



Nutrición Hospitalaria

ISSN: 0212-1611

info@nutriciónhospitalaria.com

Grupo Aula Médica

España

Cortés Castell, Ernesto; Veciana Galindo, C.; Torro Montell, L.; Sirvent Segura, E.; Rizo Baeza, M. M.;
Gil Guillén, V.

Actividad antiinflamatoria de un extracto polifenólico de hueso de olivas en la línea celular de
monocitos humanos THP1-XBLUE-CD14

Nutrición Hospitalaria, vol. 30, núm. 1, julio-, 2014, pp. 113-117

Grupo Aula Médica

Madrid, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309231672014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Original / Alimentos funcionales

Actividad antiinflamatoria de un extracto polifenólico de hueso de olivas en la línea celular de monocitos humanos THP1-XBLUE-CD14

Ernesto Cortés Castell, C. Veciana Galindo², L. Torro Montell², E. Sirvent Segura², M. M. Rizo Baeza³ y V. Gil Guillén⁴

¹Departamento de Farmacología, Pediatría y Q. Orgánica. Universidad Miguel Hernández. Campus de San Juan. Alicante. España. ²Laboratorio de Biotecnología y Proyectos. Biopartner S.L. ³Departamento de Enfermería y Nutrición. Universidad de Alicante. ⁴Departamento de Medicina Clínica. Universidad Miguel Hernández. España.

Resumen

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antiinflamatoria de un extracto de naturaleza polifenólica de huesos de oliva.

Material y métodos: Se incubó la línea celular THP1-XBlue-CD14 (invivogen), 80.000 células/pocillo, provocando inflamación (activación de NF-kb) mediante 0.1 µg/ml LPS (lipopolisacárido de *E. coli*) durante 24 horas. Se evaluó la presencia del extracto (10 y 50 mg/l, concentraciones bioseguras) durante 2 horas a 37 °C, previa (efecto preventivo) y posterior a la activación proinflamatoria (efecto terapéutico) y se cuantificó colorimétricamente la actividad de fosfatasa alcalina, que se expresa bajo el control del promotor del factor transcripcional de NF-kb. Se evalúa el % actividad de NF-kb en efecto preventivo y terapéutico respecto a cultivos control de células con LPS y sin extracto añadido, que se consideran 100% de NF-kb.

Resultados: La capacidad antiinflamatoria preventiva del extracto a 50 mg/l es del 25,5% (IC 95% 16,8-34,2) y el efecto terapéutico del 34,9% (IC 95% 25,3-44,4) para la misma concentración, no presentando actividad significativa a 10 mg/l.

Conclusión: Se muestra una actividad de los polifenoles extraídos de los huesos de aceitunas, tanto preventivo de la inflamación como terapéutico de eliminación de la inflamación a través de la inhibición del factor NF-kB previamente activado por LPS a concentraciones de 50 mg/l de polifenoles que previamente se han mostrado seguras.

(Nutr Hosp. 2014;30:113-117)

DOI:10.3305/nh.2014.30.1.7482

Palabras clave: Polifenoles. Actividad antiinflamatoria. Extracto de huesos de oliva. Factor NF-kb. Lipopolisacárido de *E. coli*.

Correspondencia: Ernesto Cortés Castell.
Departamento de Farmacología, Pediatría y Q. Orgánica.
Universidad Miguel Hernández.
Campus de San Juan.
03550 Alicante.
E-mail: ernesto.cortes@umh.es

Recibido: 4-IV-2014.
Aceptado: 4-V-2014.

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF OLIVE SEED POLYPHENOLIC EXTRACT IN THE THP1-XBLUE-CD14 HUMAN MONOCYTES CELL LINE

Abstract

The aim of this study was to assess the anti-inflammatory activity of a polyphenolic extract from olive pits.

Material and methods: The THP1-XBlue-CD14 (invivogen) cellular line, 80,000 cells/well, was incubated and inflammation (activation of NF-kb) was produced with 0.1 mg/mL of LPS (lipopolysaccharide from *E. coli*) for 24 hours. We assessed the presence of the extract (10 and 50 mg/L, biologically safe concentrations) for 2 hours at 37° C, before (preventive effect) and after (therapeutic effect) the proinflammatory activation, and the activity of alkaline phosphatase, which is expressed under the control of the NF-kb transcriptional factor, was quantified by colorimetry. The percentage of activity of NF-kb as preventive effect and therapeutic effect was assessed by comparing it to control cultures of cells with LPS and without extract, which are considered 100% of NF-kb.

Results: The preventive anti-inflammatory capacity of the extract at 50 mg/L was 25.5% (95% CI: 16.8-34.2) and the therapeutic effect 34.9% (95% CI: 25.3-44.4) for the same concentration, without any significant activity at 10 mg/L.

Conclusion: An activity of polyphenols extracted from olive pits is shown, both in preventing inflammation and therapeutically eliminating inflammation through inhibition of NF-kB factor previously activated by LPS at concentrations of 50 mg/L of polyphenols, which previously have been shown to be safe.

(Nutr Hosp. 2014;30:113-117)

DOI:10.3305/nh.2014.30.1.7482

Key words: Polyphenols. Anti-inflammatory activity. Extract from olive pits. NF-kb factor. Lipopolysaccharides from *E. coli*.

Introducción

Existe un creciente interés por sustancias con capacidad neuroprotectora, proponiéndose en la bibliografía distintos mecanismos de acción para explicar dicha capacidad, entre las que se pueden citar la acción antiinflamatoria, la modulación de vías de señalización intracelular, la modulación de la expresión de proteínas, la inhibición de las vías apoptóticas o la acción antioxidante¹.

Se está produciendo también una tendencia hacia el consumo de alimentos funcionales, con el consiguiente desarrollo de alimentos innovadores capaces de influir sobre la salud^{2,3}. En este sentido, en los últimos años se han lanzado numerosos productos al mercado con un menor contenido en grasa total o en grasas perjudiciales, un enriquecimiento en compuestos que contribuyen a mejorar la salud cardiovascular (fitoesteroles, DHA, ácidos grasos poliinsaturados, etc.) o bien productos dietéticos con alto contenido en fibras con efecto saciante que permitan una disminución de la ingesta y un control del apetito.

Entre los compuestos bioactivos, es patente que los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células⁴ y que las poblaciones que siguen una dieta de frutas y vegetales ricos en polifenoles y antocianinas tienen menor riesgo de contraer cáncer, enfermedades cardíacas y algunas enfermedades neurológicas⁵. Sugiriéndose que los compuestos antioxidantes pueden prevenir la degeneración macular⁶, inmunidad suprimida debido a una nutrición pobre⁷, y neurodegeneración, que son causados por el estrés oxidativo⁸. Sin embargo, a pesar del papel claro del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares, el uso de vitaminas antioxidantes no han mostrado ninguna reducción clara en el progreso o riesgo de contraer enfermedades cardíacas⁹, sugiriéndose que la combinación con otras sustancias en las frutas y vegetales (posiblemente los flavonoides) puedan explicar la mejor salud cardiovascular de quienes consumen más frutas y vegetales¹⁰.

La producción de antioxidantes naturales y los antioxidantes que se obtienen con la alimentación, no es suficiente para la mayoría de las personas, por esa razón muchas compañías alimentarias y de nutracéuticos venden formulaciones de antioxidantes como suplementos dietéticos y estos son ampliamente consumidos en los países industrializados¹¹. Estos suplementos pueden incluir químicos específicos antioxidantes, como el resveratrol (de las semillas de uva), hidroxitirosol procedente de la oliva, combinaciones de antioxidantes, como el "ACES" productos que contienen beta-caroteno (provitamina A), vitamina C, vitamina E y Selenio, o hierbas especiales que contienen antioxidantes, como el té verde y el jiaoquan. Aunque algunos de los niveles de vitaminas antioxidantes y minerales en la dieta son necesarios para la buena salud, hay considerables dudas sobre si los suplementos antioxidantes son beneficiosos y, en caso afirmativo, que antioxidantes lo son y en qué cantidades^{5,12-14}.

Las materias primas del olivo han motivado investigaciones en los últimos años relacionadas con la recuperación de antioxidantes de los residuos. Una parte de ellas se centran en la obtención de efluentes acuosos del proceso de obtención del aceite de oliva¹⁵. En otros casos, la recuperación de sustancias de interés se centra en otros tipos de matrices como residuos sólidos¹⁶, pulpa¹⁷, hojas¹⁸ o madera de olivo¹⁹. En general el componente mayoritario de los extractos de hoja de olivo es la oleuropeína, también son abundantes las referencias relacionadas con el hidroxitirosol²⁰ que se considera el principal compuesto derivado de la oleuropeína con incluso una capacidad antioxidante superior¹⁵, si bien la actividad general de los extractos parecen apoyarse en efectos sinérgicos entre las sustancias que lo componen.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el potencial efecto antiinflamatorio, más que de un polifenol concreto, de la mezcla de polifenoles extraídos de los huesos de olivas, utilizando para ello el efecto inflamatorio de los liposacáridos de *E. coli* sobre un cultivo de monocitos humanos.

Material y métodos

El estudio de la actividad antiinflamatoria de los extractos de huesos de olivas se ha realizado utilizando como biomarcador el factor transcripcional NF-kb, que se activa en caso de daño celular y transduce la señal provocando cambios a nivel celular y molecular²¹. Así pues, se ha procedido a reproducir el proceso inflamatorio (activación de NF-kb) y se ha evaluado si la presencia de los extractos revierten el proceso inflamatorio. Para ello, se ha empleado la línea celular THP1-XBlue-CD14 (invivogen), derivada de monocitos humanos, en la que la enzima fosfatasa alcalina se expresa bajo el control del promotor del factor transcripcional de NF-kb. La actividad de la fosfatasa alcalina puede medirse mediante una reacción enzimática con técnicas colorimétricas de modo que una mayor actividad de fosfatasa alcalina se relaciona directamente con mayor cantidad de NF-kb y por tanto menor efecto anti-inflamatorio.

Para la realización del ensayo, se siembran las células en placas multipocillo de 96 pocillos a una concentración de 80.000 células por pocillo y se incuban con distintas concentraciones de polifenoles totales del extracto de huesos de oliva durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se añade un activador de NF-kb, LPS 0.1 mg/ml (lipopolisacárido de *E.coli*) que induce estrés celular, y se deja incubar durante 24 horas. Tras el período de incubación se analiza la actividad de NF-kb. Paralelamente, el estudio también se ha realizado induciendo primero la inflamación con LPS (incubación 2 horas) y posteriormente añadiendo el extracto, para observar si es capaz de revertir el efecto. Se realizaron de cada procedimiento dos ensayos independientes y con tres replicas por ensayo. Las concentraciones de polifenoles totales

del extracto de huesos de olivas (mayoritariamente hidroxitirosol y oleuropeina) se ha utilizado a concentraciones de 10 y 50 mg/l, viables según estudios previos²² y muy por debajo de la LD50 de 800 mg/l de extracto.

La actividad de NF-kb se mide indirectamente mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo quanti-Blue (invitrogen). El reactivo quanti-Blue contiene el sustrato fosforilado que hidroliza la fosfatasa alcalina, la actividad de la fosfatasa libera un compuesto cromogénico que puede analizarse midiendo la absorbancia a 655 nm. Como la expresión de la fosfatasa alcalina está dirigida por el promotor de NF-kb, los resultados de actividad de NF-kb son directamente proporcionales a la actividad de la fosfatasa alcalina, y la actividad de la fosfatasa es proporcional a la absorbancia. De modo que a mayor actividad de NF-kb mayor absorbancia. La expresión de resultados de actividad de NFkb se realiza respecto a las células control positivo (tratadas con LPS) haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad de NFkb} = \left(\frac{\text{Abs}_{655 \text{ nm}} \text{ muestra}}{\text{Abs}_{655 \text{ nm}} \text{ control LPS}} \right) \times 100$$

Resultados

A partir del estudio previo de citotoxicidad²² con el extracto de olivo y el rango de concentración no tóxica se evaluó la respuesta del biomarcador factor transcripcional NFkb, relacionando una disminución de la actividad de NFkb con una potencial actividad antiinflamatoria. Para ello se ha empleado la línea celular THP1-Xblue-CD14. El diseño experimental se realizó considerando dos opciones: efecto preventivo, incubación con los extractos primero, y posteriormente la inducción de la estimulación del biomarcador (NFkb) con

Tabla I

Actividad inflamatoria provocada por LPS de E. coli, cuantificada mediante NFkb, en monocitos humanos y efectos preventivo y terapéutico de 10 y 50 mg/l de polifenoles del extracto de huesos de aceitunas. Se considera 100% de actividad inflamatoria en ausencia de extracto

Media ± SD (IC 95%)	% NFkb Efecto preventivo	% NFkb Efecto terapéutico
Cels + LPS	100,0 ± 8,0 (91,6-108,4)	
+ 10 mg/l extracto	109,4 ± 23,6 (84,6-134,2)	91,0 ± 1,6 (89,3-92,7)*
+ 50 mg/l extracto	74,5 ± 8,3 (65,8-83,2)**	65,1 ± 9,1 (55,6-74,7)**

*p<0,05; **p<0,001.

el tratamiento con LPS. Y la otra opción, efecto terapéutico, estimulación primero del biomarcador (NFkb) e incubación con los extractos después. Paralelamente a la evaluación del efecto sobre la actividad de NFkb se analizó la viabilidad celular para comprobar el estado de las células después del tratamiento con los extractos, siendo en todos los casos viables. Los porcentajes de actividad de NFkb están expresados en la tabla I.

Las células tratadas con LPS se considera que activan a NFkb al 100% y respecto a este valor se expresa la actividad de NFkb de los cultivos con extracto en efecto preventivo y terapéutico.

La capacidad antiinflamatoria del extracto se determinó a partir del efecto evaluado sobre la actividad de NFkb considerando la disminución de la actividad de NFkb como potencial actividad antiinflamatoria. Así pues, el poder antiinflamatorio se estableció de forma relativa teniendo como referencia de no actividad antiinflamatoria el tratamiento con LPS. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 1, destacando

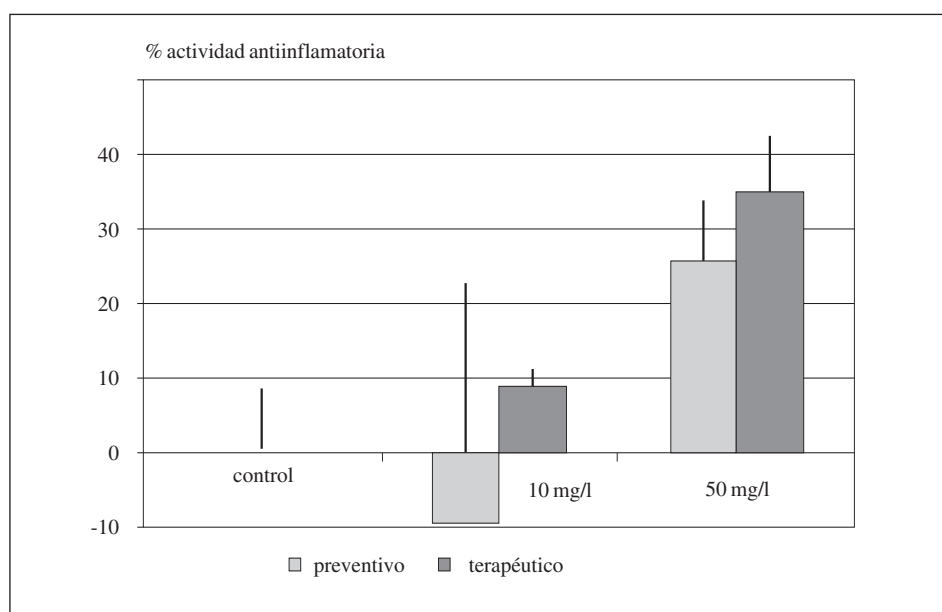


Fig. 1.—Porcentaje de actividad antiinflamatoria preventiva y terapéutica de extracto de polifenoles de huesos de olivas a 10 y 50 mg/l sobre la inflamación producida por 0,1 µg/ml de lipopolisacárido de E. coli en monocitos humanos.

una reducción preventiva de la actividad inflamatoria mediante la adición de 50 mg/l de extracto en un 25,5% (IC 95% 9,2-41,8), no presentando esta actividad a la concentración menor de 10 mg/l. En el efecto terapéutico se obtuvieron resultados positivos de poder antiinflamatorio sobre la inflamación provocada previamente y en concreto del 34,9% (IC 95% 17,8-52,0) de disminución con 50 mg/l del extracto.

La comparación entre las dos experiencias, simulación efecto preventivo y terapéutico, muestra la misma tendencia en los extractos analizados, presentando capacidad antiinflamatoria significativa a la concentración de 50 mg/l.

Discusión

El efecto de la alimentación en la salud se atribuye a la presencia de ciertos compuestos que ejercen una acción beneficiosa, los compuestos bioactivos. Dada la importancia de los compuestos bioactivos en los sectores de la alimentación y farmacéutico, actualmente existe un gran interés en la identificación de nuevos compuestos bioactivos y/o en la identificación de nuevas propiedades de los mismos, siendo este el marco de actuación en el presente trabajo.

La evaluación in vitro e in vivo de compuestos bioactivos se basa en modelos experimentales que reproducen el proceso biológico de interés, mediante sistemas sensibles a factores externos y cuyas posibles fluctuaciones sean medibles. La herramienta esencial para el diagnóstico de la bioactividad es la selección del biomarcador adecuado. En el presente estudio, se ha utilizado como biomarcador del proceso inflamatorio el producido por el lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) sobre la línea celular THP1-XBlue-CD14²¹ y el efecto preventivo y terapéutico que pueden ejercer los polifenoles extraídos de los huesos de aceitunas, encontrándose un efecto antiinflamatorio, tanto preventivo como terapéutico a una concentración de 50 mg/l de polifenoles. Estas células constituyen un modelo homogéneo, altamente reproducible y con una alta supervivencia de células, frente al empleo de cultivos primarios de neuronas de ratón de distintas regiones del sistema nervioso, que presentan una muy baja tasa de supervivencia en cultivo^{23,24}.

Los polifenoles contenidos en los extractos procedentes del olivo presentan propiedades antioxidantes que hacen que sean candidatos para la investigación de enfermedades neurodegenerativas²⁵. Además tienen otras actividades biológicas que le confieren importancia dentro de la "Dieta mediterránea"²⁶. Se ha demostrado, además de otros efectos beneficiosos, el poder protector de la ingesta de flavonoides, compuestas fenólicas contenidos en vinos, vegetales y frutas frente a la demencia²⁷. También se ha encontrado evidencia de actividad anticancerígena de los polifenoles extraídos del aceite de oliva²⁸, mediante la utilización de células de leucemia promielocítica humana, en las que se ob-

serva inhibición de su crecimiento con polifenoles del aceite de oliva virgen.

Otros autores encuentran efectos positivos también²⁹ en el uso de polifenoles procedentes de las aguas del procesado de aceituna en la línea celular PC12, así, sometiendo a dichas células a estrés oxidativo y midiendo la citotoxicidad, se observa una citoprotección de las células cerebrales con los extractos. Y algunos autores encuentran que los extractos de los residuos del olivo presentan actividad antioxidante¹⁶, mediante ensayos ORAC y DPPH en células umbilicales endoteliales humanas.

Otros compuestos naturales tienen efectos antiinflamatorios como algunos ácidos grasos como el eicosapentanoico, docosahexanoico, linoleico conjugado y ácidos grasos monoinsaturados, mediante diferentes mecanismos de actuación³⁰.

Conclusión: en el presente estudio se muestra una actividad antiinflamatoria de los polifenoles extraídos de los huesos de aceitunas, tanto en su aspecto de prevención de la inflamación, como en su efecto terapéutico de eliminación de la inflamación ya instaurada a concentraciones de 50 mg/l de polifenoles totales que previamente se han mostrado seguras.

Referencias

- Jordan E, Lovett DK, Monahan FJ, Callan J, Flynn B, O'Mara FP. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J Anim Sci* 2006; 84 (1): 162-70.
- Hao J, Shen W, Yu G, Jia H, Li X, Feng Z, Wang Y, Weber P, Wertz K, Sharman E, Liu J. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem* 2010 Jul; 21 (7): 634-44.
- Jacomelli M, Pitozzi V, Zaid M, Larrosa M, Tonini G, Martini A, Urbani S, Taticchi A, Servili M, Dolara P, Giovannelli L. Dietary extra-virgin olive oil rich in phenolic antioxidants and the aging process: long-term effects in the rat. *J Nutr Biochem* 2010 Apr; 21 (4): 290-6.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82 (2): 291-5.
- Bartlett H, Eperjesi F. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003; 23 (5): 383-99.
- Wintergerst E, Maggini S, Hornig D. «Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions». *Ann Nutr Metab* 2006; 50 (2): 85-94.
- Wang J, Wen L, Huang Y, Chen Y, Ku M. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr Pharm Des* 2006; 12 (27): 3521-33.
- Bleys J, Miller E, Pastor-Barriuso R, Appel L, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006; 84 (4): 880-7.
- Cherubini A, Vigna G, Zuliani G, Ruggiero C, Senin U, Fellin R. «Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update». *Curr Pharm Des* 2005; 11 (16): 2017-32.
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328 (20): 1450-6.
- Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano M. Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Am J Epidemiol* 2004; 160 (4): 339-49.

12. Woodside J, McCall D, McGartland C, Young I. Micronutrients: dietary intake v. supplement use. *Proc Nutr Soc* 2005; 64 (4): 543-53.
13. Hughes J, Kelly CN, Buttriss J. «A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'». *Public Health Nutr* 2004; 7 (3): 407-22.
14. De Marco E, Savarese M, Paduano A, Sacchi R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem* 2007; 104 (2): 858-67.
15. Obied HK, Bedgood DR Jr, Prenzler PD, Robards K. Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste. *J Agric Food Chem* 2008; Jun 11; 56 (11): 3925-32.
16. Aldini G, Piccoli A, Beretta G, Morazzoni P, Riva A, Marinello C, Maffei Facino R. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia* 2006; Feb; 77 (2): 121-8.
17. Soni MG, Burdock GA, Christian MS, Bitler CM, Crea R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem Toxicol* 2006 Jul; 44 (7): 903-15.
18. Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A, Isoda H, Sayadi S. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem* 2008; Apr 23; 56 (8): 2630-6.
19. Zbidi H, Salido S, Altarejos J, Perez-Bonilla M, Bartegi A, Rosado JA, Salido GM. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood Cells Mol Dis* 2009; May-Jun; 42 (3): 279-85.
20. Pereira-Caro G, Madrona A, Mateos R, Rodríguez G, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, Espartero JL. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules* 2009 May 11; 14 (5): 1762-72.
21. Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L. Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappaB activation in THP-1 cells. *Biol Pharm Bull* 2009; 32 (4): 578-82.
22. Veciana C, Cortés E, Torro L, Sirvent E, Rizo M, Gil V. Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Nutr Hosp* 2014; 6: 1388-93.
23. Brorson JR, Manzollillo PA and Miller RJ. Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 1994; 14: 187-97.
24. Brorson JR, Manzollillo PA, Gibbons SJ and Miller RJ. AMPA receptor desensitization predicts the selective vulnerability of cerebellar Purkinje cells to excitotoxicity. *J Neurosci* 1995; 15: 4515-24.
25. Sears B, Ricordi C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012 Sep; 16 (9): 1137-54.
26. Visoli F. Antioxidant and another biological activities of phenols from olives and olives oil. *Med Res Rev* 2001; 22: 65-75.
27. Commenges D. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 357-63.
28. Fabiani R, De Bartomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Disaverio C, Morozzi G. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr* 2006; Mar 136 (3): 614-9.
29. Schaffer S, Müller WE, Eckert GP. Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res* 2010 Oct; 62 (4): 322-7.
30. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, LeMieux M, Greer B, Moustaid-Moussa N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J Nutr Biochem* 2013 Apr; 24 (4): 613-23.