

Conocimiento de la acción biológica del aceite de oliva virgen extra mediante el uso del ratón carente de la apolipoproteína E

Natalia Guillén^{a,b}, Sergio Acín^b, María Á. Navarro^{a,b}, Joaquín Carlos Surra^{a,b}, Carmen Arna^{l,a,c}, José Manuel Lou-Bonafonte^d, Pedro Muniesa^{a,e}, María Victoria Martínez-Gracia^a y Jesús Osada^{a,b}

^aCIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

^bDepartamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Universidad de Zaragoza-Dirección Salud del Gobierno de Aragón. Zaragoza. España.

^cDepartamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

^dDepartamento de Farmacología y Fisiología. Facultad de Ciencias de la Salud y el Deporte. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

^eDepartamento de Anatomía y Embriología y Genética Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

La baja incidencia de enfermedades cardiovasculares en los países de la Cuenca Mediterránea, donde el aceite de oliva es la principal fuente de grasa en la alimentación, ha motivado un mejor conocimiento de su composición química y el desarrollo de aceites enriquecidos en sus componentes minoritarios. En esta revisión se recopilan los efectos de diferentes preparaciones del aceite de oliva sobre el desarrollo de la aterosclerosis y el valor pronóstico para la enfermedad de los parámetros plasmáticos mediante el empleo de un ratón modificado genéticamente en el que ésta se desarrolla espontáneamente. Las limitaciones del modelo por sus diferencias morfológicas y fisiológicas con el hombre se minimizan ante la similitud de ambos genomas y el avance de conocimiento que posibilita, ya que efectuar en humanos las intervenciones recopiladas habría requerido 400 años. Confirmando la tradición de los pueblos mediterráneos, se ha verificado la eficacia del aceite de oliva virgen consumido prudentemente y en dietas con bajo contenido en colesterol por la relativa escasez de productos de origen animal. Además, la exploración con herramientas de genómica ha identificado nuevos marcadores de respuesta al aceite. En conclusión, la investigación multidisciplinaria del aceite de oliva virgen extra permite ampliar el conocimiento de sus propiedades biológicas.

Palabras clave: Ratón carente de apolipoproteína E. Aceite de oliva. Aterosclerosis. Lipoproteínas.

Knowledge of the Biological Actions of Extra Virgin Olive Oil Gained From Mice Lacking Apolipoprotein E

The low incidence of cardiovascular disease in countries bordering the Mediterranean basin, where olive oil is the main source of dietary fat, has stimulated interest in the chemical composition of olive oil and in the production of other oils enriched with its minor components. This review summarizes what has been learned about the effects of different olive oil preparations on the development of atherosclerosis and about the prognostic value of associated plasma variables in the disease from experiments on genetically modified mice that spontaneously develop atherosclerosis. The limitations of this animal model associated with its morphological and physiological differences with humans are minimized by the similarity of the two genomes and by the potential for increased understanding attainable, given that the dietary interventions reported here would have taken 400 years to achieve in humans. As observed in traditional Mediterranean populations, it has been confirmed that extra virgin olive oil is beneficial when consumed judiciously and in a diet that is low in cholesterol due to the relative scarcity of animal products. Furthermore, the use of genomic techniques has led to the identification of new markers of response to olive oil. In conclusion, multidisciplinary research into extra virgin olive oil is expanding our knowledge of the substance's biological properties.

Key words: Apolipoprotein E deficient mice. Olive oil. Atherosclerosis. Lipoproteins.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

Los trabajos llevados a cabo por este grupo de investigación están financiados por el FEDER-CICYT (SAF2007-60173), Redes DGA (B-69) y FISS de investigación cooperativa C03-01 y G03-140 y por la Fundación Española del Corazón. S.A. y N.G. recibieron becas del Gobierno de Aragón y de la Fundación Cuenca Villoro.

Correspondencia: Dr. J. Osada.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. España.
Correo electrónico: Josada@unizar.es

UNA NUEVA HERRAMIENTA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Con la reciente concesión del premio Nobel de Medicina a los padres de la generación de ratones carentes de genes (Capechi, Evans y Smithies), toda

ABREVIATURAS

apoE: apolipoproteína E.
 HDL: lipoproteínas de alta densidad.
 LDL: lipoproteínas de baja densidad.
 VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

la sociedad ha reconocido la existencia de una herramienta poderosísima para avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de las enfermedades y en la verificación de la eficacia y la seguridad de los tratamientos antes de su empleo en humanos¹. Además, la secuenciación del genoma del ratón², con una asombrosa similitud al humano, ha evidenciado que los genes de las principales funciones vitales están muy conservados y que, por lo tanto, se pueden obtener avances importantes mediante el uso de un animal tan versátil como el ratón.

La presente revisión pretende recoger algunas enseñanzas obtenidas en los últimos 10 años utilizando este tipo de animales en una investigación centrada en el aceite de oliva virgen y la aterosclerosis.

EL RATÓN CARENTE DE LA APOLIPOPROTEÍNA E

La generación del ratón carente de la apolipoproteína E (apoE) ha sido una de las más importantes contribuciones al avance de la investigación en aterosclerosis en los últimos 15 años³. Fue llevada a cabo por investigadores de tres laboratorios independientes que inactivaron el gen de la apoE en células totipotenciales embrionarias y generaron el correspondiente ratón carente del gen⁴⁻⁶. Esta mutación se segregaba según el modelo mendeliano y los animales homocigotos para el gen inactivado tenían una viabilidad del 100%.

La ausencia de la apoE impide que las partículas remanentes de los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) puedan eliminarse por el hígado, por lo que se acumulan en el plasma y finalmente se depositan en el espacio subendotelial de las paredes arteriales. Por ello, en el ratón deficiente en apoE alimentado con la dieta normal del ratón, se desarrolla una extensa aterosclerosis fibroproliferativa espontánea⁷ que presenta la misma secuencia de formación de la lesión establecida en otros modelos animales y en humanos. La complejidad de las lesiones y su facilidad de generación espontánea en un corto periodo de tiempo en el ratón deficiente en apoE, junto con la semejanza del modelo con la enfermedad humana, lo convierten en un sistema atractivo para estudiar los

factores predisponentes, tanto ambientales como genéticos, de la aterosclerosis^{8,9}.

Entre los factores ambientales, hay que destacar la dieta como uno de los más importantes. En este campo, el empleo del ratón carente de la apoE está aportando una importante valoración biológica de la influencia de los diferentes componentes de la dieta en el desarrollo de la arteriosclerosis y de los mecanismos implicados, tal como se ha recogido en sendas revisiones anteriores^{10,11}.

EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA Y LOS ACEITES Y GRASAS CONSUMIDOS POR EL SER HUMANO

La figura 1 recoge la composición media de ácidos grasos presentes en los triglicéridos de algunos aceites y grasas usados para el consumo humano. Los más consumidos actualmente en el mundo son: el aceite de soja (el 26% de la población mundial lo usa), el de palma (18%), el de girasol (13%) y el de colza-canola (12%). Todos estos aceites se obtienen por extracción química de las correspondientes semillas, y con excepción de la vitamina E que se solubiliza en el procedimiento de extracción, los triglicéridos son los determinantes de la acción biológica. Según la saturación de los ácidos grasos predominantes en dichos compuestos, se han clasificado como grasas saturadas, con ácidos grasos saturados (sólidas a temperatura ambiente) y aceites monoinsaturados y poliinsaturados por la presencia de este tipo de ácidos grasos (líquidos). Esta simple manera de agrupación de grasas y aceites en tres categorías (fig. 1) ha sido muy empleada y ha explicado relativamente bien propiedades tales como el efecto hipercolesterolemizante de la grasa saturada y el efecto hipocolesterolemizante de los aceites poliinsaturados. Con el mejor conocimiento de las estructuras y las propiedades de los ácidos grasos, se ha confirmado que no todos los ácidos grasos saturados (longitud de la cadena) ni todos los poliinsaturados (la posición del último doble enlace en la cadena, n-3 o n-6, y la configuración cis o trans de algunos dobles enlaces) poseen el mismo efecto. Han tratado en profundidad estos aspectos Rubio¹² y Surra et al¹³.

El aceite de oliva no es un aceite muy consumido en el mundo, pero ha sido la principal fuente de grasa en la alimentación clásica de la Cuenca Mediterránea, la conocida como dieta mediterránea. Las propiedades saludables de esta dieta se evidenciaron en el Estudio de los Siete Países, diseñado para investigar la relación entre la dieta y las enfermedades cardiovasculares en 14 poblaciones pertenecientes a siete países diferentes (Estados Unidos, Finlandia, Países Bajos, Yugoslavia, Italia, Grecia y Japón). Se encontró que los individuos

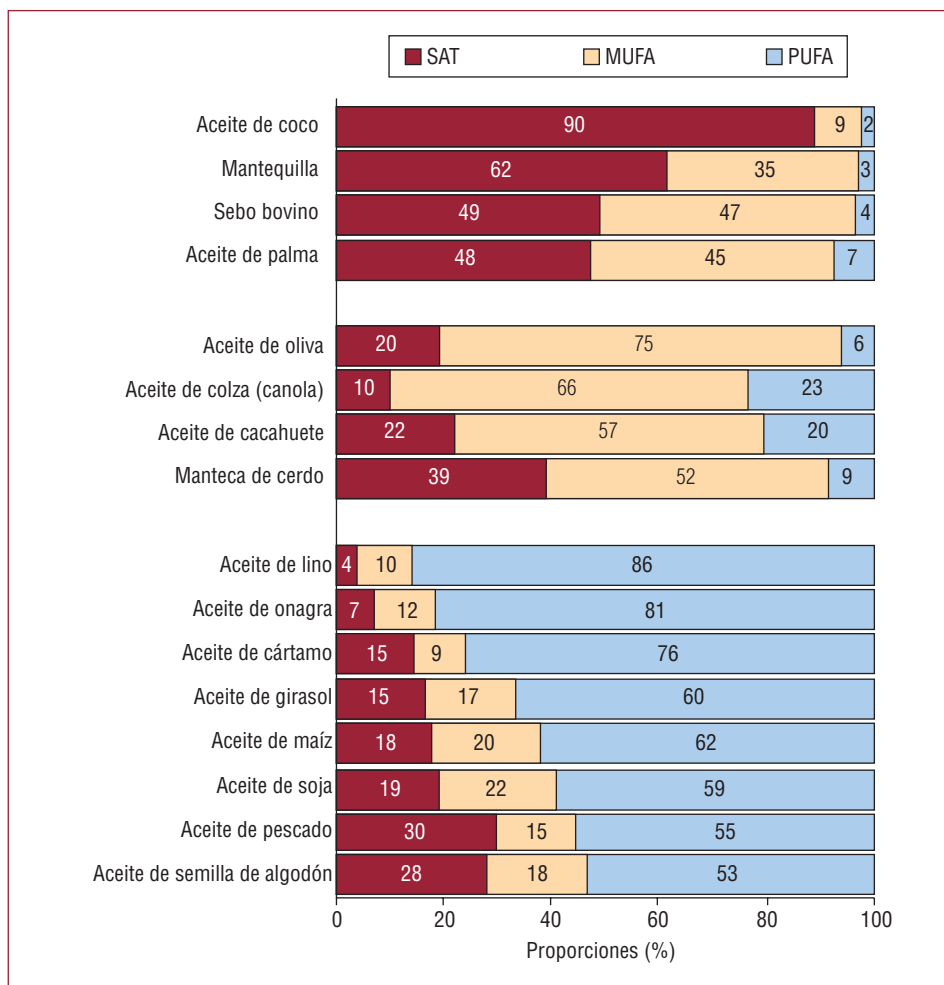


Fig. 1. Porcentaje de los distintos tipos de ácidos grasos presentes en los diferentes aceites y grasas. Los más consumidos en el mundo son: soja (el 26% de la población mundial lo usa), palma (18%), girasol (13%) y colza-canola (12%). Adaptado de Surra et al¹³, con permiso de Sociedad Española de Obesidad.

estudiados en Creta presentaban las menores tasas de enfermedad cardiovascular y cáncer comparados con las otras regiones del estudio¹⁴, y se concluyó que este hecho podía deberse al bajo consumo de grasas saturadas y al elevado consumo de ácido oleico, aportado por la ingesta de aceite de oliva. Más recientemente, los resultados obtenidos tras 25 años de seguimiento de los participantes de dicho estudio han indicado que la frecuencia de estas enfermedades continúa siendo menor en los países europeos del sur que en los del norte^{15,16}.

El primer estudio clínico que confirmó los beneficios de la dieta mediterránea fue el Lyon Diet Heart Study^{17,18}, en el cual 605 pacientes que habían sufrido infarto de miocardio fueron distribuidos al azar en dos grupos de ensayo, uno control con una dieta semejante a la recomendada por la Asociación Americana del Corazón y otro grupo con dieta mediterránea. Tras 27 meses de ensayo, los resultados obtenidos fueron un descenso en el grupo de dieta mediterránea del 73% en la tasa de eventos coronarios y del 70% de la mortalidad total. Otro ensayo, el Indo-Mediterráneo, estudió el efecto de una dieta de

tipo mediterráneo en la progresión de la enfermedad coronaria en pacientes de alto riesgo¹⁹. En ese estudio también se concluyó que una dieta de tipo mediterráneo podría ser más efectiva en la prevención primaria y secundaria de las enfermedades cardiovasculares que la dieta recomendada por el programa estadounidense de educación sobre colesterol.

En un estudio con más de 22.000 personas realizado en Grecia por Trichopoulou et al²⁰, se encontró igualmente que seguir la dieta mediterránea se relacionaba con una menor mortalidad total y menor mortalidad debida a enfermedades cardiovasculares.

Actualmente se está desarrollando en España un estudio de intervención para la prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares a través de la dieta mediterránea (PREDIMED), con 772 personas asintomáticas con alto riesgo cardiovascular distribuidas aleatoriamente en tres grupos de dieta: pobre en grasa, mediterránea con aceite de oliva virgen extra y mediterránea suplementada con frutos secos. Al cabo de los primeros 3 meses de intervención, se ha observado que los grupos que

reciben la dieta mediterránea presentan menores concentraciones plasmáticas de glucosa, menor relación colesterol/colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y reducida presión arterial sistólica, respecto al grupo que consume la dieta pobre en grasa²¹.

Todas estas evidencias han llevado a que la dieta mediterránea se convierta en un modelo dietético a pesar de su elevado contenido graso²². Esto le da un gran interés gastronómico por su mayor palatabilidad y por facilitar el consumo de productos vegetales con alto contenido en hidratos de carbono de baja carga glucémica²³. Desgraciadamente, en la actualidad esta dieta mediterránea considerada beneficiosa está siendo influida y modificada por una serie de factores como la globalización y el progreso tecnológico, que han conducido a una mayor disponibilidad de alimentos y menor actividad física²⁴. Los patrones dietéticos en los países mediterráneos están cambiando rápidamente, con un incremento del consumo de grasas saturadas y de hidratos de carbono refinados, con el consiguiente aumento de la obesidad en estas zonas. Distintos autores²⁵⁻²⁷ apuntan que sería necesario volver a hábitos alimentarios más moderados y equilibrados, y subrayan la importancia de preservar ciertas tradiciones dietéticas y de forma de vida que son una garantía para la salud de las generaciones venideras.

Debido a que el aceite de oliva es el componente que más calorías aporta en este tipo de dieta, conocer sus propiedades ha suscitado un creciente interés. El aceite de oliva virgen es el zumo del fruto de la *Olea europea* obtenido por procedimientos físicos y no requiere extracción como los aceites de semillas. Cuando dicho preparado posee unas características irreprochables al paladar de catadores entrenados y su acidez es < 1, se considera aceite de oliva virgen extra.

Los constituyentes del aceite de oliva virgen pueden dividirse en dos fracciones, la saponificable y la insaponificable²⁸⁻³¹.

La fracción saponificable representa en general del 98,5 al 99,5%, la mayor parte de la cual son triglicéridos y en menor medida, ácidos grasos libres junto con otros componentes minoritarios como monoglicéridos o diglicéridos, fosfátidos, ceras y ésteres de esteroides²⁸⁻³⁰. El aceite de oliva es rico en ácido oleico (monoinsaturado), contiene cantidades moderadas de ácidos palmítico y linoleico y un bajo porcentaje de ácidos esteárico y linoléico^{28,31}, tal como se ilustra en la tabla 1. La composición en ácidos grasos y de los demás componentes difiere de una muestra a otra, dependiendo de la zona de producción del aceite de oliva, el clima, el grado de madurez de las aceitunas y su variedad^{28,32}.

La fracción insaponificable está formada por los compuestos que se puede obtener tras la saponificación

TABLA 1. Porcentaje de los diferentes ácidos grasos presentes en el aceite de oliva^{28,31}

Nombre común (símbolo)	Porcentaje
Mirístico (14:0)	0,0-0,05
Palmítico (16:0)	7,5-20
Palmitoleico (16:1n7)	0,3-3,5
Margárico (17:0)	0-0,3
Heptadecenoico (17:1)	0-0,3
Esteárico (18:0)	0,5-5
Oleico (18:1n9)	55-83
Linoleico (18:2n6)	3,5-21
Alfalinoléico (18:3n3)	0-0,9
Araquídico (20:0)	0-0,6
Eicosenoico (20:1n9)	0-0,4
Behénico (22:0)	0-0,2
Lignocérico (24:0)	0-0,2

TABLA 2. Componentes minoritarios del aceite de oliva virgen^{31,34}

Componentes	Concentración (mg/100 g aceite)
Compuestos terpénicos	100-350
Esteroides	100-250
Hidrocarburos	
Escualeno	150-800
Carotenos	0,5-1
Compuestos fenólicos	5-100
Alcoholes alifáticos	10-70
Tocoferoles	0,5-30
Ésteres	10-20
Aldehídos y cetonas	4-8
Clorofilas	0,1-2

del aceite³³. Esta fracción, también denominada componentes minoritarios del aceite de oliva, contiene una gran variedad de compuestos que cumplen una amplia diversidad de funciones y mantienen la estabilidad del aceite y sus características organolépticas. Estos componentes minoritarios se pierden en gran medida durante los procesos de refinado³⁴ y, por lo tanto, no están presentes en aceites de oliva corrientes si no se enriquecen con aceite de oliva virgen. La caracterización y la determinación de estos compuestos constituyen un campo muy activo de investigación en la actualidad, que presenta además una gran complejidad. En la tabla 2 se recogen los principales grupos de compuestos, junto con su gama de concentraciones en el aceite de oliva virgen, y en la figura 2, aquellos que pueden poseer acciones biológicas^{31,35}.

El contenido total de compuestos terpénicos supone una de las fracciones más abundantes y pueden ser de estructura tetracíclica o pentacíclica. Entre éstos, destacan dos alcoholes, el uvaol y el eritrodol, y sus correspondientes ácidos, oleanólico y maslínico³⁵. Los esteroides más abundantes son el

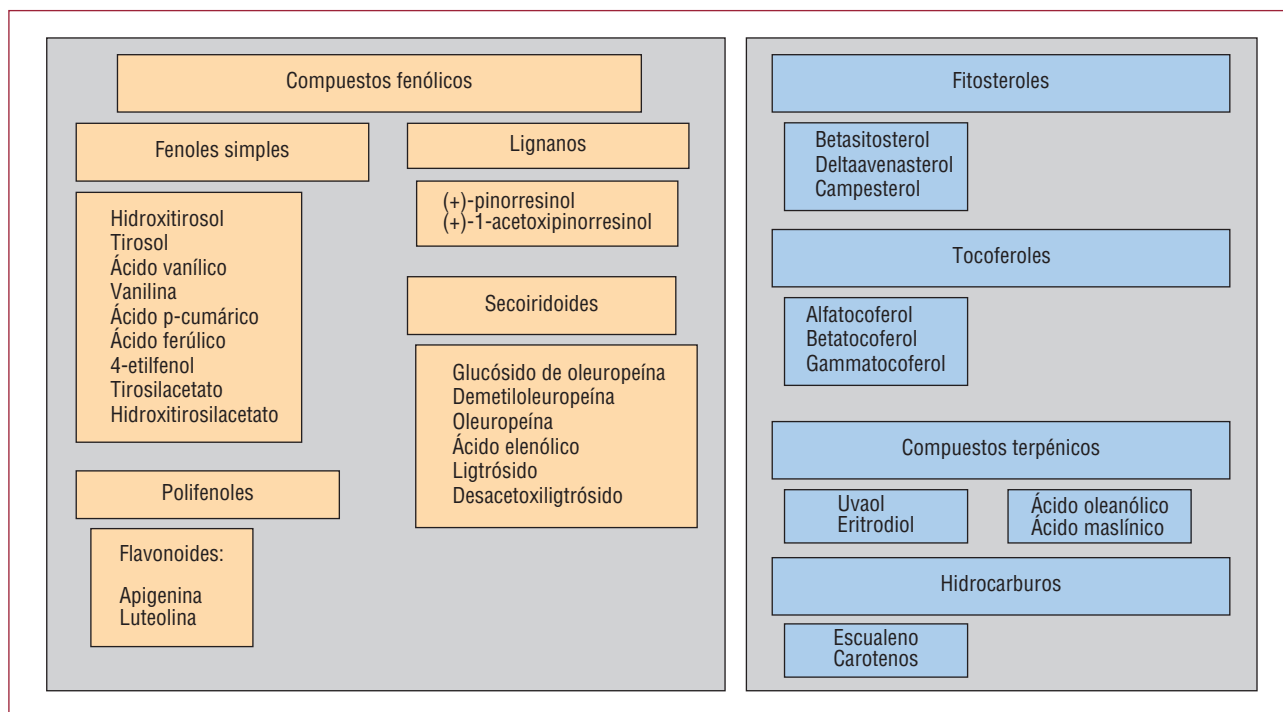


Fig. 2. Principales compuestos químicos presentes en el aceite de oliva virgen extra con propiedades biológicas agrupados por categorías.

betasitosterol (un 75-90% del total de esteroides), el Δ^5 -avenasterol (5-36%) y el campesterol (un 3%)³⁶.

Entre los hidrocarburos, destacan el escualeno principalmente y, en mucho menor cantidad, los carotenos (la luteína y el betacaroteno)³⁴.

Los compuestos fenólicos forman la fracción polar y afectan a la estabilidad y el sabor del aceite de oliva^{37,38}. Entre los compuestos fenólicos más frecuentes, podemos distinguir cuatro grandes grupos: *a*) los fenoles simples, ya sean alcoholes (tirosol e hidroxitirosol) o ácidos (p-cumárico, vanílico, cafeico, sináptico, protocatéquico, gálico, siríngico); *b*) los polifenoles (flavonoides: luteolina y apigenina), *c*) los secoiridoides (derivados esterificados del ácido elenólico —oleuropeína glucosilada o no— con el hidroxitirosol y con el tirosol), y *d*) los lignanos: (+)-pinorresinol y (+)-1-acetoxipinorresinol. Muchos de estos compuestos presentan propiedades antioxidantes y un alto contenido se asocia con una elevada resistencia a la oxidación de los aceites³⁹. La mayor contribución a este efecto se atribuye al hidroxitirosol²⁷, cuya concentración depende de la combinación de varios factores como la variedad, el grado de maduración de la aceituna, el clima y la preparación^{37,38}, ya que se pierde en los procesos de refinado²⁴.

La fracción de alcoholes alifáticos está constituida por alcoholes saturados de cadena lineal con un número par de átomos de carbono ¹⁸C a ²⁸C. Los mayoritarios son hexacosanol, octacosanol y

tetracosanol²⁴. Estos alcoholes, al igual que los esteroides y los alcoholes triterpénicos, pueden unirse con ácidos grasos y constituyen los ésteres no glicéridos.

Los tocoferoles, también integrantes de la fracción insaponificable, están en cantidades diferentes según la variedad de la aceituna⁴⁰. El más abundante entre ellos es el alfatocoferol (52-87%) y también están presentes el betatocoferol (15-20%) y el gammatocoferol (7-23%)²⁸.

Entre los aldehídos y las cetonas, se han identificado más de 100 tipos distintos³². Al igual que ocurre con otros compuestos, su presencia en los aceites depende de la variedad, las condiciones climáticas y la calidad del aceite³⁰. El aroma y el sabor del aceite de oliva virgen en parte se deben a la presencia de este tipo de compuestos químicos^{28,30}.

Las clorofilas, aunque en pequeña proporción, son junto con el licopeno y el betacaroteno el origen del color del aceite de oliva virgen³².

EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN DIETAS DE TIPO MEDITERRÁNEO

En nuestro laboratorio, para demostrar el efecto del aceite de oliva virgen extra en el desarrollo de la aterosclerosis, se han utilizado los ratones carentes de la apoE alimentados con dietas con un 10% (p/p) de dicho aceite y sin colesterol, en un intento de reproducir la clásica dieta mediterránea en la que la

principal fuente de grasa es ese aceite y el consumo de productos de origen animal es muy pequeño⁴¹. Para la elección de dicho porcentaje se tuvieron en cuenta dos criterios: en primer lugar, que en una investigación en ratas que consumieron dietas con diferentes porcentajes de aceite de oliva, el aporte del 10% (p/p) de dicho aceite era la dosis mínima necesaria para obtener un aumento significativo de la concentración plasmática de la apolipoproteína A-I (principal componente proteínico de las HDL)⁴². En segundo lugar, en la selección de dicho porcentaje intervino un enfoque metabólico de aproximación al consumo humano. Así, teniendo en cuenta que un ratón consume unos 3 g de pienso diarios y que éste posee un 10% (p/p) de aceite, nuestros ratones estarían ingiriendo 0,3 g de aceite diarios. Dado que cada animal pesa unos 30 g, la dosis consumida sería de 10 g de aceite/kg de peso del animal. Extrapolando sin ninguna transformación al peso promedio de un humano (70 kg), los ratones que pesasen como un humano estarían consumiendo 700 g de aceite por día. Si se tiene en cuenta que el tono metabólico en el ratón es 10 veces más elevado⁴³, esa cantidad ajustada equivaldría a 70 g de aceite por día en humanos. Si lo valoramos en términos energéticos, este consumo de 70 g de aceite/día supone una ingestión de 630 kcal (a razón de 9 kcal/g de grasa) que representan el 25% de una dieta de 2.500 kcal para una persona media, cifra inferior a la ingesta de aceite de oliva en la dieta mediterránea clásica, en la que el 35% (875 kcal) de las calorías totales proviene de dicho aceite⁴¹. Para alcanzar este nivel energético se necesitaría un aporte aproximado de 100 g/día en una dieta en que la fuente exclusiva de grasa fuese el aceite de oliva. Dado que esta condición no se cumple en la sociedad de consumo actual, la Food and Drug Administration de Estados Unidos ha sido más prudente al recomendar el consumo diario de 25 ml de aceite de oliva⁴⁴.

Estas dietas con un 10% (p/p) de aceite de oliva virgen extra y sin colesterol se administraron a ratones carentes de la apoE durante 12 semanas, y al cabo de ese periodo, se sacrificó a los animales y se cuantificó el grado de lesión aterosclerótica presente. En dicho estudio, la administración de ese porcentaje de aceite de oliva en la dieta retrasaba el desarrollo de la aterosclerosis, a lo que las hembras fueron más sensibles (fig. 3), y este hecho se asoció a un incremento de la concentración plasmática de apolipoproteína A-I⁴⁵.

En ese mismo estudio, se incluyó un grupo de animales alimentado con un porcentaje similar de aceite de girasol de alto contenido en ácido oleico, lo que hacía que estos animales recibiesen el mismo porcentaje de ácido oleico que los animales alimentados con el aceite de oliva virgen extra. A pesar del

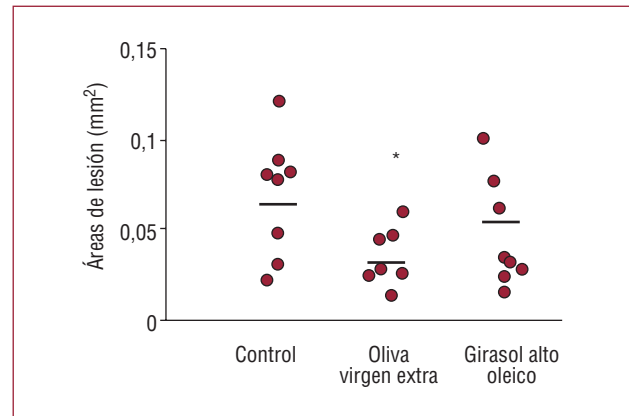


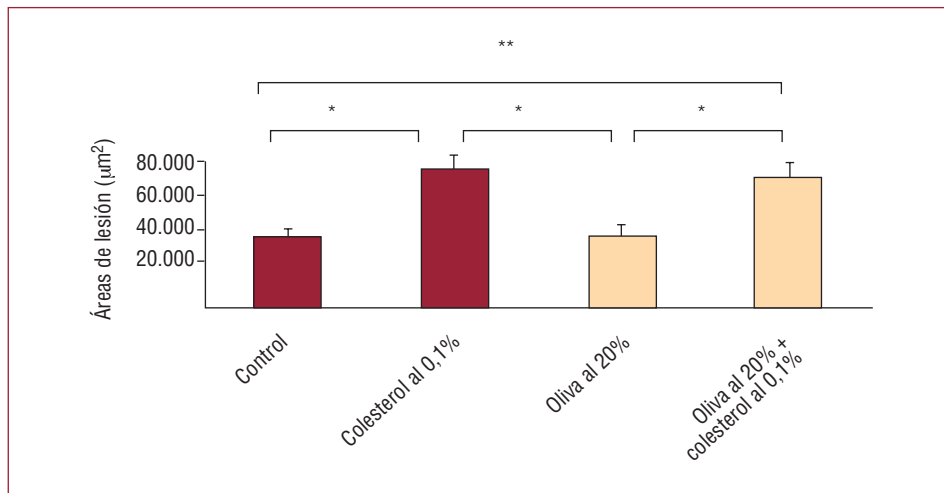
Fig. 3. Áreas de las lesiones ateroscleróticas en ratones carentes de apoE alimentados con dietas control o control enriquecidas al 10% (p/p) con aceite de oliva virgen extra o girasol de alto contenido en ácido oleico. Se muestran los valores de cada animal y la media del grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ frente a control. Adaptado de Calleja et al⁴⁵, con permiso de Lippincott Williams & Wilkins.

similar contenido de este ácido graso en las dietas, los animales que consumieron la dieta de girasol con alto contenido de oleico no presentaron la reducción en la aterosclerosis (fig. 3). Esta observación permitió concluir que los triglicéridos constituyentes del aceite de oliva virgen extra no eran la única causa de su acción.

¿EL EFECTO SE PRODUCE EN FUNCIÓN DE LA DOSIS DE CONSUMO?

Una vez comprobado el efecto beneficioso de la mencionada dieta con aceite de oliva virgen extra al 10% (p/p) y en ausencia de colesterol, se investigó si existía una dosis de tolerancia. Para ello, se llevó a cabo otro experimento administrando el aceite de oliva virgen extra en un porcentaje del 20% (p/p) en el pienso. En este nuevo estudio, a diferencia de lo que ocurría con la dosis del 10%⁴⁵, no se observó una disminución de la lesión (fig. 4). Los animales que consumieron esta dieta con mayor contenido de aceite de oliva no obtuvieron mayor beneficio que los alimentados con la dieta control enriquecida en hidratos de carbono⁴⁶. Además, se observó que mientras la ingesta del 10% de grasa como aceite de oliva virgen no afectaba al peso corporal ni a la concentración plasmática de colesterol y conllevaba una reducción de los triglicéridos⁴⁵, duplicar la cantidad de aceite de oliva aportado en la dieta llevó, por el contrario, a un aumento del peso corporal y de la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos⁴⁶. Estos resultados indicarían que hay unos márgenes en los que el aceite de oliva ejerce mejor su protección.

Fig. 4. Áreas de las lesiones ateroscleróticas en ratones carentes de apoE alimentados con diferentes dietas. Se presenta el valor medio y la SEM para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$. ** $p < 0,02$. Adaptado de Acín et al⁴⁶, con permiso de Elsevier.



EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN DIETAS DE TIPO OCCIDENTAL

Hoy nuestras dietas son más abundantes en alimentos de origen animal y se estima que la ingesta diaria de colesterol es el 0,15% (p/p) de la dieta⁴¹. Para conocer cuál sería la consecuencia de incluir colesterol en la dieta en tal porcentaje sobre el efecto del aceite de oliva virgen extra, se llevó a cabo un experimento alimentando a los animales con aceite de oliva virgen extra al 20% en presencia o ausencia de colesterol. Los resultados indicaron que la inclusión de colesterol dietético aumentó la lesión tanto en los animales alimentados con la dieta control como en los alimentados con dieta enriquecida en aceite de oliva virgen (fig. 4). Al investigar los posibles mecanismos de estos resultados, se observó que, mientras que en las hembras el colesterol dietético producía reducción de la apolipoproteína A-I, en los machos redujo la actividad de la paraoxonasa sérica, parámetros en ambos casos asociados a las HDL y que contribuyen a sus propiedades antiaterogénicas. De hecho, el tamaño de la lesión aórtica en machos se encontró inversamente relacionado con dicha actividad aun después del ajuste estadístico con los valores de apolipoproteína A-I y los de cHDL. Estos resultados pusieron en evidencia la regulación nutricional de la paraoxonasa y su asociación con la aterosclerosis en función del sexo⁴⁶.

Para comparar la eficacia de los diferentes aceites de oliva en dietas de tipo occidental —20% (p/p) de contenido de grasa y colesterol al 0,15% (p/p)—, se prepararon varias dietas con aceite de oliva virgen extra de las variedades arbequina, cornicabra, empeltre y picual, y se compararon con un grupo de animales que recibió grasa de palma. Los animales que consumieron las dietas con aceite de oliva presentaron menor lesión aterosclerótica que los

animales alimentados con la grasa proveniente de palma (fig. 5), a pesar de presentar concentraciones más elevadas de colesterol total y triglicéridos en sangre. En este experimento, no se pudo explicar el desarrollo de la aterosclerosis por la concentración de apolipoproteína A-I o la actividad paraoxonasa total. En cambio, las dietas enriquecidas en aceite de oliva virgen extra indujeron un aumento de las HDL pequeñas y densas con abundante apolipoproteína A-IV y cargadas de paraoxonasa. Estas partículas enriquecidas en apolipoproteína A-IV eran muy eficaces en la inactivación de los peróxidos presentes en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), considerados causa del inicio de la aterosclerosis. En este estudio, el aumento de las partículas de HDL pequeñas y densas explicaba muy bien la evolución de la lesión aterosclerótica, ya que se correlacionaron inversamente con su desarrollo⁴⁷.

En conclusión, con base en los resultados obtenidos, podemos afirmar que el aceite de oliva virgen es más eficaz para evitar la progresión de la aterosclerosis si se consume en dietas de tipo mediterráneo con bajo contenido en colesterol, y que incluso en dietas de tipo occidental su empleo resulta más favorable que la grasa saturada proveniente de palma.

¿CUÁLES SON LOS COMPONENTES IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN DE LA ATROSCLEROSIS?

Para comprobar la implicación de los componentes minoritarios del aceite de oliva, se diseñó el siguiente experimento. Se obtuvo aceite de oliva virgen extra, y una parte se sometió a un proceso de lavado que eliminó los componentes minoritarios hidrosolubles, principalmente compuestos fenólicos. Se prepararon dietas al 10% con ambos tipos

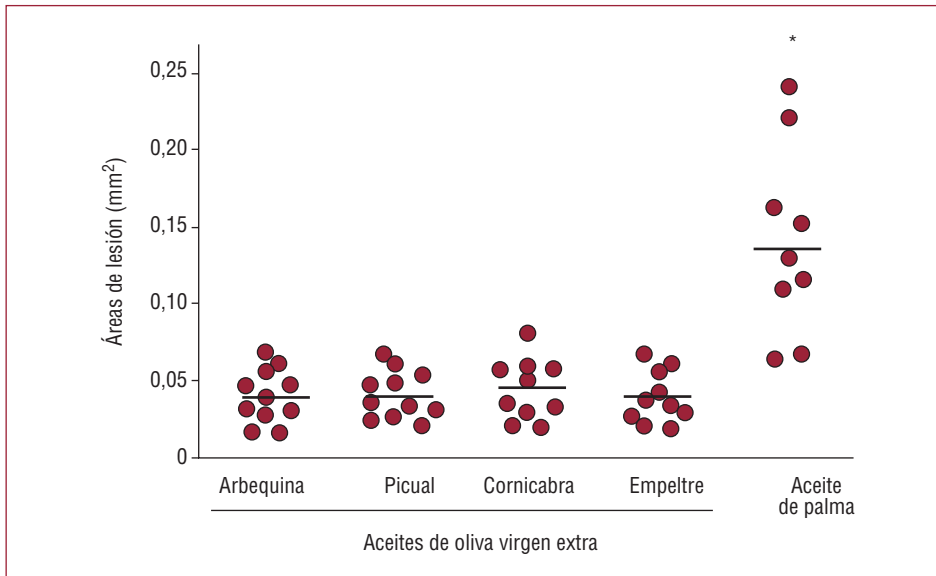


Fig. 5. Comparación de las dietas tipo occidental con colesterol al 0,15% (p/p) enriquecidas al 20% (p/p) con diferentes variedades de aceite de oliva virgen extra comparadas con la de palma. Efectos en las áreas de las lesiones ateroscleróticas en ratones carentes de apoE. Se muestran los valores de cada animal y la media del grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la U de Mann-Whitney. * $p < 0,001$ frente a todos los grupos alimentados con aceite de oliva. Adaptado de Arbonés-Mainar et al⁴⁷, con permiso de Elsevier.

de aceites, se alimentó con ellas a los ratones carentes de la apoE y se observó que la eliminación de la fracción hidrosoluble hacía que el aceite perdiese sus propiedades antiateroscleróticas (resultados no publicados aún).

Un segundo experimento, encaminado también a demostrar la importancia de los componentes minoritarios, se llevó a cabo con la preparación de aceites del mismo olivar con dos procedimientos diferentes: uno por prensado y otro por centrifugación. Ambos tipos de aceites se refinaron para eliminar el componente hidrosoluble. El procedimiento de centrifugado generó un aceite enriquecido en compuestos insolubles en agua de la fracción insaponificable, tales como fitosteroles, tocoferoles, triterpenos y ceras. Los dos tipos de aceites se administraron al 10% a los ratones modificados genéticamente. El aceite obtenido por prensado y refinado aumentó la lesión aterosclerótica, en tanto que el aceite de centrifugación, enriquecido en los componentes minoritarios e insolubles en agua y carente de compuestos hidrosolubles, indujo una disminución de la aterosclerosis⁴⁸. La presencia de dicha fracción insaponificable produjo un descenso de parámetros lipídicos tales como los triglicéridos plasmáticos y cLDL y colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (cVLDL), al igual que parámetros de estrés oxidativo como el isoprostano (8-iso-prostaglandina F_{2α}).

Con estos dos experimentos, se han reconciliado los resultados discrepantes obtenidos por autores sajones, quienes usando un aceite de oliva corriente obtenían un aumento de la lesión aterosclerótica^{49,50}, al igual que ocurría en ambos experimentos cuando se utilizaba el aceite de oliva lavado o refinado. Los resultados de retraso del desarrollo de la ate-

rosclerosis con el aceite de oliva virgen fueron corroborados por otros autores españoles al administrarlo a conejos⁵¹.

La fracción hidrosoluble es muy importante, según se desprende de los resultados de nuestros experimentos, pero aun en su ausencia, el desarrollo de nuevos métodos de preparación de aceite de oliva que lo enriquezcan en otros componentes minoritarios ofrece todavía un gran potencial, pues estos compuestos tienen un papel importante en el retraso del desarrollo de la lesión aterosclerótica⁴⁸.

EL HÍGADO GRASO Y EL ACEITE DE OLIVA

El papel del hígado graso en el desarrollo de la aterosclerosis es motivo de un intenso debate. Cuando se administraba la dieta con aceite de oliva al 10%, los animales no presentaban esteatosis hepática⁵². Sin embargo, los que recibieron los aceites de oliva virgen extra al 20% (p/p) y con colesterol presentaron esteatosis, que además era mayor que la de los animales que recibieron idéntico porcentaje de grasa en la dieta proveniente de la grasa de palma y colesterol. Para explicar dichos hallazgos, se efectuó un análisis proteómico que evidenció que los animales alimentados con aceite de oliva virgen presentaban mayor defensa antioxidante que los alimentados con palma. Además se encontró una clara asociación entre adipofilina y betaína homocisteína metiltransferasa como moduladores del metabolismo hepático de triglicéridos⁵³.

Una vez más, los experimentos muestran un papel más favorable del consumo moderado de aceite de oliva virgen extra, pero también indican que la esteatosis producida por este tipo de aceites al consumirlos en mayor cantidad no tiene

consecuencias en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que, como se ha mencionado anteriormente (fig. 5), los animales que consumieron estos aceites presentaron menor lesión aterosclerótica que los animales que consumieron la dieta enriquecida con grasa de palma⁴⁷.

¿QUÉ GENES HEPÁTICOS ESTÁN IMPLICADOS EN LA RESPUESTA AL CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA?

El hígado es el centro metabólico donde se biosintetizan todas las apolipoproteínas constituyentes de las lipoproteínas plasmáticas y la mayoría de las enzimas implicadas en el metabolismo lipoproteínico y, dado que este órgano experimenta cambios en su contenido graso al incluir aceite de oliva en la dieta, se procedió al análisis del transcriptoma hepático en los animales alimentados con los aceites refinados y enriquecidos en la fracción insaponificable, con la hipótesis de que esa fracción podría modificar la expresión de múltiples genes. Se suministraron dietas con aceite de oliva refinado o con aceite de oliva enriquecido en fracción insaponificable, ambas al 10% (p/p), a los ratones carentes de apoE de genotipo híbrido C57BL/6J x Ola129. Se recogieron los hígados, se extrajo su ARN total y se hibridó con el *chip* de Affymetrix (Murine Genome MOE430A array). Como búsqueda inicial de genes candidatos, se seleccionaron los que presentaron mayor expresión diferencial (señal \log_2 , cociente > 3 o < -3) y que resultaron ser once genes. Los cambios en dichos genes se confirmaron por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real y se estudiaron igualmente en los ratones carentes de apoE de genotipo puro C57BL/6J alimentados con ambas dietas. Dos genes codificantes para proteínas de tipo inflamatorio (el orosomucoide y la proteína sérica amiloide 2) presentaron un aumento de expresión que cambiaba con la raza de los animales, y siempre en ausencia de inflamación hepática. En cambio, la expresión de los genes de la metalotionina 2 (Mt2) y de la proteína de unión a ácidos grasos (Fabp5) aparecieron muy aumentadas con independencia de la raza de los ratones. Estos genes pueden ser considerados buenos marcadores de la ingesta de los compuestos insaponificables y podrían desempeñar un papel importante en la acción biológica de estos compuestos⁵². El papel biológico exacto de Fabp5 no se conoce, aunque se sabe que, además de su función en el transporte de ácidos grasos, puede unir leucotrieno A4⁵⁴ y tiene relación con la respuesta a la insulina⁵⁵. Respecto a Mt2, tiene efecto antioxidante y se considera que puede participar en el desarrollo de la obesidad⁵⁶. La potencial implicación de estas proteínas en la obesidad y la sensibilidad a la insulina y su modificación por

los componentes del aceite de oliva hacen que la investigación de estas acciones pueda llegar a ser muy relevante en los próximos años.

BÚSQUEDA DE COMPONENTES ACTIVOS Y SU EFECTO TRAS LA ADMINISTRACIÓN AISLADA DE DICHS COMPUESTOS

El hidroxitirosol es el componente más abundante de la fracción soluble del aceite de oliva virgen extra y un potente antioxidante *in vitro*^{57,58}. Para investigar su efecto en el desarrollo aterosclerótico, se administró dicho compuesto a los animales a una dosis farmacológica de 10 mg/kg ratón/día, y se observó una disminución de la concentración de apolipoproteína A-I y un aumento del colesterol plasmático. Los resultados indicaron que el hidroxitirosol, a esta dosis y en dietas de bajo contenido en colesterol, inducía un mayor desarrollo de la aterosclerosis mediada por una activación de los monocitos circulantes, ya que éstos expresaron mayor cantidad de la proteína Mac-1⁵⁹. Por lo tanto, este compuesto posee importantes funciones de activación del sistema inmunitario. Ahora bien, si se desea emplearlo en alimentos funcionales para controlar la aterosclerosis, ha de incluirse en fórmulas lo más parecidas posible al entorno del aceite de oliva virgen.

También se ha estudiado el efecto de la administración de otro componente del aceite de oliva como compuesto aislado, el escualeno. Así, la administración de una dosis farmacológica de 1 g/kg ratón/día de escualeno redujo en los machos el desarrollo de la aterosclerosis, en tanto que en las hembras no tuvo efecto. Este distinto comportamiento en uno y otro sexo tiene relación con el diferente efecto del escualeno en la grasa hepática, que disminuye en machos y no experimenta cambios en las hembras⁶⁰.

Por lo tanto, habrá que tener en cuenta estas diferencias entre los sexos en relación con la acumulación de grasa hepática, sobre todo pensando en la potencial aplicación de este componente como agente antiesteatósico.

CONCLUSIÓN

El aceite de oliva virgen extra se ha demostrado eficaz en el control de la lesión aterosclerótica, principalmente en el marco de una dieta tipo mediterránea (pobre en colesterol), aunque en dietas de tipo occidental mantiene su efecto beneficioso comparado con la grasa de palma. Sin embargo, hay una dosis límite a partir de la cual desaparece este beneficio.

No parece que las propiedades del aceite de oliva se deban exclusivamente al alto contenido en ácido

oleico, sino también a la gran cantidad de diferentes compuestos que constituyen la fracción insaponificable (denominados compuestos minoritarios), entre los que hay terpenos, compuestos fenólicos, fitosteroles, etc.

Para obtener estas conclusiones ha sido imprescindible contar con un modelo animal que reproduce los procesos que tienen lugar en el desarrollo de la aterosclerosis humana, como es el ratón carente de la apoE. La administración a este animal de distintos aceites de oliva enriquecidos en diferentes componentes o de dichos componentes de forma aislada ha permitido valorar la contribución de esas moléculas en el efecto beneficioso de este alimento y su potencial empleo como nutraceuticos.

La situación actual indica que la investigación en tecnología de alimentos para generar nuevos compuestos nutraceuticos y la generación de modelos animales que reproducen las enfermedades humanas en los que puedan ensayarse estos compuestos son una excelente combinación para avanzar en el conocimiento de la influencia y el mecanismo de acción de los nutrientes en el desarrollo de la aterosclerosis.

AGRADECIMIENTOS

El grupo agradece al personal técnico (Angel Beltrán, Jesús Cazo, Jesús Navarro, Carmen Navarro y Clara Tapia) de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza su inestimable ayuda en el cuidado y mantenimiento de los animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Manis JP. Knock Out, Knock In, Knock Down —Genetically Manipulated Mice and the Nobel Prize. *N Engl J Med*. 2007;357:2426-9.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420:520-62.
- Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1006-14.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71:343-53.
- Van Ree JH, Van den Broek WJ, Dahlmans VE, Groot PH, Vidgeon-Hart M, Frants RR, et al. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 1994;111:25-37.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258:468-471.
- Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:141-7.
- Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:605-16.
- Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2587-92.
- Osada J, Joven J, Maeda N. The value of the apoE-knockout mouse for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:25-9.
- Sarria AJ, Surra JC, Acín S, Carnicer R, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, et al. Understanding the role of dietary components on atherosclerosis using genetic engineered mouse models. *Frontiers in Biosciences*. 2006;11:955-67.
- Rubio MA. Ácidos grasos, esteroides y enfermedad cardiovascular. *Endocrinol Nutr*. 2002;49:35-46.
- Surra JC, Arnal C, Martínez MV, Osada J. Efecto de la composición de la grasa de la dieta en la aterogénesis. *Rev Esp Obes*. 2005;3:328-39.
- Keys A. Coronary heart disease in Seven Countries. *Circulation*. 1974;41:1-211.
- Menotti A, Lanti M, Puddu PE, Kromhout D. Coronary heart disease incidence in northern and southern European populations: a reanalysis of the seven countries study for an European coronary risk chart. *Heart*. 2000;84:238-44.
- Wahrburg U, Kratz M, Cullen P. Mediterranean diet, olive oil and health. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2002;104:698-705.
- De Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*. 1994;343:1454-9.
- De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999;99:779-85.
- Singh RB, Dubnov G, Niaz MA, Ghosh S, Singh R, Rastogi SS, et al. Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): a randomised single-blind trial. *Lancet*. 2002;360:1455-61.
- Trichopoulos A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*. 2003;348:2599-608.
- Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvado J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;145:1-11.
- Pérez-Martínez P, López-Miranda J, Delgado-Lista J, López-Segura F, Pérez-Jiménez F. Aceite de oliva y prevención cardiovascular: más que una grasa. *Clin Invest Arterioscl*. 2006;18:195-205.
- Serra-Majem L, De la Cruz JN, Ribas L, Salleras L. Mediterranean diet and health: is all the secret in olive oil? *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:461-5.
- Alarcon de la Lastra C, Barranco MD, Motilva V, Herreras JM. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr Pharm Des*. 2001;7:933-50.
- Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:S1321-3.
- Viola P. El aceite de oliva y la salud. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 1997.
- Galli C, Visioli F. Antioxidant properties of Mediterranean diet. *Int J Vitam Nutr Res*. 2001;71:185-8.
- Boskou D. Olive oil, chemistry and technology. Champaign: AOCS Press; 1996.
- Civantos L, Contreras R, Grana R. Obtención del Aceite de Oliva Virgen. 2.ª ed. Madrid: Agrícola Española; 1999.
- Harwood J, Aparicio R. Handbook of olive oil, analysis and properties. Kluwer Academic Publishers, J.L. Harwood, R. Aparicio; 2000.

31. Montedoro GF, Taticchi A, Esposto S, Selvaggini R, Urbani S, Servilli M. Antioxidants in virgin olive oil. *Olea*. 2007;26:5-13.
32. Boskou D. Olive oil. *World Rev Nutr Diet*. 2000;87:56-77.
33. Dieffenbacher A, Pocklington WD. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Oxford: Internacional Union of Pure and Applied Chemistry; 1992.
34. Jiménez J, Rondón D, Martínez L, Mataix J. Composición química de los aceites de oliva. En: Mataix J, editor. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Granada: Universidad de Granada, Puleva Food; 2001.
35. Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutiérrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem*. 2006;17:429-45.
36. Calapaj R, Chiricosta S, Saija G, Binova V. [Evaluation of gas chromatographic and spectrophotometric analytical results to check the presence of seed oils in olive samples]. *Riv Ital Sost Grasse*. 1993;70:575.
37. Galli C, Visioli F. Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids*. 1999;34:S23-6.
38. Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil: Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J Agric Food Chem*. 1992;40:1571-6.
39. Arbonés-Mainar JM, Navarro MA, Lou-Bonafonte JM, Martínez-Gracia MV, Osada J. Olive oil phenolic compounds as potential therapeutical agents. Nueva York: Nova; 2008.
40. Perrin JL. Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Rev Franc Corps Gras*. 1992;39:25-32.
41. Willett WC. Diet and health: what should we eat? *Science*. 1994;264:532-7.
42. Calleja L, Trallero MC, Carrizosa C, Mendez MT, Palacios-Alaiz E, Osada J. Effects of dietary fat amount and saturation on the regulation of hepatic mRNA and plasma apolipoprotein A-I in rats. *Atherosclerosis*. 2000;152:69-78.
43. Demetrius L. Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans. *EMBO reports*. 2005;6:S39-44.
44. FDA allows qualified health claim to decrease risk of coronary heart disease. Rockville: US Food and Drug Administration; 2004. Disponible en: <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html>
45. Calleja L, Paris MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jimenez A, et al. Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2368-75.
46. Acin S, Navarro MA, Carnicer R, Arbonés JM, Guzmán MA, Arnal C, et al. Dietary cholesterol suppresses the ability of olive oil to delay the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*. 2005;182:17-28.
47. Arbones-Mainar JM, Navarro MA, Carnicer R, Guillen N, Surra JC, Acin S, et al. Accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diets containing palm oil compared with extra virgin olive oils: a role for small, dense high-density lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2007;194:372-82.
48. Acin S, Navarro MA, Perona JS, Arbones-Mainar JM, Surra JC, Guzman MA, et al. Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr Biochem*. 2007;18:418-24.
49. Merkel M, Velez-Carrasco W, Hudgins LC, Breslow JL. Compared with saturated fatty acids, dietary monounsaturated fatty acids and carbohydrates increase atherosclerosis and VLDL cholesterol levels in LDL receptor-deficient, but not apolipoprotein E-deficient, mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13294-9.
50. Rudel LL, Kelley K, Sawyer JK, Shah R, Wilson MD. Dietary monounsaturated fatty acids promote aortic atherosclerosis in LDL receptor-null, human ApoB100-overexpressing transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1818-27.
51. Aguilera CM, Ramirez-Tortosa MC, Mesa MD, Ramirez-Tortosa CL, Gil A. Sunflower, virgin-olive and fish oils differentially affect the progression of aortic lesions in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;162:335-44.
52. Acin S, Navarro MA, Perona JS, Surra JC, Guillen N, Arnal C, et al. Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Nutr*. 2007;97:628-38.
53. Arbones-Mainar JM, Ross K, Rucklidge GJ, Reid M, Duncan G, Arthur JR, et al. Extra virgin olive oils increase hepatic fat accumulation and hepatic antioxidant protein levels in APOE^{-/-} mice. *J Proteome Res*. 2007;6:4041-54.
54. Zimmer JS, Dyckes DF, Bernlohr DA, Murphy RC. Fatty acid binding proteins stabilize leukotriene A₄: competition with arachidonic acid but not other lipoxygenase products. *J Lipid Res*. 2004;45:2138-44.
55. Maeda K, Uysal KT, Makowski L, Gorgun CZ, Atsumi G, Parker RA, et al. Role of the fatty acid binding protein MAL1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2003;52:300-7.
56. Miura N, Koizumi S. Gene expression profiles in the liver and kidney of metallothionein-null mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:949-55.
57. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247:60-4.
58. Visioli F, Galli C, Plasmati E, Viappiani S, Hernandez A, Colombo C, et al. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation*. 2000;102:2169-71.
59. Acin S, Navarro MA, Arbones-Mainar JM, Guillen N, Sarria AJ, Carnicer R, et al. Hydroxytyrosol administration enhances atherosclerotic lesion development in apo E deficient mice. *J Biochem (Tokyo)*. 2006;140:383-91.
60. Guillen N, Acin S, Navarro MA, Perona JS, Arbones-Mainar JM, Arnal C, et al. Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis*. 2008;196:558-64.