

**ACCIONES BENEFICIOSAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE
OLIVA VIRGEN EXTRA EN ISLOTES PANCREÁTICOS Y SU IMPACTO EN LA
PREVENCIÓN DE LA DIABETES TIPO 2**

**PROMOTOR: FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN DE
MÁLAGA EN BIOMEDICINA Y SALUD (FIMABIS)**

Versión 3.0 de 28 de Noviembre de 2017

Código: PI-0247-2016

Este protocolo se realizará siguiendo las ICH-GCP (CPMP/ICH/135/95), los principios éticos de la Declaración de Helsinki y la Legislación Española vigente (RD 1090/2015).

La información de este documento es confidencial y es propiedad de FIMABIS. Por tanto, la información no debe ser divulgada, publicada, revelada o transferida de cualquier otro modo a una tercera parte, en ninguna forma, sin consentimiento por escrito de FIMABIS. Sin embargo este documento puede ser revelado a los investigadores y potenciales investigadores, Autoridades Sanitarias nacionales y correspondientes Comités Éticos bajo la condición de que respeten su naturaleza confidencial.

FIRMA DEL PROMOTOR

He leído el protocolo de ensayo intervencional titulado “ACCIONES BENEFICIOSAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN ISLOTES PANCREÁTICOS Y SU IMPACTO EN LA PREVENCIÓN DE LA DIABETES TIPO 2”, versión 2.0 de 13 de Octubre de 2017 y acepto cumplir todo lo establecido en el mismo y todas las leyes y normas que sean aplicables, incluidas, pero no limitadas a, las directrices de la Buena Práctica Clínica (BPC) de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) y de los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

Itziar Ochotorena Zubizarreta
Por parte de FIMABIS

Firma: _____

Cargo: Directora Gerente

Fecha: ____ ____ ____

FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL CENTRO

He leído el protocolo de ensayo clínico titulado “ACCIONES BENEFICIOSAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN ISLOTES PANCREÁTICOS Y SU IMPACTO EN LA PREVENCIÓN DE LA DIABETES TIPO 2”, versión 2.0 de 13 de Octubre de 2017 y acepto cumplir todo lo establecido en el mismo y todas las leyes y normas que sean aplicables, incluidas, pero no limitadas a, las directrices de la Buena Práctica Clínica (BPC) de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) y de los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

Dr. Fco. Javier Bermúdez Silva
Investigador Principal

Firma: _____

Centro: IBIMA - Hospital Regional de Málaga

Fecha: ____ ____ ____

1. ABREVIATURAS

AOVE: Aceite de oliva virgen extra.

BSSPA: Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

BPC: Buena práctica clínica

CIH: Conferencia internacional de armonización

DHPG: Di-Hidroxi-fenil-glicol

ER: Retículo Endoplásmico

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

HT: Hidroxitirosol

IBIMA: Instituto de Investigación Biomédica de Málaga

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IPAQ: Cuestionarios internacionales de Actividad Física

PREDIMED: Prevención Primaria de la Enfermedad Cardiovascular con la Dieta Mediterránea

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TRPA1: Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1

T2D: Diabetes mellitus tipo 2

UGC: Unidad de Gestión Clínica

2. RESUMEN

2.1 TÍTULO DEL ESTUDIO

ACCIONES BENEFICIOSAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN ISLOTES PANCREÁTICOS Y SU IMPACTO EN LA PREVENCIÓN DE LA DIABETES TIPO 2

2.2 CÓDIGO DE PROTOCOLO

PI-0247-2016

2.3 INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL ENSAYO

Dr. Francisco Javier Bermúdez Silva

2.4 CENTRO EN EL QUE SE PREVÉ REALIZAR EL ENSAYO

1. Hospital Regional Universitario de Málaga (Málaga).

2.5 COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN QUE HA EVALUADO EL ENSAYO

Comité de Ética e Investigación Provincial de Málaga.

2.6 MEDICAMENTO/SUSTANCIA CON EL QUE SE VA A REALIZAR EL ENSAYO

- Aceite de oliva virgen extra con altos niveles de oleocanthal.
- Aceite de oliva con bajos niveles de oleocanthal.

2.7 OBJETIVO PRINCIPAL DEL ENSAYO

Objetivar posibles mejoras en los niveles de marcadores inflamatorios sistémicos en sujetos obesos pre-diabéticos intervenidos dietéticamente con el AOVE rico en oleocanthal.

2.8 DISEÑO DEL ENSAYO

Ensayo prospectivo cruzado aleatorizado doble ciego.

2.9 ENFERMEDAD O TRASTORNO EN ESTUDIO

Diabetes mellitus tipo 2.

2.10 VARIABLE PRINCIPAL

Inflamación sistémica

2.11 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y NÚMERO TOTAL DE PACIENTES

Se prevé incluir un total de 130 pacientes adultos diagnosticados de obesidad y pre-diabetes mellitus, divididos en dos grupos de 65 pacientes.

2.12 DURACIÓN DEL ENSAYO

Ocho meses.

2.13 CALENDARIO Y FECHA PREVISTA DE FINALIZACIÓN

Fecha de autorización del estudio: Cuarto trimestre de 2017.

Fecha de inclusión del primer paciente: Cuarto trimestre de 2017.

Fecha de inclusión del último paciente: Primer trimestre de 2018.

Fecha de cierre del estudio: Segundo trimestre de 2018.

3. INFORMACIÓN GENERAL

3.1 IDENTIFICACIÓN DEL ENSAYO

Título: ACCIONES BENEFICIOSAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN ISLOTES PANCREÁTICOS Y SU IMPACTO EN LA PREVENCIÓN DE LA DIABETES TIPO 2.

Código de Protocolo: PI-0247-2016

Versión: 3.0 de 28 de Noviembre de 2017

3.2 DESCRIPCIÓN DEL MEDICAMENTO/SUSTANCIA A ESTUDIO

- Aceite de oliva virgen extra con altos niveles endógenos de la molécula oleocanthal. Esta molécula no se adicionará a los aceites, está presente de manera natural en aquellos AOVes correspondientes a determinadas variedades de aceitunas, y su concentración varía en función del momento de la cosecha y de la climatología anual. Por tanto, se seleccionarán aceites con alto contenido en esta molécula.
- Aceite de oliva con bajos niveles de oleocanthal. Esta molécula no se eliminará de los aceites por ningún método, simplemente se seleccionarán aceites que demuestren niveles indetectables o tan solo trazas en análisis de laboratorio.

3.3 DATOS RELATIVOS AL PROMOTOR

Fundación Pública Andaluza para la Investigación de Málaga en Biomedicina y Salud (FIMABIS)

Calle Dr. Miguel Díaz Recio 28, 29010, Málaga

Tlf: 951 440 260

Fax: 951 440 263

Email: fimabis@fimabis.org

3.4 DATOS RELATIVOS AL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Francisco Javier Bermúdez Silva

Investigador Nicolás Monardes

Unidad Intercentros de Endocrinología y Nutrición Hospital Regional de Málaga

Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA)

Hospital Civil, Pabellón 2, sótano, Laboratorio de Hormonas-Investigación

3.5 CENTRO EN EL QUE SE PREVÉ REALIZAR EL ENSAYO

Hospital Regional Universitario de Málaga

Pabellón C (Hospital Civil)

Plaza del Hospital Civil, s/n

29009 Málaga

3.6 DURACIÓN DEL ENSAYO

El primer paciente se incluirá una vez obtenida la autorización del Comité de Ética e Investigación Provincial de Málaga y de la realización de la visita de inicio. Se prevén aproximadamente 5 meses para el reclutamiento de los 130 pacientes y 3 meses adicionales para el cierre definitivo del ensayo. Por tanto la duración total prevista del ensayo será de 8 meses.

Las fechas previstas son las siguientes:

- Fecha de inclusión del primer paciente: Cuarto trimestre de 2017
- Fecha de inclusión del último paciente: Primer trimestre de 2018
- Fecha de cierre del ensayo: Segundo trimestre de 2018

4. BASE RACIONAL DEL ENSAYO

4.1 INTRODUCCIÓN

Diabetes Tipo 2 e Inflamación

De acuerdo a la Federación de Diabetes Internacional, 382 millones de personas estaban afectadas de diabetes en 2013 (Atlas online de la IDF), y la prevalencia de la enfermedad se espera que aumente hasta los 592 millones de personas en 2035. La diabetes tipo 2 (T2D) constituye actualmente una verdadera pandemia, tratándose de una enfermedad crónica, sistémica y de lento progreso cuyo tratamiento requiere de fármacos con un excelente perfil de seguridad a largo término. Este hecho añade una dificultad adicional en la búsqueda de tratamientos con un adecuado ratio riesgo/beneficio, comparado con otras enfermedades agudas que no requieren de ese requisito. Es por ello que cada vez se está prestando más atención a posibles terapias basadas en compuestos naturales o alimentos funcionales, dándose también una creciente importancia a la prevención mediante la incorporación en la dieta de alimentos con acciones beneficiosas más allá de las meramente nutricionales (alimentos funcionales). La T2D está generalmente precedida de obesidad, inflamación de bajo grado y resistencia a insulina, y se origina cuando la incrementada secreción de insulina pancreática es incapaz de mantener la normoglucemia. Se considera que el daño progresivo en las células del islote pancreático es el desencadenante principal de la T2D ya que, mientras que la resistencia a insulina se mantiene relativamente constante en el tiempo y solo incrementa ligeramente con la edad, el deterioro de la masa de células beta pancreáticas es continuo, siendo cada vez menor la capacidad de secretar insulina, eventualmente culminando en la necesidad de la terapia sustitutiva con insulina.

Se conocen múltiples mecanismos implicados en los defectos de la secreción de insulina por parte de la célula beta, como la glucotoxicidad, lipotoxicidad, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático (ER) y formación de depósitos amiloides en los islotes (1). La contribución relativa de cada uno de estos procesos no está clara pero, interesantemente, todos estos procesos están asociados con la respuesta inflamatoria (2-4). En los islotes pancreáticos, la elevada concentración de glucosa incrementa la actividad metabólica de las células del islote, llevando a un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que promueve la activación del inflamasoma NLRP3 y caspasa 1, activando de esta manera la producción de IL-1 β madura (5), la cual a su vez induce la producción de otras citoquinas como IL-6, IL-8, TNF- α y MCP-1 que promueven la atracción de macrófagos y otras células inmunes. Por otro lado, el incremento en la demanda de insulina también incrementa el estrés del RE, lo cual activa el inflamasoma (4). Incluso el polipéptido amiloide producido por los islotes tiene capacidad para interactuar con las células inmunes promoviendo síntesis de IL-1 β vía inflamasoma (3). Aunque el proceso inflamatorio podría inicialmente ser beneficioso para contrarrestar la resistencia a insulina, promoviendo la proliferación de células beta y la producción de insulina (6), acaba deviniendo en un ciclo vicioso por la autoestimulación de IL-1 β en receptores de los islotes, amplificando la producción de IL-1 β y generando en los macrófagos residentes de los islotes un fenotipo pro-inflamatorio que lleva a disfunción del islote. Por su parte, la resistencia a insulina también está asociada a la respuesta inflamatoria, estando implicados en estos procesos el estrés del retículo, la inflamación asociada al incremento en la acumulación de lípidos, y la muerte celular por lipotoxicidad, hipertrofia e hipoxia. Todos estos procesos provocan la liberación de citoquinas como IL-1 β , TNF- α , IL-8 y MCP-1 que llevan a la acumulación de células inmunes y activación del inflamasoma. Estos

procesos relacionados con la resistencia a insulina han sido descritos en adipocitos, hepatocitos y células del músculo esquelético.

Por todo lo mencionado anteriormente, la inflamación crónica se considera un factor muy importante en la etiología y fisiopatología de la T2D, con potencial para ser una diana terapéutica (7). De hecho, se están ensayando aproximaciones terapéuticas farmacológicas contra la T2D basadas en combatir la inflamación. Se han obtenido resultados prometedores con anticuerpos humanizados contra IL-1 β , los cuales tienen una vida media de unas 3 semanas y permiten una dosificación mensual (8-10). Todos ellos mostraron capacidad para mejorar el metabolismo de la glucosa en pacientes diabéticos, sin evidencias de efectos adversos. Por otro lado, se ha visto que los bloqueantes del TNF- α , producido por los adipocitos en las fases iniciales de la inflamación tisular, mejoran la glucemia en ayunas (11). Finalmente, el salsalato, un tipo de salicilato que no inhibe las enzimas Cox, mejoró el metabolismo de la glucosa en estadios tempranos de la enfermedad, incrementó la adiponectina y redujo la actividad NF- κ B en el tejido adiposo (12). Sin embargo, este tratamiento incrementó los niveles de LDL-colesterol y los niveles de albúmina en orina, efectos que desaparecieron tras el cese del tratamiento (12).

Inflamación, Dieta Mediterránea y Compuestos Fenólicos del Aceite de Oliva Virgen Extra

Mientras que la investigación en terapias farmacológicas con anti-inflamatorios parece ofrecer resultados esperanzadores para los pacientes con T2D, no podemos perder de vista el importante papel de la dieta (y dentro de ella la de algunos micronutrientes presentes en determinados alimentos) así como de los hábitos físicos y el envejecimiento en la modulación de la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y otros procesos que están alterados en la T2D y otras enfermedades metabólicas (13). Interesantemente, el estrés oxidativo está asociado con el número de componentes del síndrome metabólico (14), al igual que ocurre entre la inflamación y el número de desórdenes metabólicos (15). Existen una gran cantidad de estudios que relacionan la dieta mediterránea con la protección contra el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Y dentro de estos una parte importante de ellos están relacionados con las acciones cardiovasculares beneficiosas del aceite de oliva. A este respecto, el estudio PREDIMED ha puesto en valor el aceite de oliva virgen extra, confirmando su capacidad para disminuir los eventos cardiovasculares mayores (16). Entre los mecanismos de protección, este estudio encontró mejoras en las moléculas inflamatorias circulantes, tanto en el estudio piloto (17), como en un estudio final más específico (18). Asimismo, se detectaron mejoras en marcadores de estrés oxidativo como la LDL oxidada, que fueron paralelas a disminuciones en TBARs de células mononucleares (19), y en la capacidad anti-oxidante no enzimática (20); sin embargo, no se encontró asociación entre la capacidad anti-oxidante y la mortalidad (21).

Entre los componentes del aceite de oliva virgen extra, los polifenoles constituyen un grupo de compuestos muy apreciados por sus propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes, que parecen ser clave en las acciones beneficiosas de estos aceites (22-27). Dos de los polifenoles más abundantes en el aceite de oliva virgen extra son el tirosol y el hidroxitirosol (HT). En concreto, el HT ha sido directamente relacionado con efectos protectores de la disfunción endotelial (28) y con modulación de la respuesta inflamatoria (29). Otro polifenol abundante es el 3, 4-dihydroxyphenylglycol (DHPG), que también ha sido relacionado con estos efectos (29). Curiosamente, el HT y el DHPG son capaces de actuar de manera sinérgica inhibiendo la agregación plaquetaria (30). Junto a estos polifenoles, existen otros más apolares y

que son menos abundantes, como la oleaceina y el oleocanthal, no estando presentes en todos los aceites de oliva virgen extra, dependiendo sus niveles de la variedad de aceituna, del régimen de lluvias, de la fecha de recogida y del proceso de obtención del aceite. En concordancia con las propiedades anti-inflamatorias generales de los polifenoles del aceite de oliva, la oleaceina ha sido descrita como potenciadora de la actividad anti-inflamatoria en macrófagos humanos (31) e inhibidora de la actividad de los neutrófilos (32). Por su parte, el oleocanthal ha sido descrito como un anti-inflamatorio natural, una molécula con curiosas similitudes al ibuprofeno, dado que parece activar el mismo receptor que este en la garganta (TRPA1), provocando el picor característico de algunos aceites virgen extra (33-35).

Los mecanismos de acción de estos compuestos fenólicos son bastante desconocidos, siendo el hidroxitirosol el más estudiado. Se han descrito diversas vías de acción para este compuesto, como la regulación de la biogénesis mitocondrial (36), la interferencia con la activación de ERK 1/2 (37), la inducción de la degradación del receptor de EGF (38), acciones a través de vías dependientes de GPR30 (39), modulación del receptor cannabinoide CB1 (40, 41), ... pero su actividad no ha sido asociada a la activación/inhibición de un receptor concreto. Por su parte, la oleaceina disminuye la expresión del receptor CD163 (31), mientras que el oleocanthal activa el receptor TRPA1 (42), sin que exista mucha más información al respecto.

4.2 JUSTIFICACIÓN

Por todo lo comentado anteriormente, el tratamiento intervencional con aceite de oliva enriquecido en oleocanthal nos permitirá valorar si una intervención dietética con aceites que contienen niveles endógenos altos de este polifenol podría ser suficiente para mejorar los parámetros inflamatorios, oxidativos, así como otros metabólicos en pacientes en riesgo de desarrollar T2D, lo cual teóricamente debería ir vinculado a un retraso en el desarrollo de la enfermedad. Esto último es un aspecto a abordar en futuros estudios en humanos, así como la posibilidad de desarrollar y probar aceites de oliva u otros alimentos funcionales, enriquecidos en estos compuestos, que pudieran ser un apoyo nutricional para pacientes en riesgo de desarrollar esta enfermedad.

4.3 HIPÓTESIS

El aceite de oliva virgen extra enriquecido en oleocanthal disminuye la inflamación sistémica en humanos, así como otros parámetros metabólicamente relevantes, como los oxidativos, potencialmente contribuyendo a retardar el denominado "fallo de la célula beta" que dispara la T2D.

4.4 OBJETIVOS

El objetivo general del presente ensayo es estudiar la actividad anti-inflamatoria y anti-oxidante de aceites de oliva virgen extra enriquecidos en oleocanthal, en sujetos humanos en alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2.

El objetivo específico del estudio es:

Realizar un estudio intervencional prospectivo cruzado doble ciego con aceite de oliva virgen extra rico en oleocanthal en personas en riesgo de diabetes tipo 2 evaluando la mejora del estado inflamatorio y oxidativo basal, así como otros parámetros metabólicos.

4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1802-12.
- 2) Ehses JA, Ellingsgaard H, Böni-Schnetzler M, Donath MY. Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction. *Arch Physiol Biochem.* 2009 Oct;115(4):240-7.
- 3) Westwell-Roper CY, Ehses JA, Verchere CB. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 β production and β -cell dysfunction. *Diabetes.* 2014 May;63(5):1698-711.
- 4) Osowski CM, Hara T, O'Sullivan-Murphy B, Kanekura K, Lu S, Hara M, Ishigaki S, Zhu LJ, Hayashi E, Hui ST, Greiner D, Kaufman RJ, Bortell R, Urano F. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab.* 2012 Aug 8;16(2):265-73.
- 5) Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(6):851-60.
- 6) Maedler K, Fontana A, Ris F, Sergeev P, Toso C, Oberholzer J, Lehmann R, Bachmann F, Tassinato A, Spinas GA, Halban PA, Donath MY. FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):8236-41.
- 7) Donath MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jun;13(6):465-76.
- 8) Cavelti-Weder C, Babians-Brunner A, Keller C, Stahel MA, Kurz-Levin M, Zayed H, Solinger AM, Mandrup-Poulsen T, Dinarello CA, Donath MY. Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2012 Aug;35(8):1654-62.
- 9) Hensen J, Howard CP, Walter V, Thuren T. Impact of interleukin-1 β antibody (canakinumab) on glycaemic indicators in patients with type 2 diabetes mellitus: results of secondary endpoints from a randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Metab.* 2013 Dec;39(6):524-31.
- 10) Sloan-Lancaster J, Abu-Raddad E, Polzer J, Miller JW, Scherer JC, De Gaetano A, Berg JK, Landschulz WH. Double-blind, randomized study evaluating the glycemic and anti-inflammatory effects of subcutaneous LY2189102, a neutralizing IL-1 β antibody, in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013 Aug;36(8):2239-46.
- 11) Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, Rasheed S, Makimura H, Lee H, Khor VK, Ahima RS, Grinspoon SK. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jan;96(1):E146-50.
- 12) Goldfine AB, Conlin PR, Halperin F, Koska J, Permana P, Schwenke D, Shoelson SE, Reaven PD. A randomised trial of salsalate for insulin resistance and cardiovascular risk factors

in persons with abnormal glucose tolerance. *Diabetologia*. 2013 Jan 31. [Epub ahead of print]
PubMed PMID: 23370525

13) Marín C, Yubero-Serrano EM, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F. Endothelial aging associated with oxidative stress can be modulated by a healthy mediterranean diet. *Int J Mol Sci*. 2013 Apr 24;14(5):8869-89.

14) Yubero-Serrano EM, Delgado-Lista J, Peña-Orihuela P, Perez-Martinez P, Fuentes F, Marin C, Tunez I, Tinahones FJ, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J. Oxidative stress is associated with the number of components of metabolic syndrome: LIPGENE study. *Exp Mol Med*. 2013 Jun 21;45:e28.

15) Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000 Jul 4;102(1):42-7.

16) Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013 Apr 4;368(14):1279-90.

17) Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, Fiol M, Gómez-Gracia E, López-Sabater MC, Vinyoles E, Arós F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Sáez G, Ros E; PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 Jul 4;145(1):1-11.

18) Mena MP, Sacanella E, Vazquez-Agell M, Morales M, Fitó M, Escoda R, Serrano-Martínez M, Salas-Salvadó J, Benages N, Casas R, Lamuela-Raventós RM, Masanes F, Ros E, Estruch R. Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jan;89(1):248-56.

19) Fitó M, Guxens M, Corella D, Sáez G, Estruch R, de la Torre R, Francés F, Cabezas C, López-Sabater Mdel C, Marrugat J, García-Arellano A, Arós F, Ruiz-Gutierrez V, Ros E, Salas-Salvadó J, Fiol M, Solá R, Covas MI; PREDIMED Study Investigators. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med*. 2007 Jun 11;167(11):1195-203.

20) Zamora-Ros R, Serafini M, Estruch R, Lamuela-Raventós RM, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Fiol M, Lapetra J, Arós F, Covas MI, Andres-Lacueva C; PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013 Dec;23(12):1167-74.

21) Henríquez-Sánchez P, Sánchez-Villegas A, Ruano-Rodríguez C, Gea A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Schröder H, Gutiérrez-Bedmar M, Santos-Lozano JM, Pintó X, Arós F, Fiol M, Tresserra-Rimbau A, Ros E, Martínez-González MA, Serra-Majem L. Dietary total antioxidant capacity and mortality in the PREDIMED study. *Eur J Nutr*. 2016 Feb;55(1):227-36.

- 22) Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*. 2007 Jan;190(1):181-6.
- 23) Pacheco YM, Bemúdez B, López S, Abia R, Villar J, Muriana FJ. Minor compounds of olive oil have postprandial anti-inflammatory effects. *Br J Nutr*. 2007 Aug;98(2):260-3.
- 24) Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Haro C, Meza-Miranda ER, Peña-Orihuela P, Meneses ME, Marin C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Fernandez-Real JM, Luque de Castro MD, Tinahones FJ, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F. Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. *Food Chem*. 2014 Nov 1;162:161-71. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.047.
- 25) Rangel-Zuñiga OA, Haro C, Tormos C, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Marin C, Quintana-Navarro GM, Cerdá C, Sáez GT, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Camargo A. Frying oils with high natural or added antioxidants content, which protect against postprandial oxidative stress, also protect against DNA oxidation damage. *Eur J Nutr*. 2016 Mar 25.
- 26) Martín-Peláez S, Castañer O, Konstantinidou V, Subirana I, Muñoz-Aguayo D, Blanchart G, Gaixas S, de la Torre R, Farré M, Sáez GT, Nyssönen K, Zunft HJ, Covas MI, Fitó M. Effect of olive oil phenolic compounds on the expression of blood pressure-related genes in healthy individuals. *Eur J Nutr*. 2015 Dec 12.
- 27) Hernáez Á, Remaley AT, Farràs M, Fernández-Castillejo S, Subirana I, Schröder H, Fernández-Mampel M, Muñoz-Aguayo D, Sampson M, Solà R, Farré M, de la Torre R, López-Sabater MC, Nyssönen K, Zunft HJ, Covas MI, Fitó M. Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial. *J Nutr*. 2015 Aug;145(8):1692-7.
- 28) Catalán Ú, López de Las Hazas MC, Rubió L, Fernández-Castillejo S, Pedret A, de la Torre R, Motilva MJ, Solà R. Protective effect of hydroxytyrosol and its predominant plasmatic human metabolites against endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Dec;59(12):2523-36.
- 29) Aparicio-Soto M, Sánchez-Fidalgo S, González-Benjumea A, Maya I, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C. Naturally occurring hydroxytyrosol derivatives: hydroxytyrosyl acetate and 3,4-dihydroxyphenylglycol modulate inflammatory response in murine peritoneal macrophages. Potential utility as new dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2015 Jan 28;63(3):836-46.
- 30) Rubio-Senent F, de Roos B, Duthie G, Fernández-Bolaños J, Rodríguez-Gutiérrez G. Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *Eur J Nutr*. 2015 Dec;54(8):1287-95.
- 31) Filipek A, Czerwińska ME, Kiss AK, Wrzosek M, Naruszewicz M. Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression. *Phytomedicine*. 2015 Dec 15;22(14):1255-61.

- 32) Czerwińska ME, Kiss AK, Naruszewicz M. Inhibition of human neutrophils NEP activity, CD11b/CD18 expression and elastase release by 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde, oleacein. *Food Chem.* 2014 Jun 15;153:1-8.
- 33) Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature.* 2005 Sep 1;437(7055):45-6.
- 34) Iacono A, Gómez R, Sperry J, Conde J, Bianco G, Meli R, Gómez-Reino JJ, Smith AB 3rd, Gualillo O. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis Rheum.* 2010 Jun;62(6):1675-82
- 35) Scotece M, Gómez R, Conde J, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Lago F, Smith AB 3rd, Gualillo O. Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sci.* 2012 Dec 10;91(23-24):1229-35.
- 36) 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.
- 37) Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Andò S, Maggiolini M, Pezzi V. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Jun;54(6):833-40.
- 38) Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Andò S, Maggiolini M, Pezzi V. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Jun;54(6):833-40.
- 39) Chimento A, Casaburi I, Rosano C, Avena P, De Luca A, Campana C, Martire E, Santolla MF, Maggiolini M, Pezzi V, Sirianni R. Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Mar;58(3):478-89.
- 40) Tutino V, Orlando A, Russo F, Notarnicola M. Hydroxytyrosol Inhibits Cannabinoid CB1 Receptor Gene Expression in 3T3-L1 Preadipocyte Cell Line. *J Cell Physiol.* 2016 Feb;231(2):483-9.
- 41) Di Francesco A, Falconi A, Di Germanio C, Micioni Di Bonaventura MV, Costa A, Caramuta S, Del Carlo M, Compagnone D, Dainese E, Cifani C, Maccarrone M, D'Addario C. Extravirgin olive oil up-regulates CB₁ tumor suppressor gene in human colon cancer cells and in rat colon via epigenetic mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2015 Mar;26(3):250-8.
- 42) Peyrot des Gachons C, Uchida K, Bryant B, Shima A, Sperry JB, Dankulich-Nagrudny L, Tominaga M, Smith AB 3rd, Beauchamp GK, Breslin PA. Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *J Neurosci.* 2011 Jan 19;31(3):999-1009.

5. DISEÑO DEL ESTUDIO

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio intervencional prospectivo, aleatorizado, cruzado, doble ciego.

5.2 DISEÑO GLOBAL DEL ESTUDIO

Se propone un ensayo de intervención con dos grupos de sujetos obesos pre-diabéticos que serán asignados inicialmente, de manera aleatoria, a una de las siguientes intervenciones nutricionales:

A) Sustitución del aceite de consumo habitual por un aceite de oliva virgen extra rico en oleocanthal (experimental).

B) Sustitución del aceite de consumo habitual por un aceite de oliva sin oleocanthal (control).

Al mes de la intervención, se procederá a llevar a cabo un periodo de "lavado" de 15 días. Tras el periodo de lavado, los sujetos llevarán a cabo otra intervención nutricional de un mes de duración en la cual los sujetos previamente asignados al grupo "A" serán asignados al grupo "B" y viceversa. Al inicio y al final de cada mes de intervención se procederá a una toma de datos y muestras con objeto de valorar el efecto de las intervenciones en la salud de los sujetos.

5.3 INTERVENCIÓN Y ASIGNACIÓN DE LA MISMA

La intervención se realizará sobre dos grupos de 65 sujetos obesos pre-diabéticos, y consiste en sustituir todo el aceite de consumo de la unidad familiar por los aceites objeto de estudio. En concreto se van a estudiar dos aceites de oliva, uno con alto contenido en la sustancia oleocanthal (experimental) y otro con bajo contenido en esta molécula (control).

Para llevar a cabo la sustitución efectiva de todo el aceite de consumo habitual de los sujetos participantes en el estudio, se les entregará 1 litro de aceite por semana (para familias de hasta 3 miembros) ó 1.5 litros de aceite por semana (para familias de más de 3 miembros).

La asignación inicial de los pacientes a uno u otro tratamiento será de forma aleatoria utilizando una tabla de números aleatorios. La asignación aleatoria será 1:1 sin estratificación. Este procedimiento se realizará una vez que el paciente haya firmado el consentimiento informado. La lista generada será custodiada en el archivo del promotor.

5.4 CREACIÓN DE UN BIOBANCO

A todos los pacientes además de solicitarle su consentimiento informado para participar en el estudio, se les solicitará su consentimiento para la cesión de muestras biológicas para la creación de un biobanco. Se recogerán en los días 0 y 30 de cada periodo de intervención una muestra de sangre de 18,5 mL (10 mL de suero, 5 mL de plasma para análisis del perfil inflamatorio y oxidativo, y 5 mL para mediciones de hormonas) para ulteriores estudios relacionados con el metabolismo, inflamación y oxidación. Las muestras de los pacientes incluidos en el estudio serán procesadas y congeladas a -80°C de forma temporal durante el ensayo en el hospital donde se incluye al paciente siguiendo protocolos normalizados. A la finalización del seguimiento del último paciente incluido en el centro, se realizará un único envío y cesión con todas las muestras al biobanco del Hospital Regional de Málaga-IBIMA, que forma parte del biobanco del sistema sanitario público de Andalucía (BSSPA).

6. SELECCIÓN DE SUJETOS

6.1 POBLACIÓN A ESTUDIO

Se estudiará una población de pacientes de ambos sexos de 40-65 años, diagnosticados de pre-diabetes mediante la medición de la hemoglobina glicosilada (5.7-6.4), y que cumplan el resto de los criterios de inclusión, así como que no presenten ninguno de los criterios de exclusión, y que acepten participar de forma voluntaria en el estudio. Para ello, se partirá de la población del estudio Pizarra, un estudio epidemiológico de la UGC de Endocrinología y Nutrición del Hospital Regional de Málaga que ha permitido tener información detallada de parámetros antropométricos, bioquímicos, de hábitos alimenticios y de estilo de vida en una cohorte de unos 1700 sujetos. Partiendo de dicha base de datos, se procederá a llamar a los candidatos con parámetros de pre-diabetes, para su posible inclusión en el estudio, previo consentimiento informado y confirmación de los criterios de inclusión y exclusión. En caso que se considere necesario, se reclutarán también candidatos de las consultas de Obesidad y Nutrición de la UGC de Endocrinología y Nutrición.

6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Adultos (40-65 años)
- Obesos: BMI 30-40
- Hemoglobina glicosilada (HbA1c): 5.7-6.4.
- Firma del consentimiento informado.

6.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Diagnóstico previo de Diabetes Mellitus.
- Gestantes
- Diagnóstico de algún tipo de neoplasia
- Enfermedades inflamatorias en curso (Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis, ...) y/o tratamientos con anti-inflamatorios
- Mujeres en terapia hormonal sustitutiva
- Comer regularmente fuera de casa más de 3 comidas (almuerzo o cena) a la semana (salvo que se trate de comida casera preparada con el aceite de casa).

6.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS SUJETOS

Los pacientes serán identificados con un código numérico de identificación secuencial, el cual será asignado a cada paciente según orden correlativo de inclusión cuando otorgue su consentimiento informado. Este código tendrá tres números en función del orden de aleatorización asignado. En el caso que un paciente sea incluido en el estudio, y se considere no apto para continuar en el estudio o bien el paciente retire su consentimiento, el código que tenía asignado ese paciente no podrá ser reutilizado para el siguiente paciente consecutivamente asignado.

El promotor solo podrá identificar a los sujetos por el código que les ha sido asignado, su fecha de nacimiento, sexo y fecha de firma del consentimiento informado. El investigador mantendrá un registro con los nombres de los pacientes y el código de identificación asignado.

6.5 CRITERIOS DE RETIRADA Y ANÁLISIS PREVISTO DE LAS RETIRADAS Y ABANDONOS

Se define como retirada la situación en que un paciente incluido finaliza su participación en el ensayo clínico antes de completar el protocolo, independientemente de las circunstancias. Los pacientes interrumpirán su participación en el ensayo si se produce alguna de las siguientes situaciones:

- Cuando el paciente no coopere o no cumpla los requerimientos del estudio.
- Resultado(s) anormal(es) de los procedimientos de las exploraciones.
- Desviación grave del protocolo.
- Retirada del consentimiento por parte del paciente.
- Pérdida de seguimiento del paciente.

Deberá registrarse en el Cuaderno de Recogida de Datos la fecha y el motivo por el que un sujeto interrumpe su participación en el ensayo. El paciente tiene derecho de discontinuar el estudio en el momento que lo desee y cualquier paciente puede ser retirado del estudio por cualquier motivo beneficioso para su bienestar.

7. DESARROLLO DEL ENSAYO Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA

7.1 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

La eficacia de la intervención dietética será evaluada por su capacidad para mejorar el estado inflamatorio sistémico. Para ello se medirán los niveles sanguíneos de una batería de citoquinas inflamatorias, incluyendo hs-CRP, IL-6 y TNF-alfa.

Además, se valorará la mejora en el estado oxidativo, el peso corporal y el perfil metabólico, incluyendo la microbiota intestinal. También se realizará un análisis de bioquímica estándar.

Para evaluar el estado oxidativo se medirán los niveles séricos de LDL-oxidada, 8-isoprostano, TBARs, proteínas carboniladas y la capacidad anti-oxidante.

Para evaluar el perfil metabólico se medirán la glucemia, hemoglobina glicosilada, HOMA-IR, leptina, adiponectina e insulina. Asimismo, la composición de la microbiota intestinal será determinada en una muestra de heces.

7.2 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD

Al tratarse de una intervención nutricional con un alimento, y en dosis iguales a las consumidas de manera habitual, no se considera necesario realizar evaluación de seguridad de la intervención.

7.3 DESARROLLO DEL ENSAYO

Los sujetos candidatos al estudio serán vistos en una consulta cedida al grupo de investigación epidemiológica de la UGC en la localidad malagueña de Pizarra, de donde toma nombre el estudio Pizarra, y que dispone de todo lo necesario para la ejecución del ensayo. Asimismo, en caso de necesitarse reclutar pacientes de las consultas de Obesidad y Nutrición de la UGC de Endocrinología, estos pacientes serían vistos en la consulta H del Pabellón 3, sótano, del Hospital Civil. Para el desarrollo del ensayo los pacientes realizarán las siguientes visitas:

Visita de selección/inclusión, día 0.

Los pacientes candidatos se identificarán a través de la base de datos del estudio epidemiológico Pizarra y, en caso de no haber suficientes, de las consultas de obesidad y nutrición del Hospital Civil de Málaga. Una vez identificado el paciente candidato, se le informará por carta del estudio y se le avisará de una próxima llamada telefónica para confirmar a una primera visita de selección/inclusión con una muestra de orina y heces. En dicha visita, se informará detalladamente al sujeto sobre el estudio, se evaluarán los criterios de inclusión y exclusión y se les facilitarán los consentimientos informados. Una vez firmados, el investigador aleatorizará al paciente a través de una tabla de números aleatorios a una rama de tratamiento. Una vez asignada la rama de tratamiento que comienza el paciente, se realizará la recolección de datos antropométricos, clínicos, de hábitos dietéticos y de actividad física.

Asimismo, se tomarán muestras de sangre para un análisis estándar bioquímico, mediciones de parámetros inflamatorios y perfil metabólico y de estrés oxidativo. Se recogerá la muestra de orina y heces solicitada por teléfono y se le entregará entre 1 y 1.5 litros del aceite correspondiente por semana, en función del tamaño familiar (familias de hasta 3 miembros, 1 litro por semana; familias de más de 3 miembros 1.5 litros por semana), para un periodo total de un mes. Se les hará énfasis en que todo el aceite de cocinar de la casa durante ese mes debe ser sustituido por el aceite entregado, de modo que sea consumido tanto en crudo como en los guisos y frituras. No se darán consejos sobre cambios de dieta o hábitos saludables.

Visita seguimiento día +30.

A los 30 días de la intervención nutricional se citará al paciente solicitándole que traiga una muestra de orina y heces. Se registrarán de nuevo los datos antropométricos, clínicos, de hábitos dietéticos y de actividad física. También se tomarán muestras de sangre para bioquímica, parámetros inflamatorios, perfil metabólico y perfil oxidativo.

Se le pedirá que durante los siguientes 15 días no consuma el aceite que se le entregó, y que vuelvan a consumir el habitual de casa. Asimismo, se les emplazará para una siguiente visita al final de los 15 días del periodo de "lavado".

Visita seguimiento día +45.

Tras el periodo de lavado, se volverá a ver al paciente, que traerá una nueva muestra de orina y heces y se volverán a registrar los datos antropométricos, clínicos, de hábitos dietéticos y de actividad física. También se tomarán muestras de sangre para bioquímica, parámetros inflamatorios, perfil metabólico y perfil oxidativo. Se les emplazará a una nueva intervención dietética de un mes, pero utilizando el otro aceite al usado en el primer periodo de intervención. Así, los pacientes que realizaron con anterioridad el ensayo con el aceite rico en oleocanthal, lo harán ahora con el aceite sin oleocanthal, y viceversa. De nuevo, se les hará énfasis en que todo el aceite de cocinar de la casa durante ese mes debe ser sustituido por el aceite entregado, de modo que sea consumido tanto en crudo como en los guisos y frituras. No se darán consejos sobre cambios de dieta o hábitos saludables.

Visita fin de seguimiento, día +75.

Una vez terminada esta segunda intervención dietética de 30 días, se verá al paciente al que se le habrá solicitado de nuevo que traiga una muestra de orina y heces. Se registrarán de nuevo los datos antropométricos, clínicos, de hábitos dietéticos y de actividad física. También se tomarán muestras de sangre para bioquímica, parámetros inflamatorios, perfil metabólico y perfil oxidativo.

8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

8.1 TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño muestral se ha calculado en base a la diferencia entre las medias poblaciones de sujetos con diabetes o sin diabetes en el marcador inflamatorio hsCRP, con un error $\alpha=0.05$ y un error $\beta=0.2$. De acuerdo a estos parámetros, para este estudio se necesitan dos grupos de 65 sujetos cada uno.

8.2 VARIABLES RECOGIDAS

En el presente ensayo se incluyen los siguientes grupos de variables:

Datos antropométricos: peso, talla, índice de masa corporal, circunferencia de cintura, tensión.

Datos clínicos: Enfermedades anteriores o en curso, medicación actual.

Datos nutricionales: Hábitos dietéticos (Score PREDIMED), encuesta semi-cuantitativa de frecuencia alimentaria.

Datos de actividad Física: Cuestionario IPAQ abreviado.

Datos analíticos: Bioquímica estándar (glucosa plasmática, HbA1c plasmática, perfil lipídico, función renal, función hepática, linfocitos, ...), marcadores inflamatorios (panel de citoquinas inflamatorias, incluyendo hs-CRP, IL-6 y TNF- α), marcadores de estrés oxidativo (8-isoprostano, TBARs, proteínas carboniladas, LDL-oxidada, capacidad anti-oxidante), hormonas (insulina, leptina, adiponectina), perfil de microbiota en heces, niveles en orina de hidroxitirosol.

8.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Al finalizar el presente proyecto habrá los siguientes grupos de variables (basal, tras 15 días de lavado y 30 días tras cada intervención, en total 4 tomas de datos): 1. Variables antropométricas, 2. Variables clínicas, 3. Variables nutricionales, 4. Variables de actividad física, 5. Variables inflamatorias, 6. Variables de estrés oxidativo, 7. Variables bioquímicas, 8. Variables hormonales y 9. Variables relacionadas con la microbiota. El análisis principal se realizará por medio de ANOVA de medidas repetidas, ajustado por posibles variables confundentes. En caso de variables no normales, se intentará su normalización y en último término se utilizarían test no paramétricos (Friedman) en un análisis estratificado. Para ello se utilizará el software SPSS.

9 ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Dada la naturaleza y las cantidades del agente a ensayar en este ensayo intervencional (aceite de oliva en un régimen de consumo normal familiar) no se prevé ningún tipo de acontecimiento adverso o reacción adversa relacionado con este ensayo.

10 ASPECTOS ÉTICOS

La recolección y el procesamiento de las muestras de sangre periférica humana y de los datos personales y antropométricos, así como los datos obtenidos en los test de hábitos alimentarios y de actividad física se realizarán de acuerdo a la normativa legal vigente sobre el uso de muestras humanas, preservándose y codificando de manera adecuada la identidad de los sujetos involucrados en el estudio. Se adjunta copia del consentimiento informado que firmará cada

sujeto incluido en el estudio. Este estudio no se iniciará hasta contar con el conocimiento y visto bueno del CEI Provincial de Málaga. Una vez terminado el ensayo, el resto de muestras humanas de plasma procedente de sangre periférica obtenidas en el presente estudio serán almacenadas en el Biobanco del IBIMA (que forma parte de BSSPA), con el fin de que puedan ser aprovechadas por cualquier investigador que las considere útiles.

11 PRESUPUESTO

Personal:

Contratación Enfermera 8 meses, 50% jornada.....7,500€

Bienes y Servicios:

Medición marcadores inflamatorios y oxidativos.....7,000€

Mediciones hormonales.....3,000€

Estudio de la microbiota.....4,000€

Mediciones Bioquímicas.....3,000€

Otros gastos:

Adquisición aceites.....2,300€

TOTAL.....26,800€