSORT 2010 statement: Extension to randomised crossover trials. *BMJ*. 2019;366:l4378.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL partic. *EFSA J*. 2011;9:2033–2058. doi:10.2903/j.efsa.2011.2033

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Fitó M, Gea A, Hernán MA, Martínez-González MA; PREDIMED study investigators. primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N Engl J Med*. 2018;378(25):e34. doi: 10.1056/NEJMoa1800389

Etxeberria U, Arias N, Boqué N, Macarulla MT, Portillo MP, Martínez JA, Milagro FI. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *J Nutr Biochem*. 2015;26(6):651-60. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.01.002.

Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(1):55-71. doi: 10.1038/s41579-020-0433-9

Fang M., Deng J., Zhou Q., Hu Z., Yang L. Maslinic acid protects against pressure-overload-induced cardiac hypertrophy by blocking METTL3-mediated m6A methylation. *Aging*. 2022;14:2548–2557. doi: 10.18632/aging.203860

Farràs M., Castañer O., Martín-Peláez S., Hernáez Á., Schröder H., Subirana I., Muñoz-Aguayo D., Gaixas S., de la Torre R., Farré M., et al. Complementary phenol-enriched olive oil improves HDL characteristics in hypercholesterolemic subjects. A randomized, double-blind, crossover, controlled trial. The VOHF study. *Mol. Nutr. Food Res*. 2015;59:1758–1770. doi: 10.1002/mnfr.201500030

Fernández-Castillejo S., Valls R.-M., Castañer O., Rubió L., Catalán Ú., Pedret A., Macià A., Sampson M.L., Covas M.-I., Fitó M., et al. Polyphenol rich olive oils improve lipoprotein particle atherogenic ratios and subclasses profile: A randomized, crossover, controlled trial. *Mol. Nutr. Food Res*. 2016;60:1544–1554. doi: 10.1002/mnfr.201501068

Foshati S, Ghanizadeh A, Akhlaghi M. The effect of extra virgin olive oil on anthropometric indices, lipid profile, and markers of oxidative stress and inflammation in patients with depression, a double-blind randomised controlled trial. *Int J Clin Pract*. 2021;75(7):e14254. doi: 10.1111/ijcp.14254

Franco-Ávila T, Moreno-González R, Juan ME, Planas JM. Table olive elicits antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *J Sci Food Agric*. 2023;103(1):64-72. doi: 10.1002/jsfa.12112

Franconi F., Coinu R., Carta S., Urgeghe P.P., Ieri F., Mulinacci N., Romani A. Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J. Agric. Food Chem*. 2006;54:3121–3125. doi: 10.1021/jf053003+

Fung TC, Vuong HE, Luna CDG, Pronovost GN, Aleksandrova AA, Riley NG, Vavilina A, McGinn J, Rendon T, Forrest LR, Hsiao EY. Intestinal serotonin and fluoxetine exposure modulate bacterial colonization in the gut. *Nat Microbiol*. 2019;4(12):2064-2073.

Fytli C, Nikou T, Tentolouris N, Tseti IK, Dimosthenopoulos C, Sfikakis PP, Simos D, Kokkinos A, Skaltsounis AL, Katsilambros N, Halabalaki M. Effect of Long-Term Hydroxytyrosol Administration on Body Weight, Fat Mass and Urine Metabolomics: A Randomized Double-Blind Prospective Human Study. *Nutrients*. 2022;14(7):1525. doi: 10.3390/nu14071525

Galili E, Langgut D, Terral JF, Barazani O, Dag A, Kolska Horwitz L, Ogloblin Ramirez I, Rosen B, Weinstein-Evron M, Chaim S, Kremer E, Lev-Yadun S, Boaretto E, Ben-Barak-Zelas Z, Fishman A. Early production of table olives at a mid-7th millennium BP submerged site off the Carmel coast (Israel). *Sci Rep*. 2021;11(1):2218. doi: 10.1038/s41598-020-80772-6

Gao H, Li X, Chen X, Hai D, Wei C, Zhang L, Li P. The Functional Roles of *Lactobacillus acidophilus* in different physiological and pathological processes. *J Microbiol Biotechnol*. 2022;32(10):1226-1233. doi: 10.4014/jmb.2205.05041

Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)-a review. *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):3291-3340. doi: 10.3390/ijms13033291

González-Rámila S, Sarriá B, Seguido MA, García-Cordero J, Mateos R, Bravo L. Olive pomace oil can improve blood lipid profile: a randomized, blind, crossover, controlled clinical trial in healthy and at-risk volunteers. *Eur J Nutr*. 2023;62(2):589-603. doi: 10.1007/s00394-022-03001-y

Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):686. doi: 10.3390/ijms19030686

Greetham HL, Gibson GR, Giffard C, Hippe H, Merkhoffer B, Steiner U, Falsen E, Collins MD. *Allobaculum stercoricanis* gen. nov., sp. nov., isolated from canine feces. *Anaerobe*. 2004;10(5):301-307. doi: 10.1016/j.anaerobe.2004.06.004

## Bibliografía

---

Guasch-Ferré M, Liu G, Li Y, Sampson L, Manson JE, Salas-Salvadó J, Martínez-González MA, Stampfer MJ, Willett WC, Sun Q, Hu FB. Olive Oil Consumption and Cardiovascular Risk in U.S. Adults. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(15):1729-1739. doi: 10.1016/j.jacc.2020.02.036.

Guo H, Hao Y, Fan X, Richel A, Everaert N, Yang X, Ren G. Administration with quinoa protein reduces the blood pressure in spontaneously hypertensive rats and modifies the fecal microbiota. *Nutrients*. 2021;13(7):2446. doi: 10.3390/nu13072446

Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol*. 2013;182:375–87. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.014

Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z. et al. Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochem Rev*. 2018;17:1091–1110. doi: 10.1007/s11101-017-9526-0

Gutiérrez-Calabrés, A. Ortega-Hernández, J. Modrego, R. Gómez-Gordo, A. Caro-Vadillo, C. Rodríguez-Bobada, P. González and D. Gómez-Garre, Gut microbiota profile identifies transition from compensated cardiac hypertrophy to heart failure in hypertensive rats, *Hypertension*, 2020;76:1545-1554.

Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 2001;4:1-9.

Hawinkel S, Mattiello F, Bijnsens L, Thas O. A broken promise: Microbiome differential abundance methods do not control the false discovery rate. *Brief Bioinform*. 2019;20:210–221.

He Y, Wang Y, Yang K, et al. Maslinic Acid: A New Compound for the Treatment of Multiple Organ Diseases. *Molecules*. 2022;27(24):8732. doi:10.3390/molecules27248732

Hidalgo, I. Prieto, H. Abriouel, A. B. Villarejo, M. Ramírez-Sánchez, A. Cobo, N. Benomar, A. Gálvez and M. Martínez-Cañamero, Changes in gut microbiota linked to a reduction in systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats fed an extra virgin olive oil-enriched diet, *Plant Foods Hum. Nutr*. 2018;73:1-6.

Hohmann CD, Cramer H, Michalsen A, Kessler C, Steckhan N, Choi K, Dobos G. Effects of high phenolic olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*. 2015;22(6):631-40. doi: 10.1016/j.phymed.2015.03.019

Horiuchi H, Kamikado K, Aoki R, Suganuma N, Nishijima T, Nakatani A, Kimura I. Bifidobacterium animalis subsp. lactis GCL2505 modulates host energy metabolism via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Sci Rep*. 2020;10(1):4158. doi: 10.1038/s41598-020-60984-6.

International Olive Oil Council (IOC). World Catalogue of Olive Varieties 2013. disponible en: <https://www.internationaloliveoil.org/product/world-catalogue-of-olive-varieties/>

Ishii C, Nakanishi Y, Murakami S, Nozu R, Ueno M, Hioki K, Aw W, Hirayama A, Soga T, Ito M, Tomita M, Fukuda S. A metabologenomic approach reveals changes in the intestinal environment of mice fed on american diet. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):4079. doi: 10.3390/ijms19124079

Kailis, S.G.; Kiritsakis, A. Table olives: processing, nutritional and health implications. In: Shahidi, F.; Kiritsakis, A.; editors. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing.* John Wiley & Sons Ltd; 2017, p. 295-324. doi:10.1002/9781119135340.

Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warriar M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusic AJ, Hazen SL. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(5):576-85. doi: 10.1038/nm.3145

Konstantinidou, V.; Covas, M.I.; Muñoz-Aguayo, D.; Kymenets, O.; de la Torre, R.; Saez, G.; Tormos Mdel, C.; Toledo, E.; Marti, A.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Ruiz Mendez, M.V.; Fito, M. In vivo nutri- genomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: A randomized controlled trial. *FASEB J.* 2010;24:2546-2557

Kountouri AM, Mylona A, Kaliora AC, Andrikopoulos NK. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine.* 2007;14(10):659-67. doi: 10.1016/j.phymed.2007.06.001

Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, Hallen A, Martens E, Björck I, Bäckhed F. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* 2015;22:971-892. doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.001

Kundisová I, Juan ME, Planas JM. Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Plasma by LC-ESI-MS/MS and Their Bioavailability after the Ingestion of Table Olives. *J Agric Food Chem.* 2020;68:10213–10222.

Lakshmanan AP, Murugesan S, Al Khodor S, Terranegra A. The potential impact of a probiotic: *Akkermansia muciniphila* in the regulation of blood pressure-the current facts and evidence. *J Transl Med.* 2022;20(1):430. doi: 10.1186/s12967-022-03631-0

Lanza, B. Nutritional and sensory quality of table olives. In: Muzzalupo, I.; editor. *Olive Germplasm.* InTechOpen; 2012, p. 343-372. doi: 10.5772/51723.

Lee-Huang S., Huang P.L., Zhang D., Lee J.W., Bao J., Sun Y.T., Chang Y.T., Zhang J., Huang P.L. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Fusion inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;354:872–878. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.071

## Bibliografia

---

Liang D, Zhang L, Chen H, Zhang H, Hu H, Dai X. Potato resistant starch inhibits diet-induced obesity by modifying the composition of intestinal microbiota and their metabolites in obese mice. *Int J Biol Macromol.* 2021;180:458-469. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.209.

Lichtenstein AH, Petersen K, Barger K, Hansen KE, Anderson CAM, Baer DJ, Lampe JW, Rasmussen H, Matthan NR. Perspective: Design and Conduct of Human Nutrition Randomized Controlled Trials. *Adv Nutr.* 2021;12(1):4-20. doi: 10.1093/advances/nmaa109

Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *Eur J Nutr.* 2017;56(4):1421-1432. doi: 10.1007/s00394-016-1188-y

López-lópez, A., Montaña, A., & Garrido-fernández, A. (2010). Nutrient Profiles of Commercial Table Olives: Fatty Acids, Sterols, and Fatty Alcohols. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00075-9>

Maghini DG, Moss EL, Vance SE, Bhatt AS. Improved high-molecular-weight DNA extraction, nanopore sequencing and metagenomic assembly from the human gut microbiome. *Nat Protoc.* 2021;16:458-471.

Marcelino, P. A. Hiane, K. d. C. Freitas, L. F. Santana, A. Pott, J. R. Donadon and R. d. C. A. Guimarães, Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota, *Nutrients.* 2019;11:1826.

Margetts BM, Martinez JA, Saba A, Holm L, Kearney M, Moles A. Definitions of 'healthy' eating: a pan-EU survey of consumer attitudes to food, nutrition and health. *Eur J Clin Nutr.* 1997;51:S23-29.

Massaro, E. Scoditti, M. A. Carluccio, N. Calabriso, G. Santarpino, T. Verri and R. De Caterina, Effects of olive oil on blood pressure: epidemiological, clinical, and mechanistic evidence, *Nutrients.* 2020;12:1548.

Medina-Martínez MS, Truchado P, Castro-Ibáñez I, Allende A. Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: a current controversy. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(4):801-10. doi: 10.1080/09168451.2015.1116924

Medina-O'Donnell M., Rivas F., Reyes-Zurita F.J., Cano-Muñoz M., Martínez A., Lupiáñez J.A., Parra A. Oleanolic Acid Derivatives as Potential Inhibitors of HIV-1 Protease. *J. Nat. Prod.* 2019;82:2886 - 2896. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b00649

Mendes MCS, Paulino DS, Brambilla SR, Camargo JA, Persinoti GF, Carvalheira JBC. Microbiota modification by probiotic supplementation reduces colitis associated colon cancer in mice. *World J Gastroenterol.* 2018;24(18):1995-2008. doi: 10.3748/wjg.v24.i18.1995

Miro-Casas E, Covas M.I, Farre M, Fito M, Ortuño J, Weinbrenner T, Roset P, De La Torre R. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin. Chem.* 2003;49:945 - 952. doi: 10.1373/49.6.945.

Mohebi R, McCarthy CP, Gaggin HK, van Kimmenade RRJ, Januzzi JL. Inflammatory biomarkers and risk of cardiovascular events in patients undergoing coronary angiography. *Am Heart J.* 2022;252:51-59. doi: 10.1016/j.ahj.2022.06.004

Montilla M., Agil P.A., Navarro M.C., Jiménez M.I., García-Granados A., Parra A., Cabo M.M. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* 2003;69:72–74. doi: 10.1055/s-2003-39698

Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de composición de alimentos. Editorial Pirámide, 2013 (16 edición).

Nazzaro F, Fratianni F, Cozzolino R, Martignetti A, Malorni L, De Feo V, Cruz AG, d'Acierno A. Antibacterial activity of three extra virgin olive oils of the campania region, southern italy, related to their polyphenol content and composition. *Microorganisms.* 2019;7(9):321. doi: 10.3390/microorganisms7090321

Nikou T, Sakavitsi ME, Kalampokis E, Halabalaki M. Metabolism and Bioavailability of Olive Bioactive Constituents Based on In Vitro, In Vivo and Human Studies. *Nutrients.* 2022;14(18):3773. doi: 10.3390/nu14183773.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351–358.

Olson ND, Morrow JB. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res Notes.* 2012;5:668–682.

Papadaki E, Tsimidou MZ. Edible oils from olive drupes as a source of bioactive pentacyclic triterpenes. Is there a prospect for a health claim authorization? *Food Chem.* 2022;381:132286. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132286

Pastor R, Bouzas C, Tur JA. Beneficial effects of dietary supplementation with olive oil, oleic acid, or hydroxytyrosol in metabolic syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Free Radic Biol Med.* 2021;172:372-385.

Pei T., Meng Q., Han J., Sun H., Li L., Song R., Sun B., Pan S., Liang D., Liu L. (–)-Oleocanthal inhibits growth and metastasis by blocking activation of STAT3 in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:43475–43491. doi: 10.18632/oncotarget.9782

Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Delgado-Lista J, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des.* 2011;17(8):769-77. doi: 10.2174/138161211795428948

## Bibliografía

---

Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Delgado-Lista J, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des.* 2011;17(8):769-77. doi: 10.2174/138161211795428948

Peyrol J, Riva C, Amiot MJ. Hydroxytyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Nutrients.* 2017;9(3):306. doi: 10.3390/nu9030306

Precup G, Vodnar DC. Gut Prevotella as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. *Br J Nutr.* 2019;122(2):131-140.

Presti, G. D'Orazio, M. Labra, B. La Ferla, V. Mezzasalma, G. Bizzaro, S. Giardina, A. Michelotti, F. Tursi, M. Vassallo and P. Di Gennaro, Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015;99:5613-5626.

Ramírez-Rodríguez AM, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Acuña Ortega N. Effect of Ursolic Acid on Metabolic Syndrome, Insulin Sensitivity, and Inflammation. *J Med Food.* 2017;20(9):882-886. doi: 10.1089/jmf.2017.0003

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008;22:659 - 661.

Richard Chin, B. Y. L. Periods, Sequences, and Trial Design. In: Principles and Practice of Clinical Trial Medicine; Academia Press; 2008, p. 95–117

Riolo R, De Rosa R, Simonetta I, Tuttolomondo A. Olive Oil in the Mediterranean Diet and Its Biochemical and Molecular Effects on Cardiovascular Health through an Analysis of Genetics and Epigenetics. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):16002.. doi:10.3390/ijms232416002

Robles-Vera, M. Toral and J. Duarte, Microbiota and hypertension: role of the sympathetic nervous system and the immune system. *Am. J. Hypertens.*, 2020b;33:890-901.

Robles-Vera, M. Toral, N. de La Visitacion, M. Sánchez, M. Gómez-Guzmán, R. Muñoz, F. Algieri, T. Vezza, R. Jiménez, J. Gálvez, M. Romero, J. M. Redondo and J. Duarte, Changes to the gut microbiota induced by losartan contributes to its antihypertensive effects. *Br. J. Pharmacol.*, 2020a;177:2006-2023.

Rocha J, Borges N, Pinho O. Table olives and health: a review. *J Nutr Sci.* 2020;2;9:e57. doi: 10.1017/jns.2020.50.

Romani A, Ieri F, Urciuoli S, et al. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients.* 2019;11(8):1776. doi:10.3390/nu11081776

Romero M, Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M, Olivares M, Gálvez J, Duarte J. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* 2016;7(1):584-93. doi: 10.1039/c5fo01101a

- Romero C, Brenes M, Yousfi K, García P, García A, Garrido A. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J Agric Food Chem*. 2004;52(3):479-84. doi: 10.1021/jf030525l
- Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, De Castro A. In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem*. 2007;55(3):680-6. doi: 10.1021/jf0630217
- Romero M, Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M, Olivares M, Gálvez J, Duarte J. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct*. 2016;7(1):584-93. doi: 10.1039/c5fo01101a
- Rufino-Palomares EE, Pérez-Jiménez A, García-Salguero L, Mokhtari K, Reyes-Zurita FJ, Peragón-Sánchez J, Lupiáñez JA. Nutraceutical Role of Polyphenols and Triterpenes Present in the Extracts of Fruits and Leaves of *Olea europaea* as Antioxidants, Anti-Infectives and Anticancer Agents on Healthy Growth. *Molecules*. 2022;27(7):2341. doi: 10.3390/molecules27072341
- Ruiz-Canela M, Martínez-González MA. Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*. 2011;68(3):245-50. doi: 10.1016/j.maturitas.2010.12.002
- Sagrati, G., Allegrini, M., Caprioli, G., Cristalli, G., Giardina, D., Maggi, F., Sirocchi, V. (2014). Simultaneous determination of squalene,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in table olives by solid phase extraction and High-Performance Liquid Chromatography with diode array detection. *Food Anal. Methods*. 2013;6:54–60 doi: 10.1007/s12161-012-9422-6
- Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V, Pitozzi V, et al. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br. J. Nutr*. 2006;95:742–751. doi: 10.1079/BJN20051674
- Sanchez-Rodriguez E, Lima-Cabello E, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Calleja MA, Roca M, Espejo-Calvo JA, Gil-Extremera B, Soria-Florido M, de la Torre R, Fito M, Covas MI, Alche JD, Martinez de Victoria E, Gil A, Mesa MD. Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Metabolic Syndrome and Endothelial Functional Risk Biomarkers in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients*. 2018;10(5):626. doi: 10.3390/nu10050626
- Serra-Majem, L. Tomaino, S. Dernini, E. M. Berry, D. Lairon, J. Ngo de la Cruz, A. Bach-Faig, L. M. Donini, F.-X. Medina, R. Belahsen, S. Piscopo, R. Capone, J. Aranceta-Bartrina, C. La Vecchia and A. Trichopoulou, Updating the Mediterranean diet pyramid towards sustainability: Focus on environmental concerns, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020;17:8758.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13:2498-2504.



## Bibliografía

---

Sharma H, Kumar P, Deshmukh RR, Bishayee A, Kumar S. Pentacyclic triterpenes: New tools to fight metabolic syndrome. *Phytomedicine*. 2018;50:166-177. doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.011

Si X, Shang W, Zhou Z, Strappe P, Wang B, Bird A, Blanchard C. Gut Microbiome-Induced Shift of Acetate to Butyrate Positively Manages Dysbiosis in High Fat Diet. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(3). doi: 10.1002/mnfr.201700670

Song EJ, Shin JH. Personalized Diets based on the Gut Microbiome as a Target for Health Maintenance: from Current Evidence to Future Possibilities. *J Microbiol Biotechnol*. 2022;32(12):1497-1505. doi: 10.4014/jmb.2209.09050

Song JJ, Tian WJ, Kwok LY, Wang YL, Shang YN, Menghe B, Wang JG. Effects of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1 on the gut microbiota of hyperlipidaemic rats. *Br J Nutr*. 2017;118:481-492. doi: 10.1017/S0007114517002380

Sorbie A, Delgado Jiménez R, Benakis C. Increasing transparency and reproducibility in stroke-microbiota research: A toolbox for microbiota analysis. *iScience*. 2022;25:103998.

Soriguer F, Rojo-Martínez G, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Caballero-Díaz F, Calle-Pascual A, Carmena R, Casamitjana R, Castaño L, Castell C, Catalá M, Delgado E, Franch J, Gaztambide S, Girbés J, Gomis R, Gutiérrez G, López-Alba A, Teresa Martínez-Larrad M, Menéndez E, Mora-Peces I, Ortega E, Pascual-Manich G, Serrano-Rios M, Urrutia I, Valdés S, Antonio Vázquez J, Vendrell J. Olive oil has a beneficial effect on impaired glucose regulation and other cardiometabolic risk factors. Di@bet.es study. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67(9):911-6. doi: 10.1038/ejcn.2013.130

Sroka Z., Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol*. 2003;41:753–758. doi: 10.1016/S0278-6915(02)00329-0

Staudacher HM, Irving PM, Lomer MCE, Whelan K. The challenges of control groups, placebos and blinding in clinical trials of dietary interventions. *Proc Nutr Soc*. 2017;76(3):203-212. doi: 10.1017/S0029665117000350

Staudacher HM, Yao CK, Chey WD, Whelan K. Optimal Design of Clinical Trials of Dietary Interventions in Disorders of Gut-Brain Interaction. *Am J Gastroenterol*. 2022;117(6):973-984. doi: 10.14309/ajg.0000000000001732

Sun Q, He M, Zhang M, Zeng S, Chen L, Zhou L, Xu H. Ursolic acid: A systematic review of its pharmacology, toxicity and rethink on its pharmacokinetics based on PK-PD model. *Fitoterapia*. 2020;147:104735. doi: 10.1016/j.fitote.2020.104735

**T**erés S., Barceló-Coblijn G., Benet M., Álvarez R., Bressani R., Halver J.E., Escribá P.V. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105:13811-13816. doi: 10.1073/pnas.0807500105

Tett A, Pasolli E, Masetti G, Ercolini D, Segata N. Prevalence diversity, niches and interactions with the human host. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(9):585-599. doi: 10.1038/s41579-021-00559-y

Tsai K.J., Tsai H.Y., Tsai C.C., Chen T.Y., Hsieh T.H., Chen C.L., Mbuyisa L., Huang Y.B., Lin M.W. Luteolin Inhibits Breast Cancer Stemness and Enhances Chemosensitivity through the Nrf2-Mediated Pathway. *Molecules.* 2021;26:6452. doi: 10.3390/molecules26216452

Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ.* 2018;361:k2179. doi:10.1136/bmj.k2179

Vazquez A, Sanchez-Rodriguez E, Vargas F, Montoro-Molina S, Romero M, Espejo-Calvo JA, Vilchez P, Jaramillo S, Olmo-García L, Carrasco-Pancorbo A, de la Torre R, Fito M, Covas MI, Martínez de Victoria E, Mesa MD. Cardioprotective Effect of a Virgin Olive Oil Enriched with Bioactive Compounds in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients.* 2019;11(8):1728. doi: 10.3390/nu11081728

Verhaar BJH, Prodan A, Nieuwdorp M, Muller M. Gut Microbiota in Hypertension and Atherosclerosis: A Review. *Nutrients.* 2020;12(10):2982. doi: 10.3390/nu12102982

Vichi, S., Tres, A., Quintanilla-Casas, B., Bustamante, J., Guardiola, F., Martí, E., Hermoso, J. F., Ninot, A., Romero, A. Catalan Virgin Olive Oil Protected Designations of Origin: Physicochemical and Major Sensory Attributes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2019;121(3):1–10. doi: 10.1002/ejlt.201800130

Vijakumaran U, Shanmugam J, Heng JW, Azman SS, Yazid MD, Haizum Abdullah NA, Sulaiman N. Effects of Hydroxytyrosol in Endothelial Functioning: A Comprehensive Review. *Molecules.* 2023;28(4):1861. doi: 10.3390/molecules28041861

Wan C, Zhu C, Jin G, Zhu M, Hua J, He Y. Analysis of Gut Microbiota in Patients with Coronary Artery Disease and Hypertension. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021;2021:7195082. doi: 10.1155/2021/7195082.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5261–5267

Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E, Gu X, Huang Y, Zamanian-Daryoush M, Culley MK, DiDonato AJ, Fu X, Hazen JE, Krajcik D, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell.* 2015;17;163(7):1585-95. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.055

Weaver CM, Miller JW. Challenges in conducting clinical nutrition research. *Nutr Rev.* 2017;75(7):491-499. doi: 10.1093/nutrit/nux026

Weschenfelder C, Gottschall CBA, Markoski MM, Portal VL, Quadros AS, Bersch-Ferreira ÂC, Marcadenti A. Effects of supplementing a healthy diet with pecan nuts or extra-virgin olive oil on

## Bibliografia

---

inflammatory profile of patients with stable coronary artery disease: a randomised clinical trial. *Br J Nutr*. 2022;127(6):862-871. doi: 10.1017/S0007114521001513

Xia WJ, Xu ML, Yu XJ, Du MM, Li XH, Yang T, Li L, Li Y, Kang KB, Su Q, Xu JX, Shi XL, Wang XM, Li HB, Kang YM. Antihypertensive effects of exercise involve reshaping of gut microbiota and improvement of gut-brain axis in spontaneously hypertensive rat. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1-24. doi: 10.1080/19490976.2020.1854642

Xie, Y. Shen, E. Su, L. Du, J. Xie, D. Wei, The effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide VGINYW and the hydrolysate of  $\alpha$ -lactalbumin on blood pressure, oxidative stress and gut microbiota of spontaneously hypertensive rats, *Food Funct*. 2022;13:2743-2755.

Xue C, Li Y, Lv H, Zhang L, Bi C, Dong N, Shan A, Wang J. Oleanolic Acid Targets the Gut-Liver Axis to Alleviate Metabolic Disorders and Hepatic Steatosis. *J Agric Food Chem*. 2021;21:69(28):7884-7897. doi: 10.1021/acs.jafc.1c02257

Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, Zadeh M, Gong M, Qi Y, Zubcevic J, Sahay B, Pepine CJ, Raizada MK, Mohamadzadeh M. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015;65(6):1331-40. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315

Yang Z, Wang Q, Liu Y, Wang L, Ge Z, Li Z, Feng S, Wu C. Gut microbiota and hypertension: association, mechanisms and treatment. *Clin Exp Hypertens*. 2023;45(1):2195135. doi: 10.1080/10641963.2023.2195135

Yi SW, Yi JJ, Ohrr H. Total cholesterol and all-cause mortality by sex and age: a prospective cohort study among 12.8 million adults. *Sci Rep*. 2019;9:1596.

Yu L, Xie X, Cao X, Chen J, Chen G, Chen Y, Li G, Qin J, Peng F, Peng C. The Anticancer Potential of Maslinic Acid and Its Derivatives: A Review. *Drug Des Devel Ther*. 2021;15:3863-3879. doi: 10.2147/DDDT.S326328.

Yubero-Serrano EM, Lopez-Moreno J, Gomez-Delgado F, Lopez-Miranda J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur J Clin Nutr*. 2019;72:8-17. doi:10.1038/s41430-018-0304-x.

Yue Y, He Z, Zhou Y, Ross RP, Stanton C, Zhao J, Zhang H, Yang B, Chen W. Lactobacillus plantarum relieves diarrhea caused by enterotoxin-producing Escherichia coli through inflammation modulation and gut microbiota regulation. *Food Funct*. 2020;11(12):10362-10374. doi: 10.1039/d0fo02670k

Zhang X, Zhao Y, Zhang M, Pang X, Xu J, Kang C, Li M, Zhang C, Zhang Z, Zhang Y, Li X, Ning G, Zhao L. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PLoS One*. 2012;7(8):e42529. doi: 10.1371/journal.pone.0042529

Zhao Z, Shi A, Wang Q, Zhou J. High Oleic Acid Peanut Oil and Extra Virgin Olive Oil Supplementation Attenuate Metabolic Syndrome in Rats by Modulating the Gut Microbiota. *Nutrients*. 2019;11(12):3005. doi: 10.3390/nu11123005

Zhou Q, Pang G, Zhang Z, Yuan H, Chen C, Zhang N, Yang Z, Sun L. Association Between Gut Akkermansia and Metabolic Syndrome is Dose-Dependent and Affected by Microbial Interactions: A Cross-Sectional Study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:2177-2188. doi: 10.2147/DMSO.S311388

Zuo, J. Li, K. Li, C. Hu, Y. Gao, M. Chen, R. Hu, Y. Liu, H. Chi, H. Wang, Y. Qin, X. Liu, S. Li, J. Cai, J. Zhong and X. Yang, Disordered gut microbiota and alterations in metabolic patterns are associated with atrial fibrillation, *GigaScience*. 2019;8, giz058.





## VIII. ANEXOS

---

---



**Artículo derivado de la tesis:**

**Gómez-Contreras A**, Franco-Ávila T, Miró L, Juan ME, Moretó M, Planas JM. Dietary intake of table olives exerts antihypertensive effects in association with changes in gut microbiota in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* 2023, *14*(6),2793-2806. doi: 10.1039/d2fo02928f.





Cite this: *Food Funct.*, 2023, 14, 2793

# Dietary intake of table olives exerts antihypertensive effects in association with changes in gut microbiota in spontaneously hypertensive rats†

Aldo Gómez-Contreras,  Talia Franco-Ávila, Lluïsa Miró, \* M. Emília Juan,   
Miquel Moretó and Joana M. Planas \*

Arbequina table olive (AO) consumption lowers blood pressure (BP) in spontaneously hypertensive rats (SHR). This study evaluates whether dietary supplementation with AO induced changes in the gut microbiota that are consistent with the purported antihypertensive effects. Wistar-Kyoto rats (WKY-c) and SHR-c received water, while SHR-o were supplemented by gavage with AO (3.85 g kg<sup>-1</sup>) for 7 weeks. Faecal microbiota was analysed by 16S rRNA gene sequencing. SHR-c showed increased Firmicutes and decreased Bacteroidetes compared to WKY-c. AO supplementation in SHR-o decreased BP by approximately 19 mmHg, and reduced plasmatic concentrations of malondialdehyde and angiotensin II. Moreover, reshaped faecal microbiota associated with antihypertensive activity by lowering *Peptoniphilus* and increasing *Akkermansia*, *Sutterella*, *Allobaculum*, *Ruminococcus*, and *Oscillospira*. Also promoted the growth of probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and modified the relationship of *Lactobacillus* with other microorganisms, from competitive to symbiotic. In SHR, AO promotes a microbiota profile compatible with the antihypertensive effects of this food.

Received 30th September 2022,  
Accepted 24th February 2023

DOI: 10.1039/d2fo02928f

rsc.li/food-function

## 1. Introduction

Hypertension is the main preventable risk factor for cardiovascular disease and premature death worldwide.<sup>1</sup> Primary hypertension is induced by the interaction of non-modifiable genetic factors, which determine the risk of cardiovascular disease, with modifiable environmental factors, such as overweight and unhealthy lifestyles.<sup>1</sup>

An important element in the prevention of cardiovascular disease is the adherence to healthy dietary habits like those offered by the Mediterranean diet (MD). The MD has been widely studied, with strong evidence showing that it promotes cardiovascular health and prevents obesity and hypertension.<sup>2</sup> The consumption of the core elements of the MD (fruits, virgin olive oil, cereals, vegetables, nuts, legumes, and fish) is

associated with a lower risk of cardiovascular disease and lower blood pressure (BP).<sup>3</sup>

Extra virgin olive oil (EVOO) has anti-inflammatory, antioxidant, and vasodilator properties, which reduce the atherosclerotic burden.<sup>3,4</sup> EVOO decreases BP in the spontaneously hypertensive rat (SHR) model<sup>5</sup> and in individuals at a high risk of developing cardiovascular disease.<sup>6</sup> In addition to oleic acid, olive oil contains polyphenols and pentacyclic triterpenes that have antioxidant, anti-inflammatory, and cardioprotective effects.<sup>4</sup> Phenolic compounds from EVOO contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress, as established by the Commission Regulation (EU) No. 432/2012 document.<sup>7</sup>

It is well known that during olive oil milling, only a minimal portion of the bioactive compounds is extracted along with the oil. The rest remains in the mill by-products, like olive pomace or olive pulp, which are used to prepare dietary supplements or ingredients for animal feed.<sup>8</sup> These by-products have been studied as potential sources of bioactive compounds. For example, olive pomace powders have been shown to have gastrointestinal health benefits as they stimulate the production of short-chain fatty acids (SCFA) by the gut microbiota, which has well-known beneficial effects.<sup>9</sup> The consumption of bread enriched with olive fibre has been observed to have beneficial effects on the host gut, increasing the abundance of probiotic bacteria such as *Bifidobacteriaceae* and

Grup de Fisiologia i Nutrició Experimental, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB, Maria de Maeztu Unit of Excellence), Universitat de Barcelona (UB), and Food Innovation Network (XIA), Av. Joan XXIII 27-31, 08028-Barcelona, Spain. E-mail: lluisa.miro@ub.edu, jmplanas@ub.edu;

Tel: +34 934024505

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2fo02928f>

*Lactobacillales*.<sup>10</sup> However, there are only a few studies on the protective effects of table olive consumption on cardiovascular variables.

In recent years, interest has focused on the relationship between gut microbiota and the host health status. Since the gut microbiota produces active metabolites that are involved in several physiological processes, an altered microbiota may be implicated in the development of cardiometabolic diseases.<sup>11</sup> Studies on animal models and humans have shown that the gut microbiota of hypertensive individuals has lower bacterial diversity and a different taxonomic composition compared to normotensive controls.<sup>12</sup> Some studies also suggest a possible causal role of gut dysbiosis in the pathogenesis of hypertension.<sup>13</sup>

Recently, our group reported that dietary supplementation with Arbequina table olives (AO) for 7 weeks lowered BP in SHR from the second week until the end of the intervention.<sup>14</sup> Therefore, in view of the role of the gut microbiota in the regulation of cardiovascular functions, the present study analysed differences in the faecal microbiota composition of hypertensive and normotensive rats and evaluated the hypothesis that dietary AO supplementation promotes the growth of bacteria involved in BP modulation in SHR.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Table olives

Table olives of the Arbequina variety (AO), harvested in the 2016–2017 season and subjected to natural fermentation in brine, were obtained from Cooperativa del Camp (Maials, Lleida, Spain). The composition of AO (g per 100 g of destoned olives) consisted of 21.0 lipids, 1.6 proteins, 7.2 fibre, and 4.3 salt, with metabolizable energy of 211 kcal (868 kJ). The AO content of pentacyclic triterpenes and phenolic compounds was  $3308 \pm 195 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $1048 \pm 85 \text{ mg kg}^{-1}$  of destoned olive ( $n = 5$ ). The detailed content of bioactive compounds in AO is shown in Table S1.† AO was prepared as a homogeneous suspension of the edible part of the olive, at a dose of  $3.85 \text{ g kg}^{-1}$  of animal weight which is equivalent to the intake of 30 AO by a person weighing 60 kg, as previously described.<sup>14</sup>

### 2.2. Animals

The study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Universitat de Barcelona (Ref. 105/17) and by the Generalitat de Catalunya (Ref. 9468), complying with the European Community Guidelines for the care and management of laboratory animals. Male spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar-Kyoto (WKY) controls, all at the age of 11-week-old, were obtained from Envigo Laboratories (Huntingdon, United Kingdom). The animals were distributed into groups of two rats per cage and maintained under controlled conditions of temperature ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), humidity ( $50 \pm 10\%$ ), and a 12-hour light–dark cycle. During the whole experiment, the rats were fed a standard diet (2014 Teklad Global 14%, Harlan, Barcelona, Spain) and water *ad libitum*.

### 2.3. Experimental design

At 14 weeks of age, the SHR group was randomly distributed into 2 groups, the untreated SHR (SHR-c  $n = 7$ ) and the SHR supplemented with AO (SHR-o,  $n = 6$ ). The third group was constituted of untreated WKY rats (WKY-c  $n = 8$ ). During a period of 7 weeks, the control groups (WKY-c and SHR-c) received water by gavage at a volume of  $10 \text{ mL kg}^{-1}$  while the SHR-o had the corresponding dose of AO suspension.<sup>14</sup> The body weight of the rats, as well as food and water consumption were measured at 14 and 21 weeks of age.

### 2.4. Blood pressure

Systolic (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) were determined in WKY-c, SHR-c, and SHR-o rats at 14 and 21 weeks of age. Measurements were performed using a non-invasive automatic BP analyser for rodents (LE5001 Harvard Apparatus, Panlab, Barcelona, Spain) as previously described.<sup>14</sup>

### 2.5. Analysis of malondialdehyde, angiotensin II, IL6 and TNF- $\alpha$ in plasma

At the end of the experiments, overnight fasted rats were anaesthetized by intramuscular injection of ketamine ( $90 \text{ mg kg}^{-1}$ , Imalgene®, Merial, Lyon, France) and xylazine ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , Rompun®, Bayer Hispania SL, Sant Joan Despí, Barcelona, Spain). Blood was collected from WKY-c, SHR-c, and SHR-o rats and transferred to EDTA-K<sub>3</sub>-coated tubes. Plasma samples were used to determine relevant biomarkers involved in the development of hypertension. Lipid peroxidation was assessed by measuring malondialdehyde (MDA) using the method described by Ohkawa *et al.*<sup>15</sup> Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits from FineTest (Wuhan, Hubei, China) were used to determine angiotensin II (ANG II) (Ref. ER1637) and tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Ref. ER1393) while the kit for interleukin 6 (IL6) (Ref. SEA079Ra) was provided by Cloud Clone Crop (Katy, TX, USA).

### 2.6. Collection of faecal samples

Stool samples were collected at 14 and 21 weeks of age in clean conditions. Faeces were collected directly into a sterile Eppendorf, frozen immediately in liquid N<sub>2</sub>, and stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until use.

### 2.7. DNA extraction and purification

Microbial DNA was extracted from stool samples using the QIAamp PowerFecal DNA kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). DNA quantification was performed using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the integrity of the extraction was verified by agarose gel electrophoresis.

### 2.8. Analysis of the 16S rRNA gene

The V3 and V4 hypervariable regions of the bacterial 16S rRNA gene were amplified by PCR using the specific primers PCR1\_Forward (50 bp): 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA-

AGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' and PCR1\_Reverse (55 bp): 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGG-ACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. Samples were sequenced using the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) at the Genomics and Bioinformatics Service of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona, Spain). The analysis of the 16S rRNA gene was performed using the BaseSpace app 16S Metagenomics and the MiSeq Reporter software v 2.6 provided by the Illumina MiSeq platform. The raw paired-end reads were trimmed considering a Phred quality score equal to or greater than 30. The filtered sequences were analysed using the ClassifyReads algorithm, a high-performance implementation of the Ribosomal Database Project (RDP),<sup>16</sup> with further sequence homology analysis by the RDP SeqMatch tool using the Greengenes database (v. 13.5) as a reference.

### 2.9. Statistical analysis

Microbiota analysis only included taxa with a percentage of reads higher than 0.001%. Alpha diversity was analysed using the Chao1 and Shannon indices and the number of species observed. Beta diversity was estimated based on Bray–Curtis dissimilarities, using analysis of similarities (ANOSIM) and permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) with Bonferroni *post-hoc* test to determine differences between microbial communities. Both tests were performed in RStudio (R v. 4.2.2; R Core Team, Vienna, Austria) using the vegan package v. 2.4-6. Beta diversity was visualised using principal coordinate analysis from the 16S Metagenomics app.

The normality of data was assessed using the Shapiro–Wilk test. The faecal microbiota composition analysis was performed by two-way ANOVA for the factors strain and age (14 and 21 weeks) in WKY-c and SHR-c groups. The Benjamini–Hochberg procedure was used to control the false discovery rate (FDR 5%) in multiple comparisons. The effect of AO supplementation on the SHR-c and SHR-o faecal microbiota at 21 weeks of age was analysed using an independent Student *t*-test or the Mann–Whitney *U* test, according to data distribution. Correlation between faecal microbiota with BP, MDA and ANG II was performed using the Spearman rank correlation, and the correlation between microbiota genera was visualized by a network plot using Cytoscape v 3.9.1.<sup>17</sup> The statistical analysis of body weight, feed intake, water consumption, BP, MDA, ANG II, IL6 and TNF- $\alpha$  was performed by one-way ANOVA considering treatment (water or AO) as the independent variable following of Bonferroni *post-hoc* test. Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ . The sample size of the WKY-c ( $n = 8$ ), SHR-c ( $n = 7$ ), and SHR-o ( $n = 6$ ) were established, considering an 80% power to detect a difference greater than or equal to 0.26 units for the Shannon index and changes of 16 mmHg or more in SBP, assuming in both cases a 5% significance level in a two-sided test. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism v 8.0.2 (La Jolla, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. General characteristics

Table 1 shows the body weight as well as the food and water intake at the beginning and the end of the experiment, that is, at 14 and 21 weeks of age. No changes were found among groups in body weight gain and feed consumption. Conversely, the water consumption was higher in SHR-c and SHR-o than in the WKY-c rats ( $p < 0.05$ ).

WKY-c rats gave measurements of SBP and DBP within the normotensive range, whereas SHR-c and SHR-o showed hypertensive values, both at 14 and 21 weeks of age (Table 1). The supplementation of AO for 7 weeks induced a decrease of 20 mmHg in SBP and 19 mmHg in DBP in the SHR-o compared to the SHR-c at the end of the experiment (Table 1). Moreover, the supplementation induced a non-significant decrease in heart rate (HR) of SHR-o with respect to SHR-c at the end of the 7 weeks of administration.

### 3.2. Malondialdehyde, angiotensin II, IL6 and TNF- $\alpha$ in plasma

Lipid peroxidation determined at 21 weeks of age was enhanced a 24% in plasma from SHR-c compared to WKY-c ( $p > 0.05$ ). AO supplementation prevented the increase in the concentration of MDA in SHR-c yielding a decrease of 39% and a reduction of 20%, in WKY-c, as shown in Table 2 ( $p < 0.05$ ). Plasma concentration of ANG II was higher in SHR-c compared with WKY-c ( $p < 0.05$ ). However, ANG II concentration showed a reduction of 32% in rats administered with AO compared to SHR-c ( $p < 0.05$ ) without reaching the values of WKY-c (Table 2). Quantification of IL6 and TNF- $\alpha$  showed

**Table 1** General characteristics of WKY and SHR animals after the supplementation of Arbequina table olives (AO) at a dose of 3.85 g kg<sup>-1</sup> or water during the experiment

	WKY-c	SHR-c	SHR-o
<b>Body weight (g)</b>			
14-week-old	270 ± 7 <sup>a</sup>	269 ± 4 <sup>a</sup>	272 ± 6 <sup>a</sup>
21-week-old	347 ± 10 <sup>a</sup>	325 ± 4 <sup>a</sup>	323 ± 8 <sup>a</sup>
<b>Feed intake (g day<sup>-1</sup>)</b>			
14-week-old	18.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	17.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	18.4 ± 0.2 <sup>a</sup>
21-week-old	18.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	17.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	16.8 ± 0.5 <sup>a</sup>
<b>Water intake (mL day<sup>-1</sup>)</b>			
14-week-old	21.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	36.8 ± 2.3 <sup>b</sup>	37.4 ± 2.3 <sup>b</sup>
21-week-old	21.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	30.3 ± 1.6 <sup>b</sup>	29.9 ± 1.5 <sup>b</sup>
<b>SBP (mmHg)</b>			
14-week-old	147 ± 3 <sup>a</sup>	209 ± 3 <sup>b</sup>	209 ± 3 <sup>b</sup>
21-week-old	152 ± 2 <sup>a</sup>	228 ± 4 <sup>b</sup>	208 ± 7 <sup>c</sup>
<b>DBP (mmHg)</b>			
14-week-old	98 ± 3 <sup>a</sup>	168 ± 4 <sup>b</sup>	166 ± 3 <sup>b</sup>
21-week-old	109 ± 4 <sup>a</sup>	177 ± 5 <sup>b</sup>	158 ± 4 <sup>c</sup>
<b>HR (bpm)</b>			
14-week-old	395 ± 11 <sup>a</sup>	458 ± 6 <sup>b</sup>	458 ± 14 <sup>b</sup>
21-week-old	404 ± 13 <sup>a</sup>	456 ± 8 <sup>b</sup>	446 ± 6 <sup>b</sup>

Results are presented as mean ± SEM in the WKY-c ( $n = 8$ ), SHR-c ( $n = 7$ ) and SHR-o ( $n = 6$ ) groups. Data were analysed by one-way ANOVA followed by multiple comparison Bonferroni test. Means without a common letter differ,  $p < 0.05$ . SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate.

**Table 2** Biomarkers of the development of hypertension in WKY and SHR animals after the supplementation of Arbequina table olives (AO) at a dose of 3.85 g kg<sup>-1</sup> or water during the experiment

	WKY-c	SHR-c	SHR-o
<b>Malondialdehyde (μM)</b>			
21-week-old	14.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	19.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.5 <sup>b</sup>
<b>Angiotensin II (pg mL<sup>-1</sup>)</b>			
21-week-old	1277.5 ± 155.9 <sup>a</sup>	3704.8 ± 380.4 <sup>b</sup>	2517.0 ± 336.0 <sup>c</sup>
<b>IL6 (pg mL<sup>-1</sup>)</b>			
21-week-old	3.6 ± 0.02	3.7 ± 0.02	3.8 ± 0.03
<b>TNF-α (pg mL<sup>-1</sup>)</b>			
21-week-old	2.1 ± 0.2	2.9 ± 0.4	2.7 ± 0.3

Results are presented as mean ± SEM in the WKY-c ( $n = 8$ ), SHR-c ( $n = 7$ ) and SHR-o ( $n = 6$ ) groups. TNF-α, tumour necrosis factor α; IL6, interleukin 6. Data were analysed by one-way ANOVA followed by multiple comparison Bonferroni test. Means without a common letter differ,  $p < 0.05$ .

similar plasma concentrations in control groups rats (WKY-c and SHR-c), and no differences were observed in rats supplemented with AO.

### 3.3. Differences in faecal microbiota composition and age-related changes in WKY rats and SHR controls

After bacterial DNA sequencing, a total of 4 182 795 reads that passed quality filtering (PF) were generated, and each faecal sample produced an average of 154 918 ± 9041 PF reads. Similar alpha diversity ( $p > 0.05$ ) was found for the WKY-c rats and SHR-c at 14 and 21 weeks of age (Fig. 1A). PCoA at the genus level also showed no differences, according to ANOSIM ( $R = 0.07$ ;  $p = 0.134$ ) and PERMANOVA ( $F = 1.41$ ;  $p = 0.139$ ), between the rat strains in beta diversity at both the ages examined (Fig. 1B).

Faecal microbiota composition was evaluated from the relative abundances of the different taxonomic levels (Fig. 1C). In both WKY-c rats and SHR-c, at 14 weeks of age, Firmicutes (WKY-14 weeks: 78.9% and SHR-14 weeks: 82.5%) was the main phylum, followed by Bacteroidetes (WKY-14 weeks: 17.1% and SHR-14 weeks: 12.3%), Actinobacteria (WKY-14 weeks: 1.89% and SHR-14 weeks: 3.60%), and Proteobacteria (WKY-14 weeks: 1.42% and SHR-14 weeks: 1.05%), with the remaining phyla accounting for less than 1% of the total faecal bacteria. No significant differences between strains were found at 14 weeks of age except for Proteobacteria, which were significantly increased in WKY-c rats ( $p = 0.024$ ) (Fig. 1C) and remained higher at 21 weeks of age (WKY-21 weeks: 1.59% and SHR-21 weeks: 1.26%  $p = 0.016$ ). The comparison of the faecal microbiota between WKY-c rats and SHR-c at 21 weeks of age (Fig. 1C) showed an increase in the abundance of Firmicutes in SHR-c (WKY-21 weeks: 72.5% and SHR-21 weeks: 82.0%  $p = 0.014$ ) and a higher abundance of Bacteroidetes in WKY-c rats (WKY-21 weeks: 23.1% and SHR-21 weeks: 12.2%  $p = 0.003$ ). At the phylum level, there was an increase in the Firmicutes to Bacteroidetes (F/B) ratio in SHR-c, which was 2-fold higher than that of WKY-c rats at 21 weeks of age ( $p = 0.026$ ) (Fig. 1D).

*Lactobacillus*, *Blautia*, *Ruminococcus*, and *Turicibacter* were the most abundant genera in both WKY rats and SHR throughout the study period, without differences between groups (Fig. 2). No differences in the relative abundances of the different genera were found between strains at 14 weeks of age, except for *Allobaculum* which was superior ( $p < 0.05$ ) in SHR-c with respect to WKY-c but showed no differences at 21 weeks of age (Fig. 2). However, important differences were found at 21 weeks of age, where the relative abundances of *Phascolarctobacterium*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Desulfovibrio*, *Sutterella*, and *Akkermansia* were higher ( $p < 0.05$ ) in WKY-c rats with respect to SHR-c.

### 3.4. Key bacteria related to blood pressure

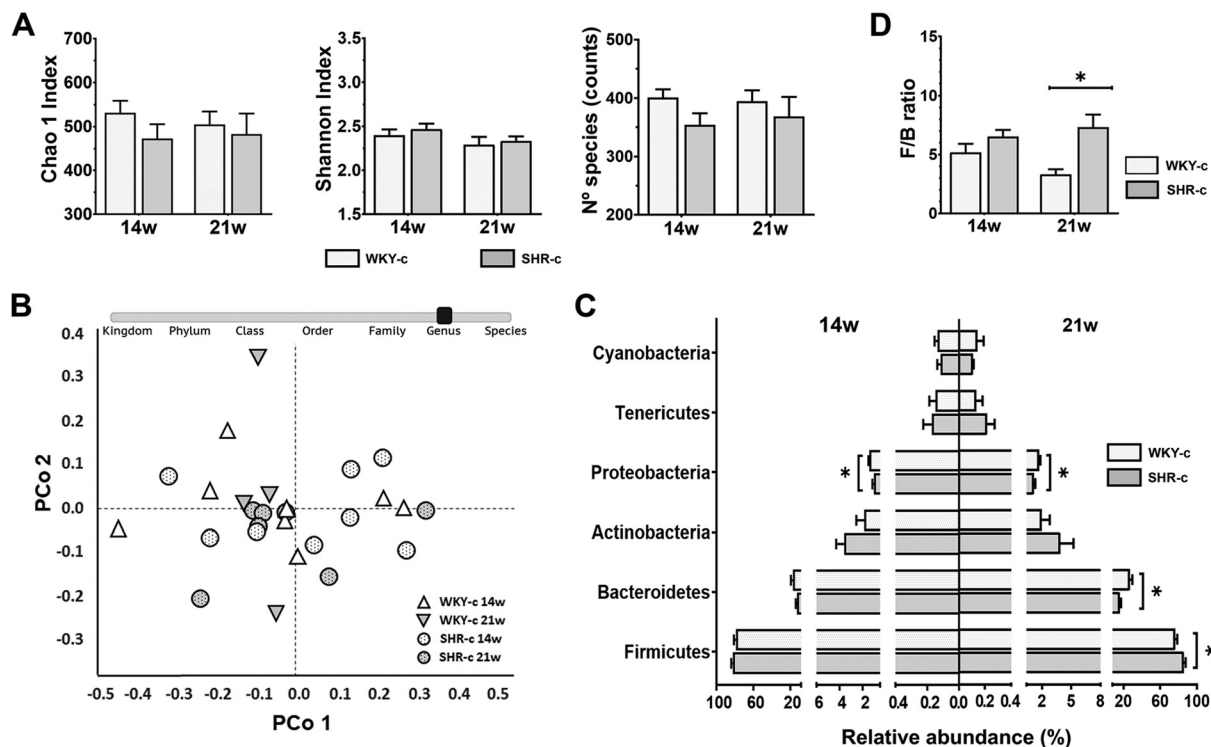
The association between the relative abundance of faecal microbiota and BP in WKY-c and SHR-c at 21 weeks of age was estimated by the analysis of Spearman rank correlation (Fig. 3). A direct association between the relative abundance of the phylum Firmicutes, including the *Sarcina* genus and the *Lactobacillus acidophilus* species were established with SBP and DBP ( $p < 0.05$ ). Although this positive association was also set up for the genera *Alkaliphilus* and *Peptoniphilus*, the correlation was only significant with DBP ( $p < 0.05$ ).

On the other hand, an inverse significant association ( $p < 0.05$ ) between the relative abundance of faecal microbiota was settled for the phylum Bacteroidetes, including *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Flavobacterium* genera, the phylum Proteobacteria including the genera *Desulfovibrio* and *Sutterella* and SPB and DPB. Although the phylum Verrucomicrobia yielded a non-significant correlation with BP ( $p > 0.05$ ), this inverse association was significant ( $p < 0.05$ ) for the *Akkermansia* genus and *Akkermansia muciniphila* species (Fig. 3). Noteworthy that from the Firmicutes phylum, only the *Phascolarctobacterium* genus showed a negative relationship with BP ( $p < 0.05$ ).

Spearman rank correlation analysis was also performed to estimate the association between gut microbiota and plasma concentrations of MDA and ANG II in hypertensive and normotensive rats. Fig. 3 shows that the phylum Firmicutes, along with the genera *Lactobacillus*, *Blautia*, *Alkaliphilus*, and *Sarcina* showed a direct association with MDA ( $p < 0.05$ ); whereas only the phylum Firmicutes and *Sarcina* were correlated directly with ANG II ( $p < 0.05$ ). Conversely, the genera *Phascolarctobacterium*, *Allobaculum*, *Parabacteroides*, *Sutterella*, and *Akkermansia*, along with the species *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium thermacidophilum*, and *Akkermansia muciniphila* were inversely correlated with lower values of lipid peroxidation ( $p < 0.05$ ). While the phylum Bacteroidetes and the genera *Phascolarctobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Desulfovibrio* and *Akkermansia* showed an inverse association with ANG II ( $p < 0.05$ ).

### 3.5. Effect of AO consumption on SHR faecal microbiota

The effect of AO on the diversity and abundance of SHR-c and SHR-o faecal microbiota was studied from a total of 1 950 997 PF reads with an average of 150 077 ± 15 909 PF reads per sample. Daily administration of AO for seven weeks did not



**Fig. 1** Differences between the faecal microbiota composition of Wistar-Kyoto (WKY-c) and spontaneously hypertensive rats (SHR-c) at 14 and 21 weeks of age. (A) Alpha diversity was evaluated with the Chao1 Index, the Shannon Index, and the number of species. (B) Beta diversity at the genus level was assessed by ANOSIM and PERMANOVA tests adjusted by Bonferroni *post-hoc* analysis and visualized by principal coordinate analysis (PCoA) plot. (C) Relative abundance at the phylum level; and (D) the Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the relative abundance in WKY-c ( $n = 8$ ) and SHR-c ( $n = 7$ ). Two-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test was used to analyse alpha diversity, relative abundance at phylum level and F/B ratio between groups. \* $p < 0.05$  indicate statistically significant differences between the strains of the same age.

affect the alpha diversity ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4A) and beta diversity of the microbial communities of SHR (ANOSIM:  $R = 0.17$ ,  $p = 0.083$  and PERMANOVA:  $F = 2.47$ ,  $p = 0.077$ ) (Fig. 4B). At 21 weeks of age, the main phyla, Firmicutes (SHR-c: 82.0% and SHR-o: 80.4%) and Bacteroidetes (SHR-c: 12.2% and SHR-o: 11.7%) showed similar abundances in both the untreated and treated groups, whereas only Actinobacteria (SHR-c: 3.09% and SHR-o: 5.99%  $p = 0.047$ ) was significantly increased in the AO supplemented group (Fig. 4C). Moreover, AO intake did not modify the F/B ratio (Fig. 4D).

At the genus level, the most remarkable effect of AO consumption was the dramatic increase in the treated group of the growth of *Allobaculum* (SHR-c: 1.25% and SHR-o: 3.54%  $p = 0.031$ ), *Sutterella* (SHR-c: 0.03% and SHR-o: 0.12%  $p = 0.038$ ) and *Akkermansia* (SHR-c: 0.001% and SHR-o: 0.016%  $p = 0.013$ ) (Fig. 5A). Moreover, AO elicited in the treated group a reduction in the growth of *Peptoniphilus* (SHR-c: 0.15% and SHR-o: 0.06%  $p = 0.017$ ), *Blautia* ( $p = 0.049$ ), *Oscillospira* ( $p = 0.048$ ), and *Ruminococcus* ( $p = 0.049$ ) (Fig. 5A).

Supplementation with AO also increased the abundance of *Akkermansia muciniphila* ( $p = 0.019$ ), *Lactobacillus acidophilus* ( $p = 0.003$ ), *Lactobacillus crispatus* ( $p = 0.008$ ), *Bifidobacterium animalis* ( $p = 0.014$ ), *Bifidobacterium thermacidophilum* ( $p = 0.028$ ), and *Ruminococcus flavefaciens* ( $p = 0.041$ ), but reduced the abundance of *Ruminococcus gnavus* ( $p = 0.019$ ) (Fig. 5B).

### 3.6. Faecal microbiota co-occurrence networks

To evaluate interactions between bacterial taxa in the faecal microbiota of each group, we used Spearman rank correlation to create co-occurrence networks, where only significant correlations were considered ( $\rho > 0.6$  and  $p < 0.05$ ). Positive correlations indicate cooperative or interdependent relationships between taxa, while negative correlations suggest a competitive relationship. The WKY-c group microbial network consists of 21 nodes (genera) and 53 edges (33 positive correlations and 20 negative correlations), where the mean number of relationships between bacterial taxa (degree) was 5.05, and the genera with the highest number of relationships were *Coproccoccus* (degree 8), *Bifidobacterium*, and *Bacteroides* (degree 7). The SHR-c group network consisted of 23 nodes and 41 edges (16 positive and 25 negative correlations), where the mean number of relationships between taxa (3.56) was lower than that observed in WKY-c, and the most related genus was *Oscillospira* (degree 6), with a predominance of competitive relationships between bacterial genera. In the SHR-o group, after the supplementation with AO, the microbial network included 23 nodes and 52 edges (31 positive and 21 negative correlations), with an increase in the mean number of relationships between bacteria (4.52). Noteworthy that AO supplementation favoured the presence of *Akkermansia* within the

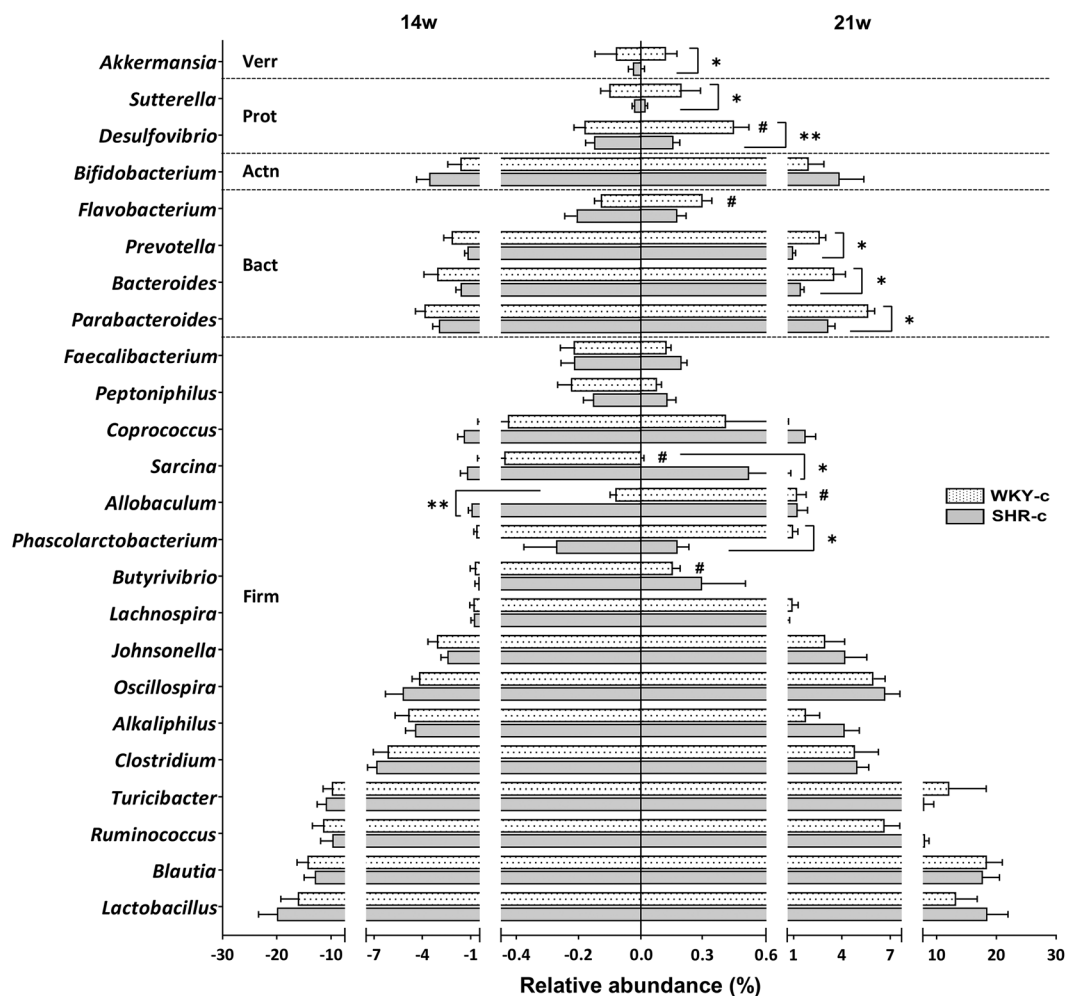


Fig. 2 Relative abundance at the genus level of faecal microbiota of SHR-c and WKY-c rats at 14 and 21 weeks of age. The graph depicts the phyla Firmicutes (Firm), Bacteroidetes (Bact), Actinobacteria (Actn), Proteobacteria (Prot), and Verrucomicrobia (Verr). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the relative abundance in WKY-c ( $n = 8$ ) and SHR-c ( $n = 7$ ). Two-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test was used for comparison between groups. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  indicate statistically significant differences between the strains of the same age; # $p < 0.05$  indicate the differences due to age within the same rat strain.

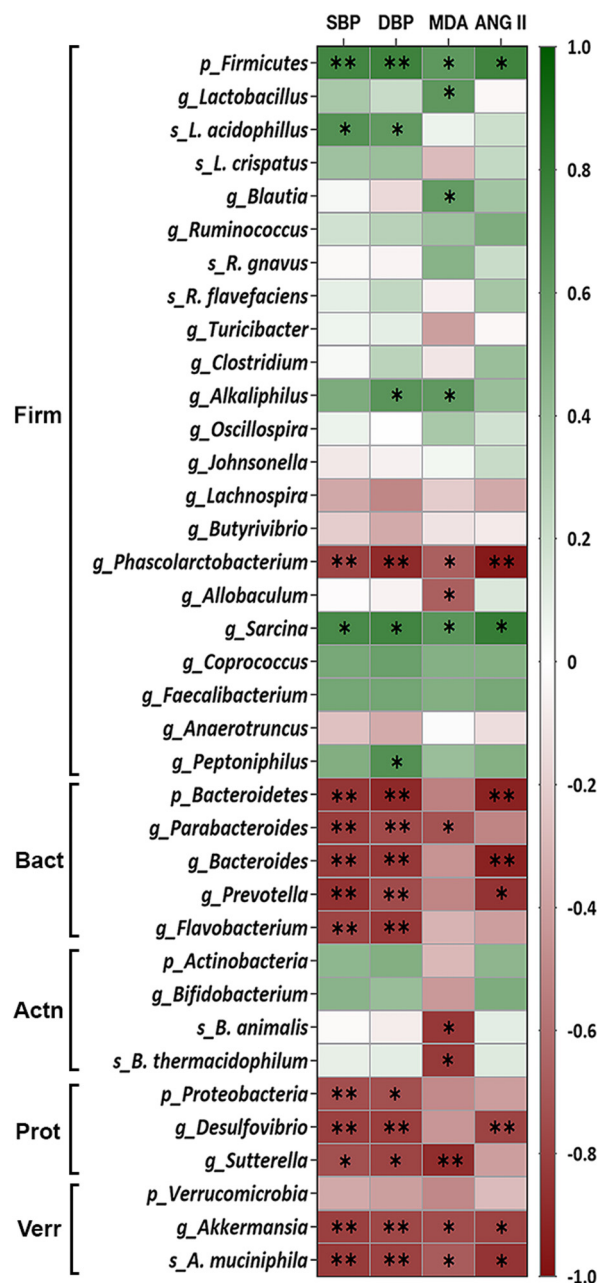
network (degree 8) as well as the establishment of a higher number of positive correlations between taxa (Fig. 6).

## 4. Discussion

In a previous study, we found that the dietary supplementation with AO had anti-hypertensive effects in SHR but did not affect the BP in normotensive WKY rats.<sup>14</sup> Recently, the development of cardiometabolic pathologies, including hypertension has been associated with changes in the microbiota.<sup>11,13</sup> The mechanisms by which gut dysbiosis affects cardiovascular homeostasis may involve an imbalance in the production of the microbiota-derived metabolites, alteration of the immune system, increased sympathetic nervous system activity, alterations in gut barrier integrity, and intestinal inflammation.<sup>13</sup> In addition, intestinal microbiota produces bioactive compounds

that may have hypertensive or anti-hypertensive effects.<sup>13</sup> Therefore, we have compared the profile of the microbiota of WKY-c with that of SHR-c to identify the species, genera, or phyla that correlate with BP. Furthermore, we have analysed the changes in the microbiota composition induced by the supplementation with AO in SHR.

The microbiota of SHR-c and WKY-c rats showed similar alpha and beta diversities at 14 and 21 weeks of age in agreement with the findings of Abboud *et al.*<sup>18</sup> and Guo *et al.*<sup>19</sup> in the same rat strains. Differences in species richness and diversity in SHR take place from 25 weeks of age,<sup>20,21</sup> suggesting that the loss of diversity in the microbiota of hypertensive rats may occur in older animals than those used in the present study. At the phylum level, the faecal microbiota composition of WKY-c and SHR-c were similar at 14 weeks of age. However, at 21 weeks of age, the microbiota of SHR-c differs from that of age-matched WKY animals with a higher abundance of



**Fig. 3** Heatmap of the Spearman rank correlation between the relative abundance of the bacterial faecal microbiota of SHR-c and WKY-c rats and systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), malondialdehyde (MDA) as well as angiotensin II (ANG II) at 21 weeks of age. The bacteria are grouped by phyla Firmicutes (Firm), Bacteroidetes (Bact), Actinobacteria (Actn), Proteobacteria (Prot), and Verrucomicrobia (Verr). Colours range from red (negative correlation) to green (positive correlation). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  indicate statistically significant correlations.

Firmicutes in SHR-c compared to WKY-c rats, a finding consistent with previous studies that described Firmicutes expansion as a characteristic of SHR gut dysbiosis.<sup>12</sup>

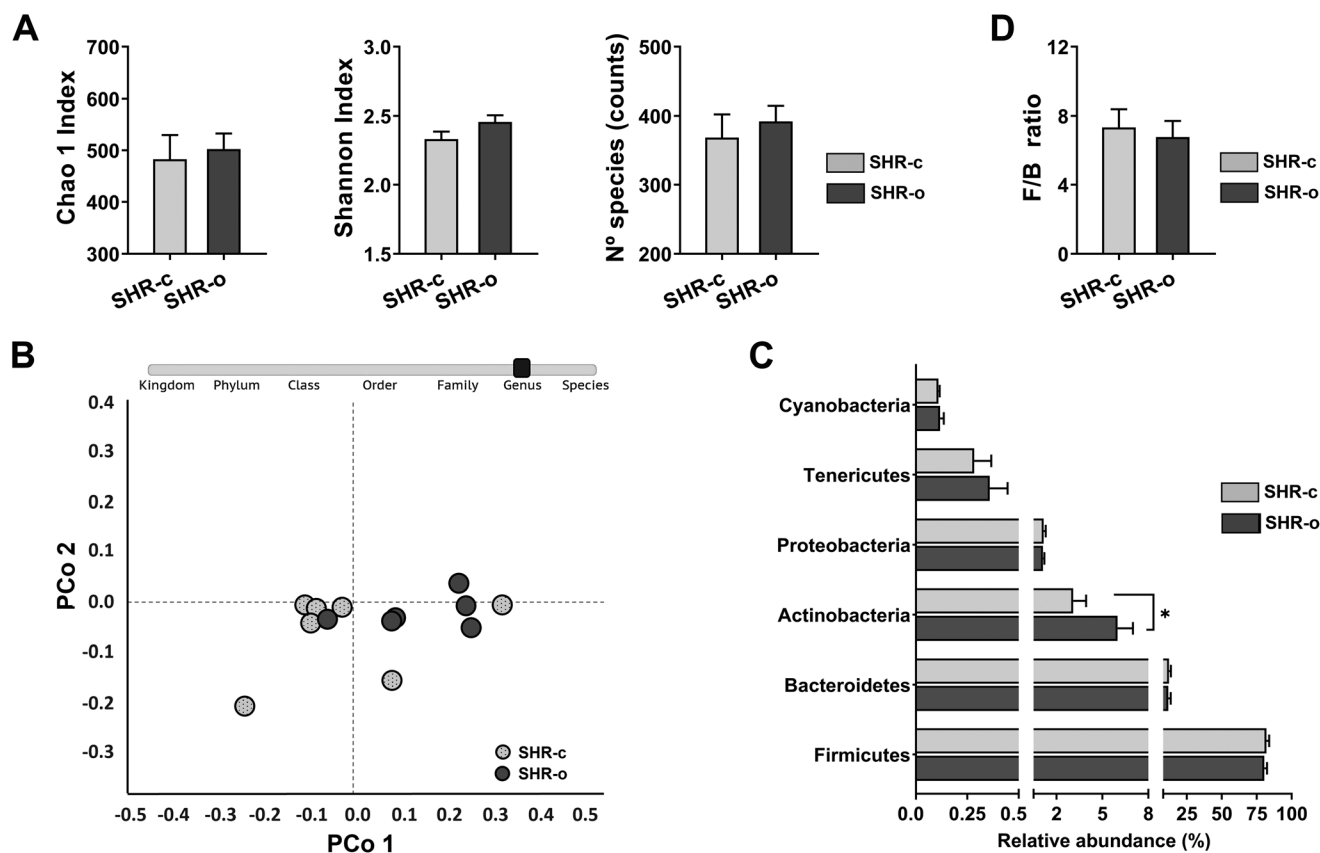
Given the differences in faecal microbiota composition observed between WKY-c and SHR-c at 21 weeks of age, a

Spearman correlation analysis was conducted between the relative abundance of microorganisms and the measurements of BP. In the phylum Firmicutes, the genera *Sarcina*, *Alkaliphilus*, and *Peptoniphilus* as well as the species *Lactobacillus acidophilus*, exhibited a direct association with BP since their relative abundance increased in hypertensive animals. Conversely, a lower abundance of *Phascalartobacterium* in SHR-c than in WKY-c was inversely associated with SBP and DBP, which is consistent with results reported by Guo *et al.*<sup>19</sup> Similar results were found in hypertensive individuals and in patients with coronary artery disease, showing a lower abundance of *Phascalartobacterium* than in healthy populations.<sup>22</sup>

Reduced abundance of the phylum Bacteroidetes has been described as a characteristic of the gut microbiota associated with hypertension.<sup>12</sup> Our results show that the lower relative abundance of four genera of this phylum, namely *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Flavobacterium*, was correlated with hypertension. This inverse association between *Parabacteroides* and arterial hypertension confirms previous reports.<sup>24</sup> Moreover, the lower abundance of *Parabacteroides*, *Bacteroides*, and *Flavobacterium* was described in the gut microbiota of hypertensive rats.<sup>12,23</sup> Other taxa found in less abundance in SHR-c with respect to WKY-c, and inversely associated with BP, were the phylum Proteobacteria along with the genera *Desulfovibrio* and *Sutterella*. From the phylum Verrucomicrobia an inverse correlation was found for the genera *Akkermansia* and the specie *Akkermansia muciniphila*. Diverging results have been reported for *Desulfovibrio*, since its abundance was decreased in 9-month-old SHR compared to WKY controls,<sup>23</sup> and increased in rats transplanted with microbiota from spontaneously hypertensive stroke-prone rats<sup>24</sup> as well as in hypertensive individuals.<sup>25</sup> The inverse association of *Sutterella* with BP has also been established in SHR.<sup>19</sup> This genus was also found to be reduced in hypertensive patients.<sup>26</sup> Furthermore, a high relative abundance of *Bifidobacterium animalis* in Wistar rats has been associated with normotension.<sup>27</sup> The drop in *Akkermansia* observed in SHR-c may also correlate with hypertension, as previously observed by Guo *et al.*<sup>19</sup> and Robles-Vera *et al.*<sup>12</sup> in the same strain.

Therefore, the analysis of faecal microbiota allowed the identification of taxa in SHR-c associated with high BP. Sixteen taxa were estimated to closely correlate with BP in rats, six of them showed a direct association with BP whereas ten exhibited an inverse relationship. Once the microbiota components associated with BP were identified, we conducted the second part of the study aimed at evaluating the effect of AO supplementation on SHR. We first confirmed the results of Franco-Ávila *et al.*<sup>14</sup> showing that AO supplementation lowers BP in SHR, with a reduction of 20 mmHg of the SBP and 19 mmHg of the DBP. The dose of AO chosen ( $3.85 \text{ g kg}^{-1}$ ) is equivalent to human consumption of 30-small-sized Arbequina olives which is about double the daily intake recommended by the MD pyramid.<sup>28</sup> The dose of AO used did not affect body weight, probably because AO has a low-calorie density (211 kcal in 100 g of edible portion) which represent





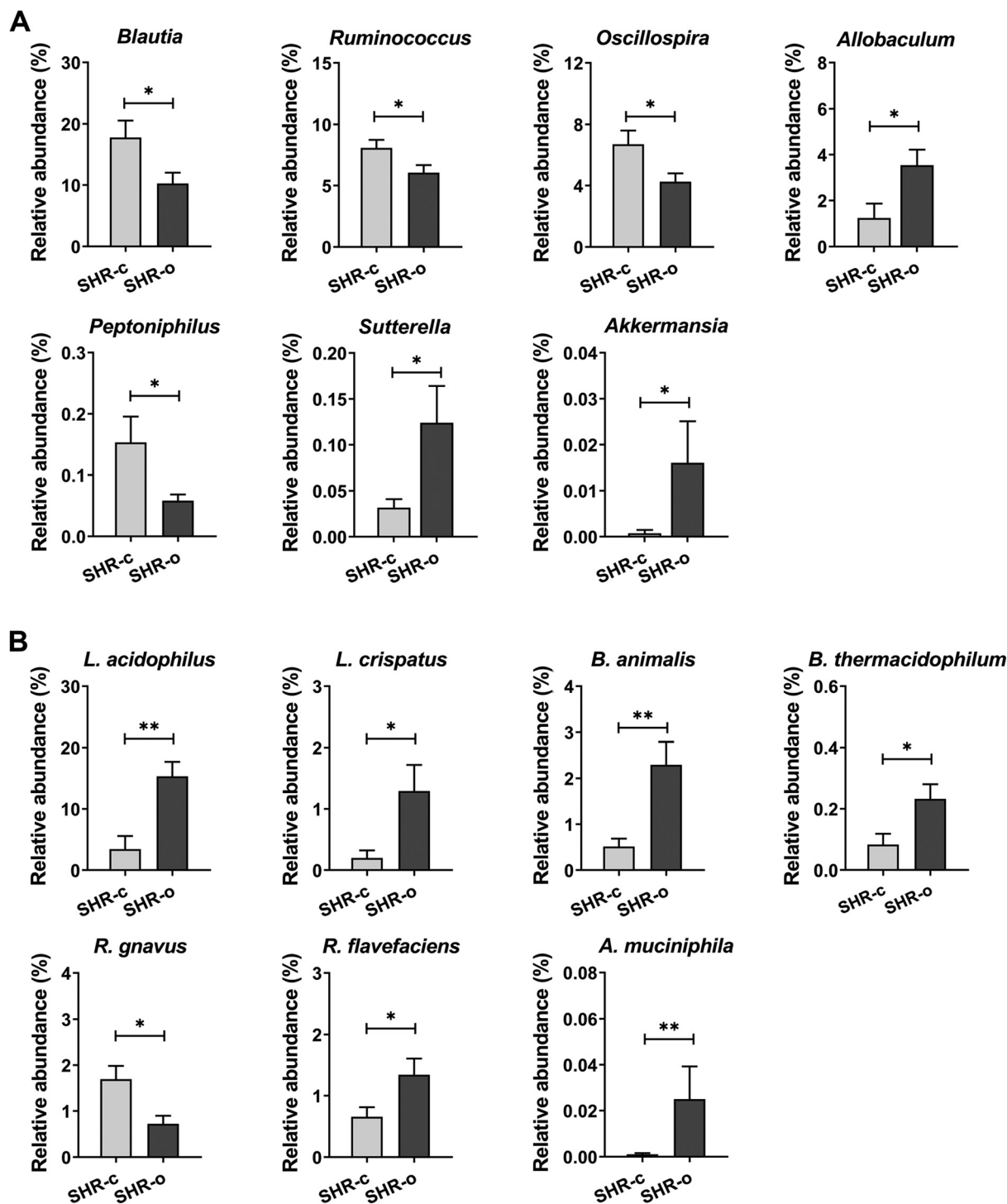
**Fig. 4** Effect of the daily intake of Arbequina table olives (AO) during 7 weeks in SHR. (A) Alpha diversity was evaluated with the Chao1 Index, the Shannon Index, and the number of species. (B) Beta diversity at the genus level was assessed using ANOSIM and PERMANOVA tests and visualized using a principal coordinate analysis (PCoA) plot. (C) Relative abundance at the phylum level; and (D) the Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, and differences in alpha diversity, relative abundance and F/B ratio between SHR-c ( $n = 7$ ) and SHR-o ( $n = 6$ ) were analysed by  $t$ -Student or the Mann–Whitney  $U$  test.

approximately an additional 5% of the daily energy intake in SHR-o with respect to SHR-c.

Some components of table olives are known to affect the composition of the gut microbiota. For example, oleic acid promotes the biodiversity of intestinal bacteria<sup>29</sup> and stimulates the proliferation of species that produce SCFAs, which have anti-inflammatory activity and a role in the reduction of total cholesterol.<sup>30</sup> In addition to oleic acid, the AO that was administered in our study contained approximately 1 g of polyphenols and 3.3 g of pentacyclic triterpenes per kg of the edible part of the olive that could influence the gut microbiota composition of SHR-o. In this sense, table olive polyphenols can act as prebiotics, inhibiting the growth of pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, and stimulating probiotic *Bifidobacteria*.<sup>30</sup> Most of the ingested polyphenols are not absorbed in the small intestine and enter the large intestine, where they promote the growth of beneficial bacteria.<sup>31</sup> Polyphenols can also be converted into active metabolites which may exert postbiotic effects.<sup>31</sup> Similar properties have been described for pentacyclic triterpenes when interacting with the intestinal microbiota.<sup>32</sup>

In our results, the AO supplementation reduced the abundance of *Peptoniphilus* and increased *Akkermansia* (*A. mucini-*

*phila*) and *Sutterella*, which are changes that have been suggested to ameliorate hypertension.<sup>19,27,33</sup> Concerning *Akkermansia*, this genus has been proposed as a biomarker of gut microbiota dysbiosis and some studies have reported an association between increased abundance and reduced prevalence of hypertension, obesity, and type-2 diabetes.<sup>33</sup> In hypertensive rat models, the supplementation with quinoa<sup>19</sup> or treatment with minocycline<sup>34</sup> lowered BP which was accompanied by a higher abundance of *Akkermansia* compared to the control animals. In addition, this genus has been demonstrated to be influenced by dietary components, such as the polyphenol quercetin that was able to increase *Akkermansia* in Wistar rats consuming a high-fat sucrose diet.<sup>35</sup> *Sutterella* was also incremented after the supplementation with wasabi thus preventing the development of hypertension in a model of obesity and metabolic syndrome in Wistar rat.<sup>27</sup> In accordance with our study, these authors also found an increase in the abundance of *Allobaculum*,<sup>27</sup> an SCFA-producing genus.<sup>36</sup> *Allobaculum* is also associated with a reduction of BP in SHR<sup>19,20,27</sup> and has been described to mediate the hypotensive effects of berberine.<sup>37</sup> Furthermore, *Allobaculum* was associated with the increment of the

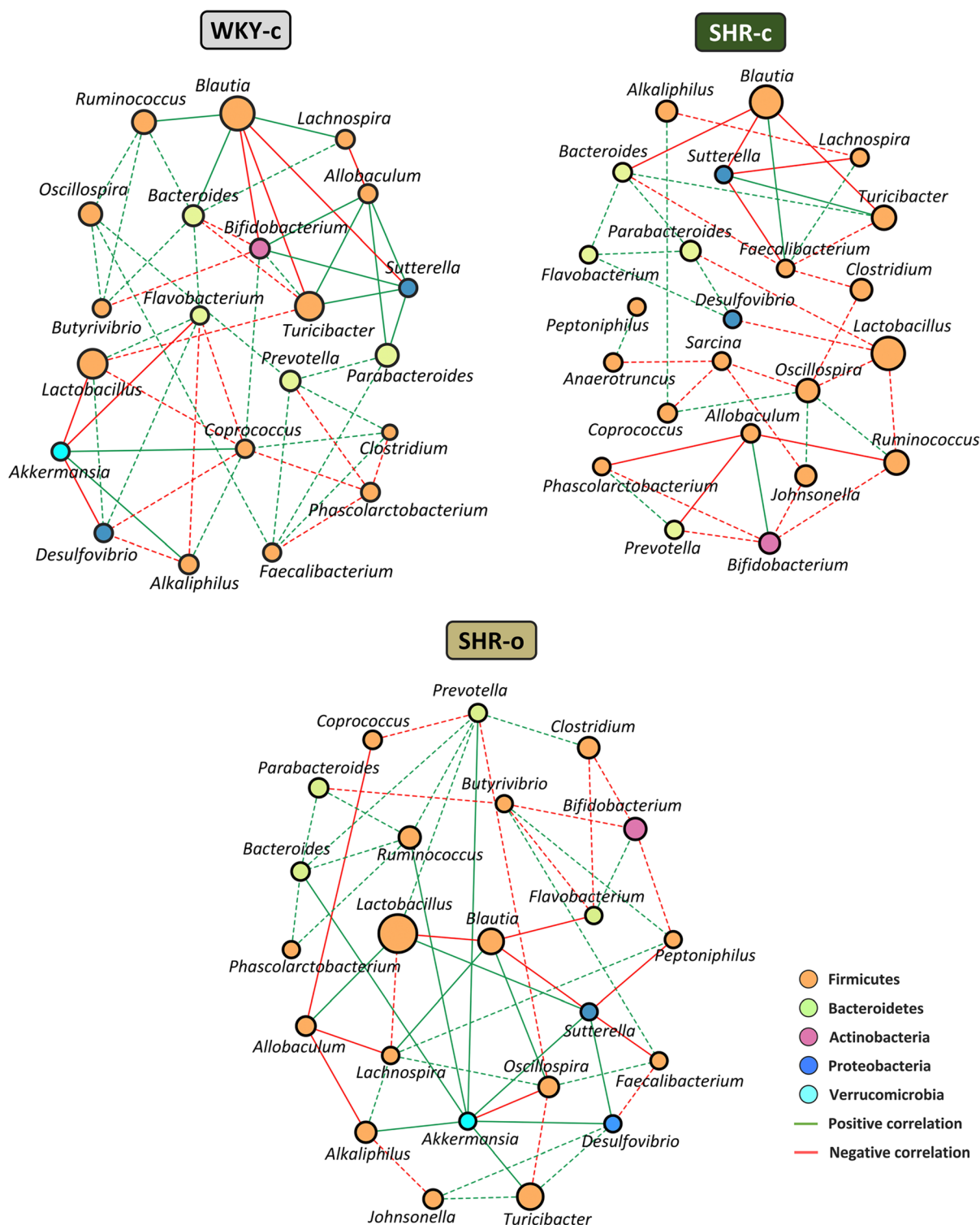


**Fig. 5** Effect of the daily consumption of Arbequina table olives (AO) for 49 days on (A) relative abundance at the genus level; and (B) species, in SHR faecal microbiota. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the relative abundance and differences between SHR-c ( $n = 7$ ) and SHR-o ( $n = 6$ ) were analysed by *t*-Student or the Mann–Whitney *U* test. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  indicate statistically significant differences.

expression of tight-junction proteins (which regulate epithelial permeability) in the large intestine<sup>38</sup> and negatively correlated with proinflammatory cytokines present in the blood.<sup>39</sup>

We also observed that AO supplementation reduced the faecal abundance of *Ruminococcus* and *Oscillospira*, both

related to the production of trimethylamine, involved in the development of atherosclerosis.<sup>40,41</sup> The abundance of *Ruminococcus* is positively correlated with SBP<sup>27</sup> and atrial fibrillation.<sup>42</sup> On the other hand, the abundance of *Oscillospira* is positively correlated with hypertension, as



**Fig. 6** Co-occurrence network plots of the Spearman rank correlation among key genera. Faecal microbiota was analysed in WKY-c and SHR-c that were orally administered with water for 7 weeks as well as SHR-o supplemented by gavage with Arbequina table olives (AO) during the same experimental period. Genera are linked when the correlation is significant ( $p < 0.05$ ). Node size indicates relative abundance.

shown in a Wistar rat model of obesity and metabolic syndrome<sup>27</sup> and in the spontaneously hypertensive heart failure rat model.<sup>23</sup> These results suggest that the effect of AO sup-

plementation in reducing the abundances of *Ruminococcus* and *Oscillospira* may contribute to the prevention of cardiovascular disease.

AO promoted the growth of probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Its effects on increasing the abundance of *Lactobacillus acidophilus* may be relevant because, as shown in a clinical trial with elderly patients, this species was related to a reduction in BP and the restoration of plasma concentrations of total cholesterol, triglycerides, LDL, and HDL.<sup>43</sup> In SHR, Hidalgo *et al.*<sup>29</sup> showed that olive oil supplementation lowered systolic BP, an effect that correlated well with a higher abundance of *Lactobacillus* in the gut microbiota. Pentacyclic triterpenes from *Olea europaea* L. also promote the growth of *Lactobacillus*<sup>44</sup> therefore, an effect of these bioactive compounds cannot be excluded. In our study, the increased abundance of *Lactobacillus acidophilus* was paralleled by an increase in *Allobaculum*, as described by Mendes *et al.*<sup>45</sup>

AO supplementation increased the abundance of probiotic *Bifidobacterium*, an effect also observed in animals supplemented with olive oil.<sup>46</sup> The genus *Bifidobacterium* has also been associated with protective effects against hypertension in SHR.<sup>27</sup> AO increased the abundance of *Bifidobacterium animalis*, which may be relevant because it upregulates the release of anti-inflammatory cytokines in the human intestinal HT-29 cell line.<sup>47</sup> In addition, *Bifidobacterium animalis* can promote acetate production and regulate the Gpr43 receptor involved in BP regulation.<sup>48</sup>

The co-occurrence network has allowed us to study the interactions between microorganisms within the microbial community of each group, and to identify the number of relationships that a taxon establishes within the community, independently of its abundance.<sup>49</sup> Genera with similar abundance have been observed in WKY-c and SHR-c, although the interaction between taxons was different. In SHR-c, bacteria belonging to the phylum Firmicutes, namely, *Coprococcus*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Lactobacillus*, *Allobaculum*, and *Alkaliphilus* have fewer connections with other bacteria and mainly establish competitive relationships. In addition, bacteria from the phylum Bacteroidetes associated with normal BP values, show a lower number of interactions within the SHR-c microbiota. Likewise, it was observed that *Sutterella*, also associated with a normotensive state, establishes cooperative relationships in WKY-c, while in SHR-c its role is mainly competitive. AO supplementation for 7 weeks has generated changes in the interactions of the SHR-o microbiota. An increase in the number of bacteria with significant participation within the community as well as the cooperative relationships between taxa was found. On the other hand, in addition to changes in the relative abundance of some genera, AO supplementation has modified the relationship of some bacteria. For example, in the SHR-o group, *Lactobacillus* shows symbiotic relationships, while in SHR-c their interactions were clearly competitive. In addition to increasing the abundance of *Akkermansia*, the AO supplementation favoured a higher connection in the microbiota of the treated animals. The co-occurrence study indicates that AO supplementation promotes greater interaction between the genera associated with normal BP with the rest of the microorganisms in the bacterial community.

Since the antihypertensive effect of olive components is associated with the reduction of oxidative and inflammatory status,<sup>50,52</sup> as well as with the regulation of the renin-angiotensin system (RAS) in SHR,<sup>50,51</sup> we have included in our study the analysis of plasma concentrations of MDA, ANG II, IL6, and TNF- $\alpha$ .

Our results showed a higher concentration of MDA in SHR-c compared to WKY-c at 21 weeks of age, which is consistent with previous findings indicating that SHR develops high BP concomitantly with an increase of oxidative stress markers.<sup>50</sup> We also observed that plasma concentration of ANG II in SHR-c is 3-fold higher than that in WKY-c as previously reported.<sup>54</sup> Moreover, the supplementation with AO elicited a decrease in the plasmatic concentrations of MDA (39%) and ANG II (32%) in SHR-o compared to SHR-c. These results are consistent with other studies indicating that an antihypertensive effect in SHR rats is related to a decrease in oxidative stress biomarkers after the administration of an extra-virgin olive oil enriched with polyphenols<sup>51</sup> and an oleuropein-enriched olive leaf extract.<sup>52</sup>

Given the implication of the gut microbiota on blood pressure,<sup>34</sup> we performed a correlation analysis between bacterial taxa and the concentrations of MDA and ANG II. The relationship between bacterial taxa with MDA and ANG II showed a similar trend as that described for faecal microbiota and BP. Among the bacteria associated to MDA and ANG II, the AO supplementation reduced the relative abundance of *Blautia* and increased the relative abundance of the genera *Allobaculum* and *Sutterella*, as well as the species *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium thermacidophilum*, all inversely associated with MDA. In addition, the relative abundance of *Akkermansia* and the species *Akkermansia muciniphila*, inversely related to the concentrations of MDA and ANG II, increased in the supplemented group. It is noteworthy that an association between *Akkermansia* and the RAS system has been described previously.<sup>53</sup>

Among the effects of ANG II that are linked to hypertension, it is known that this hormone is able to activate the MAPK pathway through the ATR1 receptor, and initiate the signalling cascade leading to the production of proinflammatory cytokines.<sup>52,54</sup> However, in our study, despite observing a higher plasma ANG II concentration in SHR-c, no differences in plasmatic concentration of IL6 and TNF- $\alpha$  were observed in any group of rats. Similar results were reported for ANG II and inflammatory cytokines in plasma from WKY and SHR rats by Vazquez *et al.*<sup>51</sup>

## 5. Conclusions

In conclusion, our results show that AO supplementation has prebiotic effects, inducing a microbiota profile compatible with its reported antihypertensive activity, which is accompanied by a reduction in plasma MDA and ANG II. Dietary AO also stimulates the growth of probiotic species of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* as well as taxa, such as *Akkermansia*, *Allobaculum*, and *Sutterella*, known for

their antihypertensive and cardioprotective properties. These results support the view that regular consumption of table olives may have beneficial health effects.

## Author contributions

Joana M. Planas: Conceptualization, methodology, formal analysis, resources, writing-original draft, writing-review and editing, supervision, funding acquisition. Miquel Moretó: Conceptualization, methodology, formal analysis, resources, writing-original draft, writing-review and editing. Aldo Gómez-Contreras: Investigation, formal analysis, writing-original draft, writing-review and editing. M. Emília Juan: Investigation, formal analysis, writing-review and editing. Lluïsa Miró: Investigation, writing-review and editing. Talia Franco-Ávila: Investigation, writing-review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Data availability statement

Data for this paper, including body weight, food and water consumption, blood pressure, heart rate, malondialdehyde and 16S rRNA gene raw reads are available at the Science Data Bank at <https://www.doi.org/10.57760/sciencedb.06495>.

## Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

## Acknowledgements

This research was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-41188) and the Generalitat de Catalunya (2017SGR945). We thank Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC), Ministerio de Educación- (Perú) for supporting Aldo Gómez-Contreras with a pre-doctoral fellowship, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (México) for supporting Talia Franco-Ávila with a pre-doctoral fellowship. The authors thank Prof. Juan Carlos Laguna-Egea for providing the equipment to measure the BP. The Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB) is Maria de Maeztu Unit of Excellence (grant CEX2021-001234-M) funded by Ministerio de Ciencia e Innovación (España).

## References

- 1 R. M. Carey, P. Muntner, H. B. Bosworth and P. K. Whelton, Prevention and control of hypertension: JACC Health Promotion Series, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2018, **72**, 1278–1293.
- 2 M. Guasch-Ferré and W. C. Willett, The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview, *J. Intern. Med.*, 2021, **290**, 549–566.
- 3 M. A. Martínez-González, A. Gea and M. Ruiz-Canela, The Mediterranean diet and cardiovascular health, *Circ. Res.*, 2019, **124**, 779–798.
- 4 J. M. Lou-Bonafonte, C. Arnal, M. A. Navarro and J. Osada, Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2012, **56**, 1043–1057.
- 5 S. Terés, G. Barceló-Coblijn, M. Benet, R. Alvarez, R. Bressani, J. E. Halver and P. V. Escribá, Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 13811–13816.
- 6 M. Domènech, P. Roman, J. Lapetra, F. J. García de la Corte, A. Sala-Vila, R. de la Torre, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, R. M. Lamuela-Raventós, E. Toledo, R. Estruch, A. Coca and E. Ros, Mediterranean diet reduces 24-hour ambulatory blood pressure, blood glucose, and lipids: One-year randomized, clinical trial, *Hypertension*, 2014, **64**, 69–76.
- 7 Regulation EU, 432/2012, Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health, *Off. J. Eur. Union*, 2012, **L136**, 1–40.
- 8 P. Otero, P. Garcia-Oliveira, M. Carpena, M. Barral-Martinez, F. Chamorro, J. Echave, P. Garcia-Perez, H. Cao, J. Xiao, J. Simal-Gandara and M. A. Prieto, Applications of by-products from the olive oil processing: Revalorization strategies based on target molecules and green extraction technologies, *Trends Food Sci. Technol.*, 2021, **116**, 1084–1104.
- 9 T. B. Ribeiro, C. M. Costa, T. Bonifácio-Lopes, S. Silva, M. Veiga, A. R. Monforte, J. Nunes, A. A. Vicente and M. Pintado, Prebiotic effects of olive pomace powders in the gut: In vitro evaluation of the inhibition of adhesion of pathogens, prebiotic and antioxidant effects, *Food Hydrocolloids*, 2021, **112**, 106312.
- 10 L. Nissen, F. Casciano, E. Chiarello, M. Di Nunzio, A. Bordoni and A. Gianotti, Colonic in vitro model assessment of the prebiotic potential of bread fortified with polyphenols rich olive fiber, *Nutrients*, 2021, **13**, 787.
- 11 Y. Fan and O. Pedersen, Gut microbiota in human metabolic health and disease, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, **19**, 55–71.
- 12 I. Robles-Vera, M. Toral and J. Duarte, Microbiota and hypertension: role of the sympathetic nervous system and the immune system, *Am. J. Hypertens.*, 2020, **33**, 890–901.
- 13 T. A. Cookson, Bacterial-induced blood pressure reduction: mechanisms for the treatment of hypertension via the gut, *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, **8**, 721393.
- 14 T. Franco-Ávila, R. Moreno-González, M. E. Juan and J. M. Planas, Table olive elicits antihypertensive activity in

- spontaneously hypertensive rats, *J. Sci. Food Agric.*, 2023, **103**, 64–72.
- 15 H. Ohkawa, N. Ohishi and K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 1979, **95**, 351–358.
  - 16 Q. Wang, G. M. Garrity, J. M. Tiedje and J. R. Cole, Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 5261–5267.
  - 17 P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.*, 2003, **13**, 2498–2504.
  - 18 F. M. Abboud, M. Z. Cicha, A. Ericsson, M. W. Chapleau and M. V. Singh, Altering early life gut microbiota has long-term effect on immune system and hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Front. Physiol.*, 2021, **12**, 752924.
  - 19 H. Guo, Y. Hao, X. Fan, A. Richel, N. Everaert, X. Yang and G. Ren, Administration with quinoa protein reduces the blood pressure in spontaneously hypertensive rats and modifies the fecal microbiota, *Nutrients*, 2021, **13**, 2446.
  - 20 I. Robles-Vera, M. Toral, N. de La Visitacion, M. Sánchez, M. Gómez-Guzmán, R. Muñoz, F. Algieri, T. Vezza, R. Jiménez, J. Gálvez, M. Romero, J. M. Redondo and J. Duarte, Changes to the gut microbiota induced by losartan contributes to its antihypertensive effects, *Br. J. Pharmacol.*, 2020, **177**, 2006–2023.
  - 21 W. J. Xia, M. L. Xu, X. J. Yu, M. M. Du, X. H. Li, T. Yang, L. Li, Y. Li, K. B. Kang, Q. Su, J. X. Xu, X. L. Shi, X. M. Wang, H. B. Li and Y. M. Kang, Antihypertensive effects of exercise involve reshaping of gut microbiota and improvement of gut-brain axis in spontaneously hypertensive rat, *Gut Microbes*, 2021, **13**, 1–24.
  - 22 C. Wan, C. Zhu, G. Jin, M. Zhu, J. Hua and Y. He, Analysis of gut microbiota in patients with coronary artery disease and hypertension, *J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, 2021, **2021**, 7195082.
  - 23 E. Gutiérrez-Calabrés, A. Ortega-Hernández, J. Modrego, R. Gómez-Gordo, A. Caro-Vadillo, C. Rodríguez-Bobada, P. González and D. Gómez-Garre, Gut microbiota profile identifies transition from compensated cardiac hypertrophy to heart failure in hypertensive rats, *Hypertension*, 2020, **76**, 1545–1554.
  - 24 S. Adnan, J. W. Nelson, N. J. Ajami, V. R. Venna, J. F. Petrosino, R. M. Bryan Jr. and D. J. Durgan, Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats, *Physiol. Genomics*, 2017, **49**, 96–104.
  - 25 B. J. H. Verhaar, A. Prodan, M. Nieuwdorp and M. Muller, Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: A Review, *Nutrients*, 2020, **12**, 2982.
  - 26 X. Dan, Z. Mushi, W. Baili, L. Han, W. Enqi, Z. Huanhu and L. Shuchun, Differential analysis of hypertension-associated intestinal microbiota, *Int. J. Med. Sci.*, 2019, **16**, 872–881.
  - 27 F. S. Thomaz, F. Altemani, S. K. Panchal, S. Worrall and M. Dekker Nitert, The influence of wasabi on the gut microbiota of high-carbohydrate, high-fat diet-induced hypertensive Wistar rats, *J. Hum. Hypertens.*, 2021, **35**, 170–180.
  - 28 L. Serra-Majem, L. Tomaino, S. Dernini, E. M. Berry, D. Lairon, J. Ngo de la Cruz, A. Bach-Faig, L. M. Donini, F.-X. Medina, R. Belahsen, S. Piscopo, R. Capone, J. Aranceta-Bartrina, C. La Vecchia and A. Trichopoulou, Updating the Mediterranean diet pyramid towards sustainability: Focus on environmental concerns, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, **17**, 8758.
  - 29 M. Hidalgo, I. Prieto, H. Abriouel, A. B. Villarejo, M. Ramírez-Sánchez, A. Cobo, N. Benomar, A. Gálvez and M. Martínez-Cañamero, Changes in gut microbiota linked to a reduction in systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats fed an extra virgin olive oil-enriched diet, *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2018, **73**, 1–6.
  - 30 G. Marcelino, P. A. Hiane, K. d. C. Freitas, L. F. Santana, A. Pott, J. R. Donadon and R. d. C. A. Guimarães, Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota, *Nutrients*, 2019, **11**, 1826.
  - 31 A. Cortés-Martín, M. V. Selma, F. A. Tomás-Barberán, A. González-Sarrías and J. C. Espín, Where to look into the puzzle of polyphenols and health? The postbiotics and gut microbiota associated with human metabolites, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2020, **64**, e1900952.
  - 32 Q. Sun, M. He, M. Zhang, S. Zeng, L. Chen, L. Zhou and H. Xu, Ursolic acid: A systematic review of its pharmacology, toxicity and rethink on its pharmacokinetics based on PK-PD model, *Fitoterapia*, 2020, **147**, 104735.
  - 33 Q. Zhou, G. Pang, Z. Zhang, H. Yuan, C. Chen, N. Zhang, Z. Yang and L. Sun, Association between gut *Akkermansia* and metabolic syndrome is dose-dependent and affected by microbial Interactions: A cross-sectional study, *Diabetes, Metab. Syndr. Obes.: Targets Ther.*, 2021, **14**, 2177–2188.
  - 34 T. Yang, M. M. Santisteban, V. Rodriguez, E. Li, N. Ahmari, J. M. Carvajal, M. Zadeh, M. Gong, Y. Qi, J. Zubcevic, B. Sahay, C. J. Pepine, M. K. Raizada and M. Mohamadzadeh, Gut dysbiosis is linked to hypertension, *Hypertension*, 2015, **65**, 1331–1340.
  - 35 U. Etxeberria, N. Arias, N. Boqué, M. T. Macarulla, M. P. Portillo, J. A. Martínez and F. I. Milagro, Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats, *J. Nutr. Biochem.*, 2015, **26**, 651–660.
  - 36 H. L. Greetham, G. R. Gibson, C. Giffard, H. Hippe, B. Merkhoffer, U. Steiner, E. Falsen and M. D. Collins, *Allobaculum stercoricanis* gen. nov., sp. nov., isolated from canine feces, *Anaerobe*, 2004, **10**, 301–307.
  - 37 X. Zhang, Y. Zhao, M. Zhang, X. Pang, J. Xu, C. Kang, M. Li, C. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhang, X. Li, G. Ning and L. Zhao, Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats, *PLoS One*, 2012, **7**, e42529.

- 38 Y. Chen, B. Yang, C. Stanton, R. P. Ross, J. Zhao, H. Zhang and W. Chen, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ameliorates DSS-induced colitis by maintaining intestinal mechanical barrier, blocking proinflammatory cytokines, inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling, and altering gut microbiota, *J. Agric. Food Chem.*, 2021, **69**, 1496–1512.
- 39 Y. Yue, Z. He, Y. Zhou, R. P. Ross, C. Stanton, J. Zhao, H. Zhang, B. Yang and W. Chen, *Lactobacillus plantarum* relieves diarrhea caused by enterotoxin-producing *Escherichia coli* through inflammation modulation and gut microbiota regulation, *Food Funct.*, 2020, **11**, 10362–10374.
- 40 Z. Wang, A. B. Roberts, J. A. Buffa, B. S. Levison, W. Zhu, E. Org, X. Gu, Y. Huang, M. Zamanian-Daryoush, M. K. Culley, A. J. DiDonato, X. Fu, J. E. Hazen, D. Krajcik, J. A. DiDonato, A. J. Luisis and S. L. Hazen, Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis, *Cell*, 2015, **163**, 1585–1595.
- 41 C. Ishii, Y. Nakanishi, S. Murakami, R. Nozu, M. Ueno, K. Hioki, W. Aw, A. Hirayama, T. Soga and M. Ito, A metagenomic approach reveals changes in the intestinal environment of mice fed on American diet, *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, **19**, 4079.
- 42 K. Zuo, J. Li, K. Li, C. Hu, Y. Gao, M. Chen, R. Hu, Y. Liu, H. Chi, H. Wang, Y. Qin, X. Liu, S. Li, J. Cai, J. Zhong and X. Yang, Disordered gut microbiota and alterations in metabolic patterns are associated with atrial fibrillation, *GigaScience*, 2019, **8**, giz058.
- 43 A. F. G. Cicero, F. Fogacci, M. Bove, M. Giovannini and C. Borghi, Impact of a short-term synbiotic supplementation on metabolic syndrome and systemic inflammation in elderly patients: A randomized placebo-controlled clinical trial, *Eur. J. Nutr.*, 2021, **60**, 655–663.
- 44 C. Xue, Y. Li, H. Lv, L. Zhang, C. Bi, N. Dong, A. Shan and J. Wang, Oleanolic acid targets the gut-liver axis to alleviate metabolic disorders and hepatic steatosis, *J. Agric. Food Chem.*, 2021, **69**, 7884–7897.
- 45 M. C. S. Mendes, D. S. M. Paulino, S. R. Brambilla, J. A. Camargo, G. F. Persinoti and J. B. C. Carnevali, Microbiota modification by probiotic supplementation reduces colitis associated colon cancer in mice, *World J. Gastroenterol.*, 2018, **24**, 1995–2008.
- 46 Z. Zhao, A. Shi, Q. Wang and J. R. Zhou, High oleic acid peanut oil and extra virgin olive oil supplementation attenuate metabolic syndrome in rats by modulating the gut microbiota, *Nutrients*, 2019, **11**, 3005.
- 47 I. Presti, G. D'Orazio, M. Labra, B. La Ferla, V. Mezzasalma, G. Bizzaro, S. Giardina, A. Michelotti, F. Tursi, M. Vassallo and P. Di Gennaro, Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, **99**, 5613–5626.
- 48 H. Horiuchi, K. Kamikado, R. Aoki, N. Suganuma, T. Nishijima, A. Nakatani and I. Kimura, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, GCL2505 modulates host energy metabolism via the short-chain fatty acid receptor GPR43, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 4158.
- 49 A. Barberán, S. T. Bates, E. O. Casamayor and N. Fierer, Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities, *ISME J.*, 2012, **6**, 343–351.
- 50 M. Massaro, E. Scoditti, M. A. Carluccio, N. Calabriso, G. Santarpino, T. Verri and R. De Caterina, Effects of olive oil on blood pressure: epidemiological, clinical, and mechanistic evidence, *Nutrients*, 2020, **12**, 1548.
- 51 A. Vazquez, E. Sanchez-Rodriguez, F. Vargas, S. Montoro-Molina, M. Romero, J. A. Espejo-Calvo, P. Vilchez, S. Jaramillo, L. Olmo-García, A. Carrasco-Pancorbo, R. de la Torre, M. Fito, M. I. Covas, E. Martínez de Victoria and M. D. Mesa, Cardioprotective effect of a virgin olive oil enriched with bioactive compounds in spontaneously hypertensive rats, *Nutrients*, 2019, **11**, 1728.
- 52 M. Romero, M. Toral, M. Gómez-Guzmán, R. Jiménez, P. Galindo, M. Sánchez, M. Olivares, J. Gálvez and J. Duarte, Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats, *Food Funct.*, 2016, **7**, 584–593.
- 53 A. P. Lakshmanan, S. Murugesan, S. Al Khodor and A. Terranegra, The potential impact of a probiotic: *Akkermansia muciniphila* in the regulation of blood pressure—the current facts and evidence, *J. Transl. Med.*, 2022, **20**, 430.
- 54 D. Xie, Y. Shen, E. Su, L. Du, J. Xie and D. Wei, The effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide VGINYW and the hydrolysate of  $\alpha$ -lactalbumin on blood pressure, oxidative stress and gut microbiota of spontaneously hypertensive rats, *Food Funct.*, 2022, **13**, 2743–2755.