



EL HIDROXITIRO SOL COMO ANTIOXIDANTE DE  
ORIGEN ENDÓGENO Y NATURAL: MODULACIÓN  
POR LA INGESTA DE ALCOHOL

**TESIS DOCTORAL**

Clara Pérez Mañá

Director: Magí Farré Albaladejo

Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología

Facultad de Medicina

Universidad Autònoma de Barcelona

Julio de 2014





## TESIS DOCTORAL

# EL HIDROXITIRO SOL COMO ANTIOXIDANTE DE ORIGEN ENDÓGENO Y NATURAL: MODULACIÓN POR LA INGESTA DE ALCOHOL

Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Barcelona

Julio de 2014

Clara Pérez Mañá

Magí Farré Albaladejo

Firma:

Firma:





**Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia**

Magí Farré Albaladejo, Catedr àtic de Farmacologia del Departament de Farmacologia, de Terap èutica i de Toxicologia de la Universitat Aut ònoma de Barcelona

**CERTIFICA:**

Que la memòria presentada per Clara Pérez Mañá amb títol “El hidroxitirosol como antioxidante de origen endógeno y natural: modulaci3n por la ingesta de alcohol”, ha estat realitzada sota la seva direcci3. La mem òria reuneix les condicions per ser presentada per optar al grau de Doctor.

I perqu consti als efectes oportuns signo el present certificat a Barcelona, a 18 de Juliol de 2014.

Prof. Magí Farré Albaladejo



*Al Toni, l'Esperança, en Lluís i l'Olga*



## **AGRADECIMIENTOS**

Han pasado cinco años desde el inicio de este proyecto y en todo este tiempo muchas personas han aportado su granito de arena para hacerlo posible. Se trata de un trabajo que más que nunca ha sido fruto de la colaboración entre distintas áreas de conocimiento. Para llevarlo a cabo ha participado el Grupo de Investigación Clínica en Farmacología Humana y Neurociencias y también algunos de los integrantes del Grupo de Riesgo Cardiovacular y Nutrición del Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM). De antemano quiero agradecer a todos y cada uno de ellos su colaboración.

No obstante la persona indispensable a lo largo de todo este camino ha sido Magí Farré, el director de mi tesis. En primer lugar agradecerle la confianza depositada en mí desde mi incorporación en el IMIM y, en particular, por proponerme este tema para realizar la tesis doctoral. Con el tiempo me he dado cuenta que lo más importante en realidad ha sido ofrecerme la posibilidad de trabajar con él. Magí es sin duda un investigador modelo que ha logrado todo aquello que cualquiera en este campo querría conseguir. Pero no son sus amplios conocimientos en el campo de la farmacología los que pretendo destacar (que obviamente son los que más llaman la atención) sino su rigor científico y su capacidad incesante de innovación. Además quiero agradecerle que me haya dado las herramientas para ser cada día más autónoma. Magí promueve que uno sepa encontrar la respuestas por sí mismo, y es de este modo como se aprenden las cosas para siempre.

Quiero agradecer a Rafael de la Torre su inestimable contribución tanto en aspectos del diseño como en la interpretación de los resultados de este proyecto. Sus conocimientos han complementado mi perspectiva más clínica. Rafael es una persona muy pragmática, y tiene la cualidad de encontrar soluciones sencillas a problemas complicados. Del mismo modo quiero agradecerle la confianza depositada en mí tanto para éste como para futuros proyectos.

Gracias también a Maribel Covas y Montserrat Fitó por aportar su dilatada experiencia en el campo de la nutrición para la discusión de los resultados.

A continuación quiero agradecer a los integrantes del área clínica todo el trabajo que ha supuesto el desarrollo de las sesiones experimentales de ambos estudios. Particularmente a las enfermeras Esther Menoyo, Marta Pérez, Soraya Martín y Clara Gibert por su ayuda en la selección de voluntarios, preparación de medicación, obtención de muestras, y creación de bases de datos. Pero sobretodo, gracias por hacer que ir a trabajar sea un placer además de una obligación. Y muy especialmente a Esther Papaseit, mi compañera de batallas, con la que he podido compartir los momentos buenos y no tan buenos, y de la que quiero destacar su gran generosidad. Tener a una persona tan trabajadora como Esther a mi lado es un estímulo para mí. Del mismo modo también quiero recordar la ayuda de Cristina Mustata y de Ricardo Pardo en un primer momento.

Los estudios de este proyecto han generado una cantidad importante de muestras con la que ha tenido que lidiar el equipo de técnicos de laboratorio. Muchas gracias a Mitona Pujadas, Jose Rodríguez, Toni Pastor, Ester Civit y Erika Ortiz por el esfuerzo y por no tirar la toalla en ningún momento. Gracias a los estadísticos, especialmente a Klaus Langohr, pero también a Xavi Vidal e Isaac Subirana por sus respuestas a mis múltiples preguntas.

También quiero mencionar a otros compañeros con los que he podido compartir experiencias o conocimiento. Gracias Rocío Rodríguez, Samanta Yubero, Débora González, Julián Mateus, Aída Cuenca, Laura del Hoyo, Cristina Llop y Eliza de Sousa. Gracias también a Eva Maria López y Xavi Castells por vuestros consejos.

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 EL ALCOHOL .....</b>	<b>7</b>
3.1.1 Epidemiología.....	7
3.1.2 Mecanismo de acción, efectos farmacológicos y tóxicos .....	10
3.1.3 Farmacocinética .....	15
3.1.3.1 <i>Farmacocinética del alcohol</i> .....	15
3.1.3.2 <i>Metabolismo oxidativo del alcohol</i> .....	15
3.1.2.3 <i>Metabolismo no oxidativo del alcohol</i> .....	16
3.1.2.4 <i>Influencia del género, el tabaco y los medicamentos en el metabolismo del alcohol</i> .....	18
3.1.4 Efectos beneficiosos del consumo leve-moderado de alcohol para la salud.....	19
3.1.4.1 <i>Enfermedad cardiovascular y mortalidad</i> .....	19
<b>3.2 LOS FENOLES .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 EL VINO .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4. ALCOHOL Y GENERACIÓN ENDÓGENA DE HIDROXITIROSO.....</b>	<b>29</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>35</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>6. ESTUDIOS, FINANCIACIÓN, ÉTICA .....</b>	<b>39</b>
<b>7. MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
<b>7.1 MÉTODOS ESTUDIO DOPET 1.....</b>	<b>43</b>
7.1.1 Diseño .....	43
7.1.2 Condiciones de tratamiento .....	45
7.1.3 Sujetos .....	46
7.1.3.1 <i>Cálculo del tamaño muestral</i> .....	46
7.1.4 Objetivos .....	46

7.1.5 Variables .....	47
7.1.6 Criterios de inclusión y exclusión .....	47
7.1.7 Requerimientos del estudio .....	49
7.1.8 Sesiones experimentales.....	49
7.1.9 Métodos de análisis de las muestras .....	53
7.1.10 Análisis estadístico .....	53
<b>7.2 MÉTODOS ESTUDIO DOPET 2.....</b>	<b>56</b>
7.2.1 Diseño .....	56
7.2.2 Condiciones de tratamiento .....	57
7.2.3 Sujetos .....	59
7.2.3.1 Cálculo del tamaño muestral.....	60
7.2.4 Objetivos .....	60
7.2.5 Variables .....	60
7.2.6 Criterios de inclusión y exclusión.....	61
7.2.7 Requerimientos del estudio .....	65
7.2.8 Sesiones experimentales.....	68
7.2.9 Métodos de análisis de las muestras.....	73
7.2.10 Análisis estadístico .....	74
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
<b>8.1. RESULTADOS DOPET 1 .....</b>	<b>77</b>
8.1.1. Características demográficas basales .....	77
8.1.2. Dosis de alcohol vs. dosis ajustada al peso.....	77
8.1.3. Concentraciones de alcohol en sangre.....	79
8.1.3.1. Concentraciones máximas ( $C_{max}$ ).....	79
8.1.3.2. Área bajo la curva (AUC) .....	81
8.1.3.3. Tiempo máxima concentración ( $t_{max}$ ).....	84
8.1.3.4. Curso temporal .....	86
8.1.3.5 Resumen de alcohol en sangre.....	87
8.1.4. Efectos subjetivos (sensación de borrachera) .....	88

8.1.4.1. Efectos máximos ( $E_{max}$ ).....	88
8.1.4.2. Área bajo la curva (AUC) .....	89
8.1.4.3. Tiempo máximo efecto ( $t_{max}$ ) .....	91
8.1.4.4. Curso temporal .....	92
8.1.4.5. Resumen de efectos subjetivos .....	93
8.1.5. Correlación entre concentraciones y efectos .....	94
8.1.6 Excreción urinaria de hidroxitiroso.....	95
8.1.6.1. Hidroxitiroso total.....	95
8.1.6.2. Hidroxitiroso sulfato.....	100
8.1.6.3. Hidroxitiroso libre .....	101
8.1.6.4. Hidroxitiroso glucurónidos .....	101
8.1.6.5. Homovanil alcohol total.....	102
8.1.6.6. Hidroxitiroso basal.....	103
8.1.6.7. Resumen de hidroxitiroso.....	104
8.1.7. Excreción urinaria de tiroso .....	105
8.1.7.1. Resumen de tiroso .....	109
8.1.8. Excreción urinaria de DOPAC, HVA y razón DOPAC/OHTyr .....	110
8.1.8.1 Ácido 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC).....	110
8.1.8.2. Ácido homovanílico (HVA) .....	111
8.1.8.3. Razón DOPAC/OHTyr .....	112
8.1.8.4. Resumen de DOPAC, HVA, razón DOPAC/OHTyr .....	115
8.1.9. Correlación entre hidroxitiroso, alcohol, tiroso y DOPAC ..	116
8.1.10. Constantes vitales .....	117
8.1.11. Acontecimientos adversos.....	117
<b>8.2. RESULTADOS ESTUDIO DOPET 2 .....</b>	<b>119</b>
8.2.1. Características demográficas basales .....	119
8.2.2. Características basales de las principales variables del estudio .....	120

8.2.3. Contenido en fenoles de los vinos .....	121
8.2.4. Diagrama de flujo de los participantes .....	123
8.2.5. Concentraciones de alcohol en sangre .....	124
8.2.5.1 <i>Comparación entre las cohortes</i> .....	127
8.2.6. Concentraciones de alcohol en aire espirado .....	128
8.2.7. Efectos subjetivos.....	129
8.2.7.1 <i>Comparación entre cohortes</i> .....	133
8.2.8. Correlación entre efectos y concentraciones .....	133
8.2.9. Rendimiento psicomotor .....	134
8.2.9.1. <i>Resumen de efectos subjetivos y rendimiento psicomotor</i> .....	135
8.2.10. Excreción urinaria de hidroxitirosol y tirosol .....	136
8.2.10.1. <i>Hidroxitirosol</i> .....	142
8.2.10.2. <i>Tirosol</i> .....	143
8.2.10.3 <i>Comparación entre cohortes</i> .....	143
8.2.11. Recuperación urinaria de hidroxitirosol y tirosol.....	145
8.2.12. Excreción urinaria de DOPAC, HVA y razón DOPAC/OHTyr .....	147
8.2.12.1 <i>Ácido 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC)</i> .....	147
8.2.12.2 <i>Ácido homovanílico (HVA)</i> .....	147
8.2.12.3 <i>Razón DOPAC/OHTyr</i> .....	147
8.2.13 Precusores síntesis de dopamina y tiramina .....	149
8.2.13.1 <i>Excreción urinaria de tirosina.</i> .....	149
8.2.14 Metabolismo de la tiramina a tirosol.....	151
8.2.14.1 <i>Excreción urinaria de ácido 4-hidroxifenilacético</i> .....	151
8.2.14.2 <i>Razón 4-HPAA/Tyr</i> .....	152
8.2.15 Resumen de precursores y metabolitos mayoritarios dopamina .....	153
8.2.16. Estudio con precursores en animales .....	154

8.2.17. Correlaciones entre alcohol, fenoles y metabolitos de la dopamina .....	156
8.2.18. Perfil lipídico en sangre y concentraciones de glucosa.....	158
8.2.18.1. Triglicéridos.....	158
8.2.18.2. Colesterol total.....	161
8.2.18.3. Colesterol HDL.....	163
8.2.18.4. Colesterol LDL .....	166
8.2.18.5. Glucosa.....	169
8.2.18.6 Resumen de lípidos y glucosa .....	172
8.2.19. Correlaciones entre glucosa y lípidos, alcohol e hidroxitirosol .....	175
8.2.20 Biomarcadores de oxidación .....	176
8.2.20.1. Peróxidos lipídicos (TBARS).....	176
8.2.20.2. LDL oxidada.....	179
8.2.20.3 Resumen de biomarcadores de oxidación .....	181
8.2.21 Correlación entre los parámetros de oxidación e hidroxitirosol .....	182
8.2.22 Biomarcadores de inflamación.....	183
8.2.22.1. Proteína C reactiva.....	183
8.2.22.2. Interleucina-6 .....	184
8.2.22.3. Molécula de adhesión vascular (VCAM).....	185
8.2.22.4. Molécula de adhesión intercelular (ICAM).....	188
8.2.22.5. Resumen de biomarcadores de inflamación.....	190
8.2.23 Constantes vitales.....	191
8.2.23.1. Presión arterial sistólica .....	191
8.2.23.2 Presión arterial diastólica .....	193
8.2.23.3 Frecuencia cardíaca.....	195
8.2.23.4 Temperatura oral .....	198
8.2.23.5 Resumen de constantes vitales .....	200
8.2.24 Acontecimientos adversos.....	201

8.3. COMPARACIÓN EXCRECIÓN DE FENOLES ENTRE DOPET 1 Y DOPET 2.....	203
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>209</b>
9.1. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL ETANOL..	212
9.2. DOSIS DE ALCOHOL SELECCIONADAS.....	215
9.3. SUJETOS SELECCIONADOS .....	217
9.4. EXCRECIÓN Y RECUPERACIÓN URINARIA DE FENOLES..	219
9.4.1 Cambio en el metabolismo oxidativo de la dopamina a hidroxitirosol .....	221
9.4.2 Cambio en el metabolismo oxidativo de la tiramina a tirosol	223
9.4.3 Aumento de la biodisponibilidad del tirosol con el alcohol....	224
9.4.4 Transformación del tirosol en hidroxitirosol.....	225
9.4.5 Tranformación de la tiramina o tirosina del vino.....	226
9.4.6 Resumen mecanismos propuestos.....	227
9.4.7. Comparación entre estudios y dosis .....	229
9.4.8 Comparación entre el vino y el aceite .....	231
<b>9.5 EFECTOS SOBRE DIVERSOS BIOMARCADORES .....</b>	<b>233</b>
<b>9.6. FORTALEZAS Y LIMITACIONES .....</b>	<b>237</b>
<b>9.7. FUTUROS ESTUDIOS .....</b>	<b>240</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>241</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>245</b>
<b>11.1 ANEXO 1. METABOLITOS NO OXIDATIVOS DEL ALCOHOL .....</b>	<b>245</b>
11.1.1 Excreción urinaria de etilglucurónido. ....	247
11.1.2 Concentraciones de ésteres etílicos de ácidos grasos en plasma. ....	250
11.1.2.1 Concentraciones máximas ( $C_{max}$ ).....	250
11.1.2.2 Área bajo la curva (AUC) .....	251
11.1.2.3 Curso temporal .....	254
11.1.3 Correlación entre alcohol y metabolitos no oxidativos .....	256

11.1.4 Resumen metabolitos no oxidativos del alcohol .....	259
<b>11.2 ANEXO 2: ESTUDIO PRECURSORES EN RATAS .....</b>	<b>261</b>
11.2.1 Métodos .....	261
<b>12. BIBLIOGRAFÍA Y PUBLICACIONES .....</b>	<b>265</b>
<b>12.1 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>265</b>
<b>12.2 PUBLICACIONES .....</b>	<b>283</b>



## **1. RESUMEN**

### **Introducción**

Los efectos beneficiosos para la salud humana derivados del consumo de etanol a dosis moderadas podrían derivarse, en parte, a la interacción de este sobre las vías de degradación oxidativa de la dopamina, que inducirían una mayor formación del metabolito minoritario hidroxitirosol (OHTyr o DOPET). El OHTyr constituye el principal antioxidante del aceite de oliva, y su consumo en esta matriz ha demostrado reducir la oxidación de lípidos y prevenir la aparición de eventos cardiovasculares. El vino, además del etanol, contiene fenoles como el tirosol (Tyr), y mínimas cantidades de OHTyr.

### **Métodos**

Objetivos: (i) Establecer el papel del etanol en la generación de OHTyr, (ii) Evaluar la relevancia de la dosis de etanol en la generación de hidroxitirosol endógeno. (iii) Establecer la contribución de los distintos componentes del vino en las concentraciones de OHTyr en el organismo y sus efectos biológicos. Se seleccionaron voluntarios sanos varones de 18 a 55 años.

Se diseñaron dos estudios (DOPET 1 y 2) que englobaron cada uno de ellos tres ensayos clínicos piloto y uno definitivo, con asignación aleatoria de los tratamientos, cruzados y controlados con placebo. En el primer estudio se incluyeron 24 sujetos y se administraron diferentes dosis de etanol de grado farmacéutico (0, 6, 12, 18, 24, 30 y 42 g). En el segundo estudio se incluyeron un total de 40 sujetos y se administraron vino (13° o 8°), vino desalcoholizado (0°), vodka (40°) y placebo (agua). Se diseñó posteriormente un estudio en animales con sus diversos precursores (tiramina, tirosina, tirosol) para poder interpretar mejor los resultados en humanos. La variable principal fue la excreción urinaria de OHTyr. Otras variables fueron el tirosol y metabolitos de la dopamina en orina, las

## *Resumen*

concentraciones de etanol, perfil lipídico, glucosa, biomarcadores de oxidación de lípidos y biomarcadores de inflamación en sangre, así como los efectos subjetivos del etanol, el rendimiento psicomotor y las constantes vitales.

### **Resultados**

En DOPET 1 se observó que la excreción urinaria de OHTyr aumentaba con la dosis de alcohol administrada. En DOPET 2 se observó que la excreción urinaria de OHTyr era mayor tras la administración de vino que con el vino desalcoholizado, la de vino desalcoholizado superior a la del vodka (alcohol) y la del vodka superior a la del placebo (agua). Con el vino se llegó a recuperar el 420% de la dosis administrada. En el estudio en animales se observó que parte del Tyr administrado se recuperaba en forma de OHTyr.

### **Conclusiones**

La administración de etanol produce un cambio en el metabolismo de la dopamina, que conduce, de forma dosis-dependiente, a la generación endógena de OHTyr. A su vez, los diferentes componentes del vino (fenoles, etanol) producen cambios específicos en las concentraciones de OHTyr. Los efectos beneficiosos del consumo de dosis bajas de vino o alcohol podrían explicarse en parte por la producción endógena de hidroxitirosol.

## 2. LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>4-HPAA</b>	Ácido 4-hidroxifenilacético
<b>AA</b>	Acontecimiento adverso
<b>ADH</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>AINE</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>ALDH</b>	Aldehído deshidrogenasa
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AUC</b>	Area bajo la curva
<b>CAIBER</b>	Consortio de Apoyo a la Investigación Biomédica en Red
<b>CEEA</b>	Comité Ético de Investigación Animal
<b>CEIC</b>	Comité Ético de Investigación Clínica
<b>C<sub>max</sub></b>	Concentración máxima
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>COMT</b>	Catecol-O-metiltransferasa
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DOPAC</b>	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
<b>DOPAL</b>	3,4-dihidroxifenilacetaldehído
<b>DOPET</b>	3,4-dihidroxifeniletanol o hidroxitirosol
<b>DSST</b>	Test de sustitución de dígitos por símbolos
<b>DW</b>	Vino desalcoholizado (0°)
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>EE</b>	Error estándar
<b>EECC</b>	Ensayo clínico
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima
<b>E<sub>max</sub></b>	Efecto máximo
<b>EtG</b>	Etilglucurónido
<b>EtS</b>	Etilsulfato
<b>FAEE</b>	Ésteres etílicos de ácidos grasos
<b>FC</b>	Frecuencia cardíaca
<b>FIS</b>	Fondo de Investifación Sanitaria

## Abreviaturas

<b>GCMS</b>	Cromatografía de gases-espectometría de masas
<b>Glu</b>	Glucosa
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta presión
<b>HVA</b>	Ácido homovanílico
<b>HVAL</b>	Homovanil alcohol
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IMIM</b>	Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques
<b>INRA</b>	French National Institute for Agricultural Research (Instituto Nacional Francés de Investigación Agronómica)
<b>LC/MS</b>	Cromatografía líquida-espectometría de masas
<b>L-DOPA</b>	Levodopa
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>MAO</b>	Monoaminoxidasa
<b>MUFA</b>	Ácidos grasos monoinsaturados
<b>NCT</b>	<i>National Clinical Trial</i>
<b>OHTyr</b>	Hidroxitirosol o DOPET
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PCR</b>	Proteína C Reactiva
<b>PNSD</b>	Plan Nacional sobre drogas
<b>PREDIMED</b>	Prevención con dieta mediterránea
<b>TBARS</b>	Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>t<sub>max</sub></b>	Tiempo para alcanzar la concentración o efecto máximos
<b>Tyr</b>	Tirosol
<b>UBE</b>	Unidad de bebida estándar
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión vascular

## *Abreviaturas*

<b>VHB</b>	Virus de la hepatitis B
<b>VHC</b>	Virus de la hepatitis C
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>VOO</b>	Aceite de oliva virgen



### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 EL ALCOHOL

##### 3.1.1 Epidemiología

La palabra alcohol en este trabajo se refiere al alcohol etílico o etanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

Según el Plan Nacional sobre Drogas (PNSD), el alcohol es la droga legal más consumida en España. En nuestro país el consumo de alcohol ha seguido tradicionalmente el patrón mediterráneo. Es decir, un consumo moderado de alcohol principalmente en forma de vino tinto y repartido a lo largo de la comidas (Gea 2014). En el este de Europa típicamente se consumían más destilados y en el norte más cerveza.

Sin embargo, los hábitos de consumo están cambiando del tradicional patrón de consumo estable y regular, hacia el *binge drinking*, caracterizado por una concentración del consumo durante los fines de semana con preferencia por la cerveza y los combinados.

Según la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (PNSD, EDADES 2011) que se realiza en población de 15-64 años residente en hogares familiares, la edad media de inicio en el consumo de alcohol está entre los 16-17 años. El 76,6% de los encuestados admitieron haber consumido alcohol en los últimos 12 meses, el 62,3% en los últimos 30 días y el 10,2% diariamente en los últimos 30 días. Además el 32,6% reconoció haberse intoxicado (*binge drinking*) alguna vez durante esos últimos 30 días.

En la Encuesta Estatal sobre uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias (PNSD, ESTUDES 2012), que se realiza en población de 14-18 años y que incluyó en 2012/13 un total de 27.503 estudiantes de 747 centros educativos públicos y privados y 1.523 aulas, la edad media de inicio en el consumo de alcohol está entre los 13-14 años. El 81,9% de los encuestados

## Introducción

admitieron haber consumido alcohol en los últimos 12 meses, el 74% en los últimos 30 días. El porcentaje fue similar en hombres y mujeres. Además el 30,8% reconoció haberse intoxicado (*binge drinking*) alguna vez durante esos últimos 30 días. Las borracheras fueron más frecuentes a mayor edad (26% en el último año a los 14 años y 63% en el último año a los 17 años). Además el 62% admitió haber hecho "botellón" en el último año. Los lugares de consumo más frecuente fueron bares o pubs, discotecas y espacios públicos. El alcohol se obtuvo sobre todo en locales de ocio y supermercados.

La graduación alcohólica de una bebida es la proporción de alcohol para un volumen dado de la misma. Por ejemplo, un litro de vino (1000 ml) de 12 grados alcohólicos contiene un 12% de alcohol absoluto, es decir, 120 ml. Considerando los gramos de alcohol, serían 96 gramos de alcohol absoluto. La forma de poder cuantificar de forma sencilla y rápida la cantidad de alcohol que consume un individuo es mediante el uso de las unidades de bebida estándar (UBE). Cada UBE contiene unos 10 gramos de alcohol puro en España, aunque oscila entre 8 y 13 gramos de alcohol puro según el país.

En la siguiente tabla se puede observar la correspondencia en UBE de distintas consumiciones.

## Introducción

Tabla 1. UBE correspondientes a cada consumición (Álvarez 2004).

Tipo de bebida	Volumen (ml)	Graduación alcohólica (°)	Alcohol absoluto (g)	UBE
Fermentadas				
Vino	Vaso = 100	10-15	9,6	1
Cerveza	Caña = 200	4-9	8	1
Sidra	Vaso = 100	3-8	8	1
Cava	Vaso = 100	10-15	9,6	1
Destiladas				
Ginebra	Copa = 50	40-42	16	2
Ron	Copa = 50	40-42	16	2
Whisky	Copa = 50	40-45	16,6	2

Se considera consumo de riesgo de alcohol el consumo de  $\geq 4$  UBE/día en hombres y  $\geq 2$ -2,5 UBE en mujeres, así como cualquier consumo en el caso de mujeres embarazadas, menores de edad (<18 años) y personas con actividades, enfermedades y tratamientos que desaconsejen su consumo (Comisión Clínica 2007).

### **3.1.2 Mecanismo de acción, efectos farmacológicos y tóxicos**

El alcohol es una sustancia psicotrópica que, a diferencia de la mayoría de drogas y medicamentos, no tiene un lugar específico de acción. Actúa sobre varios órganos y sistemas pero principalmente sobre el sistema nervioso central. Interfiere sobre diversos sistemas de neurotransmisores alterando el delicado equilibrio entre la neurotransmisión inhibitoria y la excitadora. Se ha descrito que el alcohol favorece la acción de neurotransmisores inhibidores (GABA-receptores GABA<sub>A</sub>, glicina-receptores de glicina) o de neuromoduladores (adenosina) y que disminuye la acción de neurotransmisores excitadores (glutamato-receptores NMDA). Además el alcohol ejerce sus propiedades reforzadoras mediante su acción sobre el sistema dopaminérgico, liberando dopamina en el núcleo accumbens (Valenzuela 1997, Edkadt 1998, Boileau 2003).

Los efectos del alcohol sobre el sistema nervioso central dependen de la dosis. A dosis bajas el alcohol produce desinhibición y euforia mientras que a dosis moderadas-altas produce sedación. Los efectos subjetivos del alcohol (sensación de borrachera) dependen de la dosis, la tolerabilidad de cada individuo y del género. Las mujeres en general presentan mayor afectación tras el consumo de una misma dosis de alcohol (Mumenthaler 1999). Además el alcohol típicamente produce una alteración del rendimiento psicomotor y, en consecuencia, de la capacidad de conducir vehículos. El rendimiento psicomotor se altera levemente con alcoholemias de 0,3 a 0,5 g/l, moderadamente con alcoholemias de 0,5 a 1 g/l y gravemente a partir de este límite (Álvarez 2004).

El consumo continuado de alcohol se acompaña de complicaciones graves y es una de las causas más importantes de mortalidad. Los grandes bebedores sufren una degeneración neurológica con demencia y neuropatías periféricas. El consumo de alcohol produce a largo plazo una hepatopatía que progresa a la cirrosis y la insuficiencia hepática. Además el alcohol afecta al corazón y sistema cardiovascular y el sistema digestivo.

## *Introducción*

Realmente afecta a todos los sistemas orgánicos. La exposición a alcohol en las embarazadas puede conducir al síndrome alcohólico fetal (Flórez 2014).

El alcohol produce intoxicación, adicción (trastorno por consumo, antes llamada dependencia), tolerancia y provoca un síndrome de abstinencia muy grave. Otros trastornos mentales asociados al alcohol son: trastornos psicóticos, trastornos bipolares, trastornos depresivos, trastornos de ansiedad, trastornos del sueño, disfunciones sexuales, síndrome confusional y trastornos neurocognitivos. El trastorno por consumo de alcohol es también muy frecuente en patología dual (American Psychiatric Association 2013).

A continuación se enumeran los criterios de diagnósticos de trastorno por consumo de alcohol, según DSM-V.

### Trastorno por consumo de alcohol

Un modelo problemático de consumo de alcohol que provoca un deterioro o malestar clínicamente significativo y que se manifiesta al menos por dos de los hechos siguientes en un plazo de 12 meses:

1. Se consume alcohol con frecuencia en cantidades superiores o durante un tiempo más prolongado del previsto.
2. Existe un deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo de alcohol.
3. Se invierte mucho tiempo en las actividades necesarias para conseguir alcohol, consumirlo o recuperarse de sus efectos.
4. Ansias o un poderoso deseo o necesidad de consumir alcohol.
5. Consumo recurrente de alcohol que lleva al incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar.

## *Introducción*

6. Consumo continuado de alcohol a pesar de sufrir problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes, provocados o exacerbados por los efectos del alcohol.
7. El consumo de alcohol provoca el abandono o la reducción de importantes actividades sociales, profesionales o de ocio.
8. Consumo recurrente de alcohol en situaciones en las que provoca un riesgo físico.
9. Se continúa con el consumo de alcohol a pesar de saber que se sufre un problema físico o psicológico persistente o recurrente probablemente causado o exacerbado por el alcohol.
10. Tolerancia, definida por alguno de los siguientes hechos:
  - a. Una necesidad de consumir cantidades cada vez mayores de alcohol para conseguir la intoxicación o el efecto deseado.
  - b. Un efecto notablemente reducido tras el consumo continuado de la misma cantidad de alcohol.
11. Abstinencia, manifestada por alguno de los siguientes hechos:
  - a. Presencia del síndrome de abstinencia característico del alcohol (véanse los Criterios A y B de la abstinencia de alcohol).
  - b. Se consume alcohol (o alguna sustancia muy similar, como una benzodiacepina) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

Los criterios diagnósticos de abstinencia de alcohol, según DSM-V, se enumeran a continuación.

Abstinencia

A. Cese (o reducción) de un consumo de alcohol que ha sido muy intenso y prolongado.

B. Aparecen dos (o más) de los signos o síntomas siguientes a las pocas horas o pocos días de cesar (o reducir) el consumo de alcohol descrito en el Criterio A:

1. Hiperactividad del sistema nervioso autónomo (p. ej. Sudoración o ritmo del pulso superior a 100 lpm).
2. Incremento del temblor de las manos.
3. Insomnio.
4. Náuseas o vómitos.
5. Alucinaciones o ilusiones transitorias visuales, táctiles o auditivas.
6. Agitación psicomotora.
7. Ansiedad.
8. Convulsiones tonico-clónicas generalizadas.

C. Los signos o síntomas del Criterio B provocan un malestar clínicamente significativo o deterioro en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento.

D. Los signos o síntomas no se pueden atribuir a otra afección médica y no se explica mejor por otro trastorno mental, incluida la intoxicación o abstinencia por otra sustancia.

Dado que en esta tesis se administraron dosis únicas de etanol que produjeron, dependiendo de la dosis, una intoxicación aguda entre leve-moderada, a continuación se especifican los criterios diagnósticos de intoxicación por etanol según el DSM-V.

Intoxicación por alcohol

A. Ingesta reciente de alcohol.

B. Comportamiento problemático o cambios psicológicos clínicamente significativos (p. ej. comportamiento sexual inapropiado o agresivo, cambios de humor, juicio alterado) que aparecen durante o poco después de la ingestión de alcohol.

C. Uno (o más) de los signos o síntomas siguientes que aparecen durante o poco después del consumo de alcohol:

1. Habla pastosa.
2. Incoordinación.
3. Marcha insegura.
4. Nistagmo.
5. Alteración de la atención o de la memoria.
6. Estupor o coma.

D. Los signos o síntomas no se pueden atribuir a otra afección médica y no se pueden explicar mejor por otro trastorno mental, incluida una intoxicación con otra sustancia.

### 3.1.3 Farmacocinética

(Álvarez 2004, Pascual 2012, Maenhout 2013, Flórez 2014)

#### 3.1.3.1 Farmacocinética del alcohol

El alcohol administrado por vía oral se absorbe mayoritariamente en el intestino delgado y en menor proporción en el estómago. Es una molécula muy hidrosoluble y se distribuye por todo el agua corporal. Se metaboliza esencialmente por oxidación hepática en un 92-95%. Más del 90% del alcohol sufre metabolismo hepático (ver secciones posteriores). Entre el 2 y el 10% del etanol, dependiendo de la cantidad ingerida, se elimina sin metabolizar por la respiración, la orina y el sudor. Estas cantidades mínimas permiten determinar indirectamente la alcoholemia, especialmente en aire mediante etilómetros.

La semivida de eliminación del alcohol es variable dependiendo de la dosis. A dosis bajas es de una hora.

#### 3.1.3.2 Metabolismo oxidativo del alcohol

El alcohol se metaboliza esencialmente por oxidación hepática en un 92-95%. La mayor parte del alcohol se metaboliza en acetaldehído mediante tres enzimas: la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema oxidativo microsomal del etanol o MEOS (citocromo P-450 isoenzima 2E1) y el sistema catalasa-peroxidasa. Todos ellos transforman el alcohol en acetaldehído.

En personas no alcohólicas el 90-95% de la oxidación del alcohol se produce mediante la ADH. La dotación enzimática de ADH es limitada, de modo que existe una capacidad fija para metabolizar el alcohol (120 mg/kg/h o 8-10 g/h). Cuando se supera esta cantidad el sistema se satura y el alcohol se acumula, resultando en una cinética de orden cero o no lineal. Un 10% del etanol, o más con alcoholemias altas, es oxidado por el sistema de oxidasas mixtas microsómicas del retículo endoplásmico liso hepático (MEOS); este complejo enzimático presenta cinética de orden uno o lineal

## *Introducción*

(velocidad de eliminación dependiente de concentración) y es autoinducible, siendo responsable de la mayoría de las interacciones medicamentosas que se observan con el etanol. Globalmente, el alcohol presenta por ello una cinética tipo mixto o de Michaelis-Menten (lineal a dosis bajas y no lineal a dosis moderadas o altas).

A su vez el acetaldehído se transforma en ácido acético mediante la aldehído-deshidrogenasa (ALDH), en un 75%, enzima que presenta un polimorfismo genético con nula actividad metabólica que conduce a concentraciones mayores de acetaldehído y efectos indeseados, y mediante la aldehído-oxidasa en un 25%.

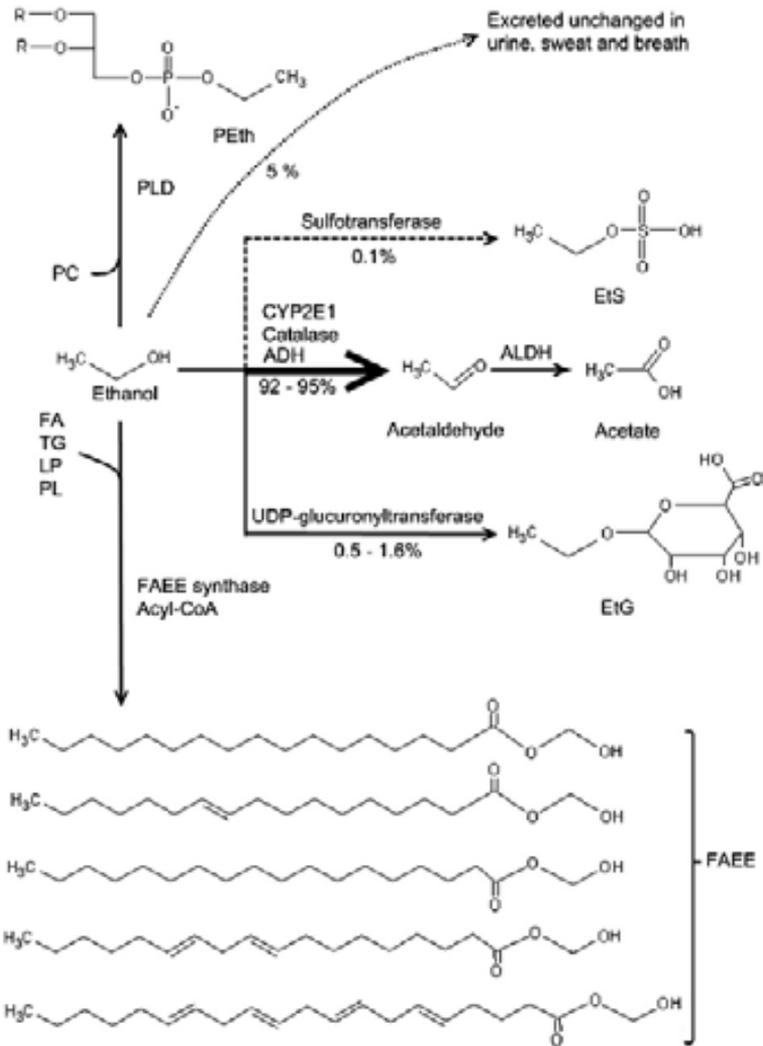
Como se ha comentado, el alcohol se elimina rápidamente del cuerpo (0,1-0,25 g/l/h) y su detección en sangre, orina o aire espirado no es útil para identificar a los pacientes abstinentes ya que, incluso tras la ingesta de altas dosis, en pocas horas resulta indetectable.

### *3.1.2.3 Metabolismo no oxidativo del alcohol*

Una pequeña parte del alcohol puede ser eliminado inalterado por vías accesorias (~5%) como son el riñón (orina), la piel (sudor) y el pulmón (respiración), o bien seguir un metabolismo no oxidativo (<2%). Los metabolitos no oxidativos del etanol, entre otros, son el etilglucurónido (EtG), el etilsulfato (EtS) y los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). En común estos metabolitos tienen una semivida de eliminación más larga que la del etanol. Pueden detectarse a lo largo de horas-días, según la cantidad de alcohol ingerida y el metabolito concreto. Los FAEE en sangre se detectan hasta 24 horas después del consumo mientras que el EtG/EtS en orina hasta 5 días (Wurst 2003).

## Introducción

Figura 1. Metabolismo oxidativo y no oxidativo del alcohol (Maenhout 2013).



*3.1.2.4 Influencia del género, el tabaco y los medicamentos en el metabolismo del alcohol*

Las mujeres absorben, metabolizan y eliminan el alcohol de forma distinta a los hombres. Tienen concentraciones más altas al consumir la misma cantidad de alcohol, incluso cuando las dosis se ajustan al peso (Mumenthaler 1999). Este hecho se puede explicar en parte por las diferencias en agua corporal entre ambos sexos, que es menor en las mujeres (siendo mayor el porcentaje de grasa), de modo que en ellas disminuye el volumen de distribución del alcohol. Otro factor a considerar es que las mujeres podrían tener menor actividad de la enzima ADH en el estómago que los hombres, y así un mayor porcentaje del alcohol ingerido alcanzaría la sangre (mayor biodisponibilidad del alcohol en las mujeres).

Según los resultados de estudios previos la fase del ciclo menstrual (folicular o luteal) probablemente no influencia en la farmacocinética del alcohol (Dettling 2010, Mumenthaler 1999). A su vez, aunque inicialmente se sugirió un efecto de los anticonceptivos orales en el metabolismo del alcohol (Jones 1984), estudios más recientes no han logrado replicar esos datos (Mumenthaler 1999, Sarkola 2002, King 2005).

Al fumar disminuye la concentración máxima de alcohol y se retrasa su absorción, debido a la influencia del tabaco en el vaciado gástrico (Johnson 1991). Un estudio demostró diferencias en la tasa de eliminación del alcohol entre sujetos fumadores de más de 25 cigarrillos al día y no fumadores (Kopun 1977). No parece que dosis inferiores modifiquen farmacocinética del alcohol.

El alcohol puede interaccionar con algunos medicamentos especialmente los sedantes del sistema nervioso central o aumentar-disminuir su metabolismo por inducción–inhibición metabólica (Flórez 2014).

### **3.1.4 Efectos beneficiosos del consumo leve-moderado de alcohol para la salud**

#### *3.1.4.1 Enfermedad cardiovascular y mortalidad*

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en todo el mundo y en la mayoría de los casos es secundaria a la arteriosclerosis, un proceso degenerativo de las arterias producido por el estrés oxidativo y un estado crónico de inflamación. Los factores de riesgo para esta enfermedad son el tabaco, la diabetes, la hipertensión arterial, el aumento del colesterol en sangre, la obesidad, los antecedentes familiares y la vida sedentaria. El consumo moderado de alcohol está inversamente asociado a estos factores de riesgo y además, se ha observado que reduce la aparición de eventos cardiovasculares (Arredondo 2014).

Según los resultados de los estudios epidemiológicos un consumo de leve a moderado de alcohol (una bebida al día para las mujeres y hasta dos en los hombres) reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular (insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular), de demencia, de depresión y de diabetes. A su vez disminuye la mortalidad por todas las causas y por causa cardiovascular (Di Castelnuovo 2006, Ronskley 2011, Vasanthi 2012, Gea 2013, O'Keefe 2014).

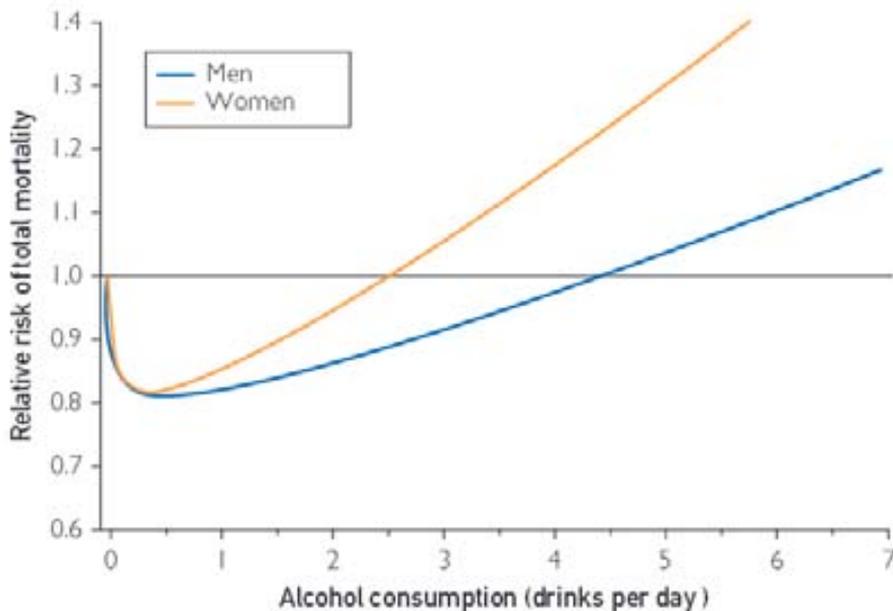
En el metaanálisis de Di Castelnuovo (Figura 2) se describió que el consumo de leve a moderado de alcohol se asocia a una disminución de la mortalidad, obteniéndose la máxima protección con una bebida en las mujeres (reducción de la mortalidad de un 18%) y de una a dos bebidas diarias en los hombres (reducción de un 17%). Como se puede observar en la figura 2 los beneficios para la salud y los resultados adversos derivados del consumo de alcohol siguen una curva dosis-efecto en forma de J. Esta curva, a su vez, puede ser modificada por los patrones de consumo (Di Castelnuovo 2006, Gea 2014).

## Introducción

La *American Heart Association* recomienda limitar el alcohol al consumo de una bebida en las mujeres y dos bebidas en los hombres, consumidas preferentemente durante las comidas (Liechtenstein 2006).

Ingestas superiores a 2,5 bebidas diarias (UBE) en las mujeres o 4 bebidas diarias en los hombres se han asociado con tasas de mortalidad más altas de forma dosis-dependiente (Di Castelnuovo 2006). Como se ha comentado anteriormente, sobrepasar estos límites se considera un consumo de riesgo.

Figura 2. Consumo de alcohol y riesgo relativo de muerte.



En prevención secundaria (sujetos que ya han padecido un evento cardiovascular) otro metaanálisis reflejó que dosis entre 5 y 25 g/día de alcohol reducen la mortalidad cardiovascular y por todas las causas, con máxima protección entre los 5 y 10 g (Costanzo 2010).

En caso del alcohol, como con la mayoría de sustancias, la dosis es la que hace la diferencia entre el efecto protector y el tóxico. De hecho, la

## *Introducción*

Organización Mundial de la Salud (OMS) responsabiliza al alcohol de un 5.9% de todas las muertes. Y un consumo excesivo de alcohol se ha relacionado la aparición de cirrosis, convulsiones, accidentes, violencia, cáncer de colon y recto, mama, laringe e hígado. Como se ha comentado anteriormente además el alcohol es una sustancia capaz de generar conductas adictivas y dependencia (Informe sobre alcohol PNSD 2007, Pascual 2012, Informe OMS 2014).

### *3.1.4.2 Mecanismos cardioprotectores del alcohol*

Aunque se han propuesto varios mecanismos para explicar los beneficios para la salud derivados del consumo leve-moderado de alcohol, en general son todavía poco conocidos.

La protección a nivel cardiovascular se podría explicar por una mejoría de la sensibilidad a la insulina y disminución de la insulina en suero, así como por un estado procoagulante disminuido (disminución de varios factores de coagulación) y una capacidad fibrinolítica mayor (disminución del inhibidor del activador del plasminógeno 1, PAI-1) debidos al consumo de alcohol.

A su vez con el consumo leve-moderado de alcohol también se ha observado una reducción de la inflamación y un aumento del colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) de forma dosis-dependiente (Standridge 2004, Booyse 2007, Mukamal 2012, Arredondo 2014). Este aumento de las HDL ha sido considerado clásicamente el mecanismo más importante por el cual el alcohol es cardioprotector.

En un estudio epidemiológico en el que se estudió la relación entre la dieta y la aparición de eventos cardiovasculares se observó que los franceses presentaban menos muertes por enfermedad cardiovascular en comparación con otros países a pesar de seguir una dieta rica en grasas saturadas (Renaud 1992). A este fenómeno se le bautizó como la paradoja francesa y se atribuyó al consumo de vino de esta población. A partir de ese

## *Introducción*

momento aumentó el interés por el componente no alcohólico del vino como posible responsable de sus efectos protectores a nivel cardiovascular.

Hoy en día todavía existe una gran controversia en si atribuir los efectos cardioprotectores directamente al alcohol, o bien al tipo de bebida alcohólica consumida, principalmente el vino, en combinación con otros factores relacionados con el estilo de vida, el ejercicio, la dieta o el hábito tabáquico (Hansen 2005, Schröder 2009).

### **3.2 LOS FENOLES**

Los principales componentes de la dieta Mediterránea son el aceite de oliva (como fuente principal de grasas), la fruta, las verduras, el vino (consumo moderado) y el pescado. En la dieta existen macroconstituyentes (proteínas, hidratos de carbono, lípidos) y microconstituyentes. Los microconstituyentes se dividen a su vez en micronutrientes como los carotenoides, folatos, ácido ascórbico, tocoferoles, etc, y los no nutrientes, como son los compuestos fenólicos.

En estudios de intervención se ha demostrado que la dieta Mediterránea tiene efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades cardiovasculares o el cáncer (Trichopoulou 2003, Estruch 2006, Fitó 2007b, Estruch 2013). Recientemente, en un ensayo clínico multicéntrico realizado en la Unión Europea se pudo demostrar que los efectos beneficiosos para la salud del aceite de oliva (uno de los principales ingredientes de la dieta) eran atribuibles no tan solo a su composición en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, como el ácido oleico) y vitaminas (carotenoides, vitamina E) sino también a su contenido en fenoles (Covas 2006a).

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo fenol en sus estructuras moleculares, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional. Los polifenoles se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Son producidos por las plantas y microorganismos, y pueden clasificarse a grandes rasgos en flavonoides y no flavonoides (Whaterhouse 2002).

Los compuestos fenólicos mayoritarios del aceite de oliva son no flavonoides, derivados de los secoiridoideos. La oleuropeína es el éster del ácido elenólico con el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) y el ligstrósido es el éster del ácido elenólico con el tirosol (4-hidroxifeniletanol). El componente glucídico de estos glucósidos se pierde por acción de una glucosidasa durante la maduración de las aceitunas, así se generan los

## Introducción

correspondientes aglicones que son menos polares que los glicósidos de partida. Los aglicones y sus derivados, entre ellos tirosol e hidroxitirosol (fenoles simples), son los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen (VOO). El compuesto fenólico prototípico del aceite de oliva es el hidroxitirosol (Gimeno 2002). La concentración de fenoles en un aceite virgen varía entre 50-800 mg/kg debido a que depende de muchos factores: variedad de aceituna, condiciones ambientales, métodos seguidos para obtener el aceite o condiciones de almacenamiento de éste.

Los compuestos fenólicos del vino incluyen flavonoides y no flavonoides, con un contenido total de 1,2 a 3 g/l. Entre ellos se encuentran los ácidos fenólicos (cumarínico, cinámico, cafeico, gentísico, ferúlico y vanílico) y los flavonoides (catequinas, quercitina y resveratrol). El compuesto fenólico prototípico en el caso del vino es el resveratrol (de la Torre 2007). Recientemente se ha descrito que el vino contiene también hidroxitirosol, aunque en mucha menor cantidad que el aceite (Piñeiro 2011). El resveratrol es un polifenol mientras que el hidroxitirosol y el tirosol, como se ha comentado previamente, son fenoles. En esta memoria se usará la palabra fenol para referirnos a los compuestos fenólicos, sin hacer distinción entre los fenoles y los polifenoles.

En los últimos años se han realizado múltiples estudios para evaluar la actividad biológica *in vitro* y en modelos animales de los compuestos fenólicos. En este sentido tanto el hidroxitirosol como el resveratrol han demostrado tener efectos antiagregantes, antiinflamatorios, antioxidantes, antiproliferativos, pro-apoptóticos y antimicrobianos (Tomé-Carneiro 2013b, Granados-Principal 2010, Hashimoto 2004, Chiva-Blanc 2013b).

También se han realizado estudios en humanos administrando los fenoles en forma de aceite, vino o extractos de los mismos. Estos estudios han demostrado que los fenoles se absorben de forma dosis dependiente (Weinbrener 2004, Visioli 2000) en humanos y que pueden ser detectados

## *Introducción*

en plasma u orina. Sin embargo son poco biodisponibles. Aparecen mayoritariamente conjugados (por un importante metabolismo intestinal y hepático) y la forma libre, la que se supone que conserva la actividad biológica, es casi inapreciable (de la Torre 2007).

Tras la administración de aceite 25-50 ml la semivida de eliminación del hidroxitirosol oscila entre 2,5-3,5 h y el pico plasmático aparece hacia la hora en plasma y de 0 a 2 h en orina. Los valores vuelven a la basal a las 12-24 h (Miró-Casas 2001 a, b, Miró Casas 2003, Covas 2006b, Fitó 2007a). En un estudio que se hizo con 250 ml de vino el pico plasmático para este fenol apareció un poco más tarde, a las 2,2 h (de la Torre 2006).

La actividad antioxidante del hidroxitirosol, relevante en la prevención de la patología cardiovascular, ha sido confirmada indirectamente en humanos tras la administración de aceite de oliva con distintas concentraciones de compuestos fenólicos (Covas 2006 a). Se ha observado una relación dosis-dependiente entre los efectos antioxidantes y la cantidad de compuestos fenólicos, principalmente hidroxitirosol, contenidos en el aceite.

Por este motivo la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó un reclamo acerca de los beneficios de la la ingestión diaria de 5 mg o más de OHTyr y derivados de este en la protección de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (EFSA 2011)

Ello abre las puertas a su utilización como nutracéutico dado que es uno de los antioxidantes más potentes que se conoce.

Además, también se ha observado que el VOO rico en fenoles, sólo o en combinación con un patrón de dieta mediterránea previene la aparición de eventos cardiovasculares (Estruch 2013, Buckland 2012).

En el caso del resveratrol cada vez hay más evidencia de su efecto cardioprotector a través de una mejoría de biomarcadores de inflamación, del perfil aterogénico (lípidos, LDL oxidada), del metabolismo de la glucosa

## *Introducción*

y de la función endotelial. En estudios de intervención de hasta 12 meses de duración se han observado numerosos efectos en estos biomarcadores. Sin embargo, el resveratrol hasta la fecha no ha logrado una reducción de los eventos cardiovasculares (Tomé-Carneiro 2013 a y b).

En resumen, a pesar de conocer bien la actividad intrínseca de los fenoles sus concentraciones libres tras ingerirlos con la dieta son muy bajas y, por tanto, resulta difícil atribuirles los efectos beneficiosos observados en los estudios de intervención. Estos estudios con aceite o vino aportan una evidencia indirecta, ya que los fenoles no han sido administrados de forma aislada.

De todos modos, al menos para el aceite, se ha observado que los efectos favorables sobre el perfil lipídico y su oxidación (aumento de las HDL, reducción de la LDL oxidada) son dosis dependientes (están relacionados con el contenido fenólico del aceite) (Covas 2006a). Este hecho sugiere que, en mayor o menor medida, los fenoles son responsables de los efectos cardioprotectores observados.

### 3.3 EL VINO

El vino es una bebida obtenida de la uva mediante la fermentación alcohólica de su mosto o zumo. La fermentación se produce por la acción metabólica de levaduras que transforman los azúcares de la uva en alcohol etílico y dióxido de carbono. Contiene de un 8 a un 15% de alcohol por peso. Además del alcohol contiene agua, carbohidratos, glicerol, aldehído, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados y minerales.

El ingrediente más variable en su composición es su contenido en compuestos fenólicos. Estos se encuentran sobretodo en las semillas y la piel de la uva de modo que tanto la variedad como la forma en que se produce el vino influyen en su contenido final. En el vino tinto, como las semillas y la piel permanecen más tiempo en contacto con el mosto, el contenido generalmente es mayor que en el vino blanco (German 2000).

Los fenoles del vino han demostrado *in vitro* y en estudios en animales tener efectos antioxidantes, antiinflamatorios, hipotensores y antiagregantes plaquetarios (Arredondo 2014, Chiva-Blanc 2013b).

Los efectos antioxidantes también se han estudiado *in vivo* en diversos estudios en humanos. Sin embargo los resultados de los estudios son contradictorios, y mientras que en unos se han observado efectos antioxidantes (Tsang 2005, Micallef 2007) en otros no ha habido claros efectos (Covas 2010). En una revisión sobre el tema se concluyó que no hay una evidencia clara de que dosis mantenidas de vino produzcan un efecto antioxidante protector en individuos sanos que vaya más allá de contrarrestar los efectos prooxidantes del etanol. En situaciones de estrés oxidativo, en cambio, los resultados de los estudios han sido más prometedores. De hecho, se ha observado que el estrés postprandial de una comida se puede contrarrestar por la ingesta de vino (Covas 2010).

Para otros biomarcadores cardiovasculares los fenoles y el alcohol podrían actuar de forma aditiva de modo que la suma de los efectos de los fenoles y

## *Introducción*

el alcohol sea superior a la del alcohol solo (Chiva-Blanch 2013b). En base a la evidencia disponible, teniendo en cuenta los efectos que se han observado en diferentes estudios para cada uno de los componentes, es plausible que el vino, especialmente el que tenga mayor contenido fenólico, sea más cardioprotector que las bebidas alcohólicas sin fenoles.

A continuación se describen brevemente los resultados de un estudio en el que se comparó la administración de bebidas con y sin fenoles sobre distintos biomarcadores.

Se trataba de un estudio de diseño cruzado, en sujetos con riesgo de padecer eventos cardiovasculares (n=65), en el que se compararon los efectos de la administración de vino, vino desalcoholizado y ginebra (30 g de alcohol, durante 4 semanas) sobre el perfil lipídico, glucosa, presión arterial y diversos biomarcadores de inflamación.

Los resultados fueron los siguientes:

-Los efectos sobre biomarcadores de inflamación fueron más pronunciados en las bebidas con fenoles que con el alcohol solo (Chiva-Blanch 2012a).

-La presión arterial se redujo en la bebida que contenía solamente los polifenoles (vino desalcoholizado) en comparación con las otras dos (Chiva-Blanch 2012b).

-Las HDL y las apolipoproteínas AI y AII aumentaron tanto con el vino como con la ginebra, pero los cambios observados en el metabolismo de la glucosa fueron más favorables con los dos vinos (Chiva-Blanch 2013a).

Estos resultados apoyan que la ingesta de vino pueda llegar a ser más cardioprotectora que la de las bebidas alcohólicas sin fenoles.

### **3.4. ALCOHOL Y GENERACIÓN ENDÓGENA DE HIDROXITIRO SOL**

En un ensayo clínico de biodisponibilidad y efectos postprandiales del resveratrol, incidentalmente se detectó la presencia de hidroxitirosol en el vino y el mosto. La dosis era unas cinco veces inferior a las del aceite (0,35 mg vs 1,7 mg) pero suficientemente importante como para hacer una cinética adicional del hidroxitirosol (de la Torre 2006).

Se trataba de un ensayo clínico cruzado en el que se administraron vino, mosto y un extracto de uva enriquecido con resveratrol a voluntarios sanos durante 4 días. Las concentraciones en plasma y orina de hidroxitirosol se compararon con las de un estudio en el que se administraron 25 ml de VOO.

La excreción urinaria de OHTyr de 0 a 24 h fue superior con los 250 ml de vino que con los 25 ml de aceite ( $4,3 \pm 1,0$  vs,  $3,1 \pm 0,4$   $\mu\text{g}$ ,  $p=0,013$ ), a pesar de que la dosis con el vino era más baja. Lo mismo sucedió para un metabolito del hidroxitirosol, el homovanil alcohol (HVAL) que presentó una excreción de  $1,2 \pm 0,3$   $\mu\text{g}$  con el vino y  $0,8 \pm 0,1$   $\mu\text{g}$  con el aceite.

La recuperación de hidroxitirosol con el vino, teniendo en cuenta la cantidad administrada, fue de un 200%. Además se observó que el tiempo para alcanzar la concentración máxima ( $t_{\text{max}}$ ) de OHTyr era superior con el vino que con el aceite (2,2 vs 1,3 h). Ambos hechos hicieron sospechar otra fuente de hidroxitirosol en el vino.

Resulta que el hidroxitirosol, además de ser un antioxidante natural, es también un metabolito de la dopamina (también llamado 3,4-dihidroxifeniletanol o DOPET).

Se contrastaron dos hipótesis en relación con el papel que podía tener el metabolismo de la dopamina en los resultados obtenidos. La primera fue que la tiramina contenida en el vino se pudiera transformar en dopamina, a través del CYP2D6, y ésta en hidroxitirosol (Hiroi 1998).

## *Introducción*

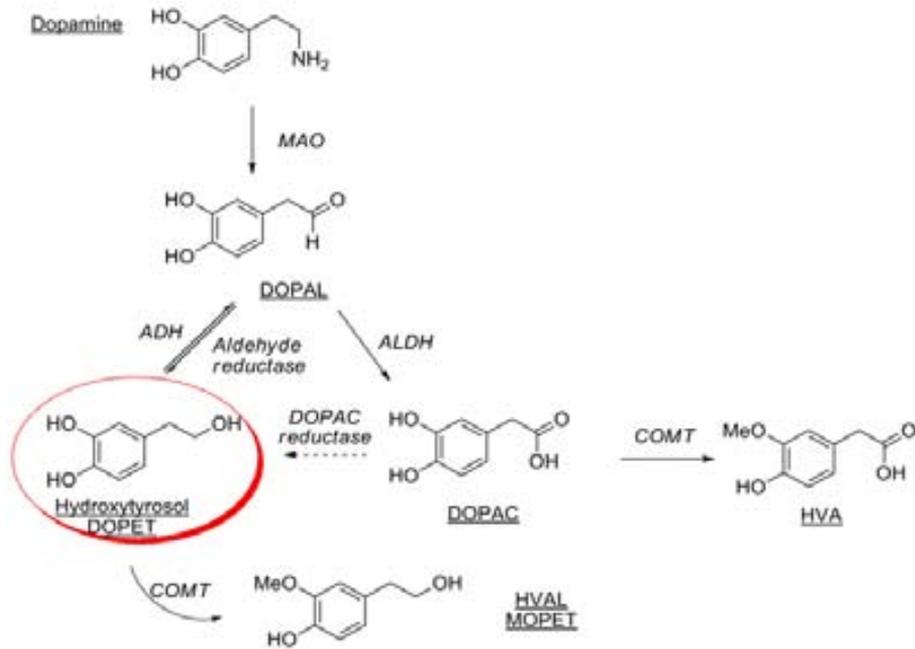
La excreción urinaria de tiramina de forma basal con el vino fue similar que con el aceite mientras que tras la administración fue superior con el vino que con el aceite (basales:  $0,8 \pm 1,0$  vs.  $0,6 \pm 0,9$   $\mu\text{g}$  y postadministración:  $2,5 \pm 0,8$  vs.  $1,7 \pm 0,7$   $\mu\text{g}$ , para el vino y el aceite respectivamente;  $p=0,03$ ). Teniendo en cuenta la cantidad de tiramina excretada y la administrada (2,2  $\mu\text{moles}$ ) ésta no podía explicar las diferencias halladas en el hidroxitirosol del vino y el aceite.

La segunda hipótesis que se contrastó fue que el alcohol desviara el metabolismo oxidativo de la dopamina para formar hidroxitirosol (ver figura 3 con un esquema del metabolismo de la dopamina).

La dopamina mediante la monoaminoxidasa (MAO) da lugar a un aldehído, el 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) que posteriormente se oxida mediante la acción de la alcohol deshidrogenasa mitocondrial (ALDH) al ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), que es el principal metabolito de la dopamina en las matrices biológicas. Una vía metabólica minoritaria es la reducción de DOPAC mediante aldosa/aldehído reductasas a DOPET (Hashimoto 2004).

## Introducción

Figura 3. Esquema del metabolismo de la dopamina.



En estudios antiguos realizados en animales ya se había observado que la presencia de etanol interfería en el metabolismo de la dopamina, de modo que en lugar de producirse DOPAC se producía preferentemente DOPET (Davis 1967, 1970).

Además en un estudio en hepatocitos humanos se observó un cambio en la razón DOPAC/OHTyr (razón DOPAC/DOPET de 10 a 0,25 con la presencia de etanol (Tank 1979). Este cambio en el metabolismo de la dopamina podría explicarse por una mayor afinidad del DOPAL por los sistemas enzimáticos que lo reducen a DOPET en presencia de etanol.

Se determinaron pues las concentraciones urinarias de ácido homovanílico (HVA), el principal biomarcador de la actividad dopaminérgica periférica, en el estudio en humanos (de la Torre 2006). Se observó una mayor excreción de HVA con el vino que con el aceite (30,7 9,4 vs. 19,2 7,2 g, para el vino y el aceite respectivamente;  $p=0,02$ ) mientras que los valores basales

## Introducción

eran similares. Además, a pesar de que con el mosto (1 litro) se administraron 1,65 mg de hidroxitirosol y con el vino (250 ml) 0,35 mg, las concentraciones urinarias de OHTyr fueron el doble con el vino que con el mosto, que no tenía alcohol.

Con este estudio se observó por primera vez que el vino tinto era una fuente de hidroxitirosol y que la recuperación de OHTyr con el vino era superior a la esperada, siendo la explicación más plausible un cambio en el metabolismo de la dopamina por el alcohol.

Posteriormente, con los datos de otro estudio se pudo observar de nuevo una relación entre la excreción OHTyr y el consumo de vino. En una submuestra del estudio Prevención con Dieta mediterránea (PREDIMED), se contrastaron los datos de hábitos dietéticos basales con distintos biomarcadores. Se trataba de una muestra de 1045 sujetos con riesgo de enfermedad cardiovascular. En esta muestra se observó una correlación entre las concentraciones urinarias de OHTyr y el consumo de vino (ml por día) y de alcohol (g por día). La misma correlación se observó también para otro fenol de la dieta, el tirosol (Tyr) (Schröder 2009).

A continuación se describe cual era el consumo de aceite, vino y alcohol de los individuos participantes.

Tabla 2. Características basales muestra estudio PREDIMED

	N	Edad (años)	Hidroxitirosol (ng/ml)	Vino (g/día)	Alcohol (g/día)	Aceite oliva (g/día)
Hombres	517	65,3	249,5	145,7	19,5	42,8
Mujeres	492	67,8	165,7	22,7	3	40,3

Puede observarse que los sujetos consumían las mismas cantidades de aceite de oliva por día independientemente del género pero sin embargo

## Introducción

diferían en las concentraciones urinarias de hidroxitirosol. También se observaron grandes diferencias entre géneros en cuanto a consumo de vino y de alcohol (considerando todo tipo de bebida alcohólica).

Los sujetos en función de su consumo de alcohol fueron distribuidos en cuatro categorías (ver tabla 3).

Tabla 3. Clasificación en función consumo de alcohol

Grupo	Consumo (g/día)	Hombres	Mujeres	Estadísticos Regresión logística
Alcohol 0	0	96	345	
Alcohol 1	0,1-10	200	149	1,40 (0,74-2,64)
Alcohol 2	10,1-20	22	5	1,88 (0,94-3,75)
Alcohol 3	>20 g/d	174	18	2,91 (1,57-5,40)

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad y consumo de aceite que demostró que había una asociación entre las concentraciones de hidroxitirosol en orina y el consumo de vino (ml/d),  $p < 0,008$  y de alcohol (g/d),  $p < 0,001$ , y que la asociación era dosis dependiente.

Teniendo en cuenta que la correlación no solo se observó con el vino sino también con el alcohol, los datos reforzaron la plausibilidad de que el etanol pudiera interferir en el metabolismo oxidativo de la dopamina resultando en la formación de OHTyr.

En esta introducción se han puesto de manifiesto diversos puntos clave para entender el propósito de los estudios incluidos en esta memoria.

El primero es que la dosis de alcohol es la que distingue el remedio del veneno.

El segundo es que los mecanismos por los cuales el alcohol y los fenoles son cardioprotectores no están del todo claros.

## *Introducción*

El tercero es que todavía hoy en día es discutible si estos efectos se deben al alcohol por sí mismo o al tipo de bebida alcohólica consumida (vino), en relación con su contenido en fenoles.

El cuarto es que el vino contiene hidroxitirosol, un antioxidante muy potente, en pequeñas cantidades, y que la ingesta de vino produce una excreción urinaria de este fenol muy superior a la esperable.

Finalmente se ha descrito que el alcohol podría interferir en el metabolismo de la dopamina para generar hidroxitirosol, acorde con los datos de los estudios en animales y *ex vivo*, así como los datos preliminares obtenidos en humanos.

Si se confirman los datos previos es posible que parte de los efectos beneficiosos sobre la salud atribuidos al alcohol, y al vino, se deban a su capacidad de generar hidroxitirosol.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las hipótesis de de esta memoria son las siguientes:

1. El etanol produce un incremento de la concentración de hidroxitirosol al modificar el metabolismo de la dopamina.
2. El aumento en las concentraciones de hidroxitirosol está relacionado con la dosis de etanol administrada.
3. Los diferentes componentes del vino (fenoles, etanol) producen cambios específicos en las concentraciones de hidroxitirosol, que resultan del aporte directo de la sustancia y de la modificación del metabolismo de la dopamina.



## **5. OBJETIVOS**

Los objetivos de esta memoria fueron los siguientes:

1. Establecer el papel del etanol en la generación de hidroxitirosol.
2. Evaluar la relevancia de la dosis de etanol en la generación de hidroxitirosol endógeno.
3. Establecer la contribución de los distintos componentes del vino en las concentraciones de hidroxitirosol en el organismo y sus efectos biológicos.



## **6. ESTUDIOS, FINANCIACIÓN, ÉTICA**

Para poder cumplir con los objetivos de esta memoria se diseñaron dos ensayos clínicos (EECC) en voluntarios sanos. El primero de los EECC, al que denominaremos a partir de ahora DOPET 1, pretendía estudiar el papel del etanol y la relevancia de la dosis de etanol en la generación de hidroxitirosol endógeno, mientras que el segundo, al que denominaremos a partir de ahora DOPET 2, tenía por objetivo establecer la contribución de los distintos componentes del vino en las concentraciones de hidroxitirosol en el organismo y sus efectos biológicos.

Los EECC que forman parte de esta tesis doctoral se realizaron gracias a financiación pública dentro del marco de un proyecto financiado por el Instituto Carlos III-Fondo de Investigación Sanitaria (ISCIII-FIS) titulado con el mismo nombre que la presente memoria (expediente número PI081913). La fase experimental del primer estudio se realizó en 2009 y la del segundo en 2011. Las muestras obtenidas terminaron de analizarse en 2013.

En este proyecto FIS se había previsto realizar dos estudios más que finalmente no se llevaron a cabo por falta de presupuesto. Uno de los EECC adicionales tenía por objetivo demostrar de una forma más directa la interferencia del etanol en el metabolismo de la dopamina, mediante la administración de selegilina (un inhibidor de la enzima que metaboliza la dopamina, la monoaminoxidasa). El otro estudio pretendía comparar las concentraciones de hidroxitirosol y sus efectos tras administrarlo en forma de preparado nutracéutico puro, mediante la ingesta de alcohol o por la combinación de ambos.

En su lugar se realizó un ensayo clínico en animales para poder interpretar mejor los resultados de los estudios en humanos. Este último estudio en ratas no forma parte de esta tesis doctoral. Se explican brevemente sus métodos (ver anexo 2) y resultados (sección de resultados de DOPET 2) ya que enriquecen de forma notable la discusión.

Los resultados de los análisis de algunas variables secundarias del estudio DOPET 1, concretamente los metabolitos no oxidativos del alcohol, se muestran en el anexo 1. Se ha procedido de este modo, porque no son útiles para contrastar las hipótesis de la memoria. Sin embargo sí pueden constituir los datos preliminares de futuros proyectos con alcohol.

La doctoranda, durante el transcurso de esta tesis doctoral, ha tenido dos contratos con financiación pública. El primero, de metodóloga para el Consorcio de Apoyo a la Investigación Biomédica en Red o CAIBER (CAI08/01/0024) y el segundo, un contrato de formación en investigación para Río Hortega para profesionales que hayan finalizado el periodo de formación sanitaria especializada (ISCI III Río Hortega CM12/00085).

Ambos EECC en humanos fueron aprobados por el comité ético de investigación clínica de la institución (en DOPET 1 CEIC-IMAS, en DOPET 2 CEIC Parc de Salut Mar). En el primer estudio se hizo una modificación relevante del protocolo (aumento de dosis y tamaño muestral), como se comentará posteriormente, que también fue evaluada por el comité. No se solicitó la aprobación por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) ya que no involucraban la administración de medicamentos. Los estudios se hicieron de acuerdo a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y respetaron en todo momento los principios éticos para investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki y la Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal.

Todos los voluntarios fueron debidamente informados de los estudios (oralmente y mediante la hoja de información de los estudios) y firmaron el documento de consentimiento informado antes de iniciar cualquier procedimiento relacionado con los mismos.

### *Estudios, financiación, ética*

Los dos estudios también fueron registrados en un registro público, concretamente el registro norteamericano Clinicaltrials.gov ([www.Clinicaltrials.gov](http://www.Clinicaltrials.gov)):

*-Relevance of the Ethanol Dose in the Generation of Endogenous Hydroxytyrosol* (NCT01788670).

*-Contribution of Wine Components on Hydroxytyrosol Body Concentrations and Biological Effects* (NCT01790672).

Los procedimientos en animales se hicieron de acuerdo a la normativa aplicable (Directiva 86/609/EEC), que regula la investigación en animales y fueron aprobados por el comité ético local de investigación en animales (CEEA-PRBB; ref. PRM-13-1525).



## **7. MÉTODOS**

### **7.1 MÉTODOS ESTUDIO DOPET 1**

#### **7.1.1 Diseño**

Ensayo clínico de fase I con asignación aleatoria de las secuencias de tratamiento, cruzado y controlado con placebo (agua), doble ciego, en el que se administraron diferentes dosis de alcohol-etanol a voluntarios sanos.

El estudio constaba inicialmente de dos ensayos clínicos piloto (n=5) y un estudio definitivo (n=12). Cada sujeto recibió dos dosis distintas de alcohol y placebo. En los estudios piloto estaban predeterminadas las dosis 6 g, 12 g, 18 g y 30 g.

Se trataba de encontrar qué dosis producía una respuesta suficientemente robusta en cuanto a excreción de hidroxitirosol (variable principal) para utilizarla en el estudio definitivo y en el futuro DOPET 2.

Una vez realizada la fase experimental de los dos pilotos se decidió añadir un tercer piloto para estudiar lo que ocurría a dosis mayores e intermedias de alcohol (24 y 42 g). Se añadió un sujeto adicional por piloto dada la elevada variabilidad encontrada en los datos preliminares de la variable principal.

Las dosis del estudio definitivo se seleccionaron una vez completados los estudios piloto. Se escogieron 18 y 30 g porque eran dosis que habían demostrado producir una excreción de hidroxitirosol suficiente y a su vez eran las correspondientes, en cuanto a cantidad de alcohol, a la ingesta de una o dos copas de vino. Además ambas dosis habían sido bien toleradas en los estudios piloto mientras que algunos sujetos tuvieron dificultades para ingerir la dosis de 42 g al estar muy concentrada y tener mal sabor.

## *Métodos*

Tanto los pilotos como el estudio definitivo tuvieron una metodología similar, la única diferencia entre ellos fue la dosis de alcohol.

### Piloto 1 (n=6)

- Etanol 25° (150 ml, 30 g alcohol)
- Etanol 15° (150 ml, 18 g alcohol)
- Placebo etanol (150 ml agua)

### Piloto 2 (n=6)

- Etanol 10° (150 ml, 12 g alcohol)
- Etanol 5° (150 ml, 6 g alcohol)
- Placebo etanol (150 ml alcohol)

### Piloto 3 (n=6)

- Etanol 35° (150 ml, 42 g alcohol)
- Etanol 20° (150 ml, 24 g alcohol)
- Placebo etanol (150 ml agua)

### Estudio definitivo (n=12, seis del piloto 1)

- Etanol 15° (150 ml, 18 g alcohol)
- Etanol 25° (150 ml, 30 g alcohol)
- Placebo etanol (150 ml agua)

Los voluntarios fueron aleatorizados a las tres condiciones de tratamiento. Para ello en el estudio definitivo se utilizaron 4 cuadrados latinos de 3 x 3 balanceados como el que se muestra a continuación.

Tabla 4. Cuadrado latino ejemplo.

	Sesión 1	Sesión 2	Sesión 3
Sujeto 1	A	B	C
Sujeto 2	B	C	A
Sujeto 3	C	A	B

### 7.1.2 Condiciones de tratamiento

Las dosis de etanol escogidas en DOPET 1 estaban dentro del rango de dosis diarias en las que se han demostrado efectos beneficiosos para la salud humana. Se administraron dosis únicas y por vía oral de 0, 6, 12, 18, 30 y 42 g de etanol.

Las condiciones con etanol se obtuvieron mezclando alcohol de grado farmacéutico con agua Fontvella® sabor limón. El etanol se obtuvo de una preparación magistral de la Farmacia Carreras Ginjaume (viales de 10 ml, lote 1338741, fecha de caducidad 02/2011) y de la Farmacia Xalabarder (10 ml vials, lote 820058530, caducidad 05/01/2012), ambas localizadas en Barcelona. La condición placebo se preparó exclusivamente con agua Fontvella® sabor limón.

Se administraron 150 ml de todas las bebidas en recipientes opacos. Las bebidas fueron servidas frías e ingeridas en un período de 5 minutos. Se marcaron los vasos de plástico por la mitad de modo que el voluntario tomara cada mitad del vaso en dos minutos y medio. Justo antes de que terminaran los cinco minutos los sujetos hicieron el trago final.

Las ampollas de alcohol absoluto de 10 ml contenían 8 g de etanol. Se calcularon los ml necesarios para cada una de las dosis:

- 6 g = 7,5 ml etanol + 142,5 ml de agua
- 12 g = 15 ml etanol + 135 ml de agua

- 18 g = 22,5 ml etanol + 127,5 ml de agua
- 24 g = 30 ml etanol + 120 ml de agua
- 30 g = 37,5 ml etanol + 112,5 ml de agua
- 42 g = 52,5 ml etanol + 97,5 ml de agua

### **7.1.3 Sujetos**

Los participantes debían ser voluntarios sanos de entre 18 y 55 años. Ambos géneros podían ser incluidos, aunque finalmente sólo se reclutaron hombres.

En los estudios piloto y el definitivo participaron un total de 24 sujetos, 6 en cada piloto y 12 en el definitivo. Al no hacerse ningún cambio en los procedimientos de piloto al definitivo los sujetos del estudio piloto de 18 y 30 g (piloto 1) fueron aprovechados para el estudio definitivo.

#### *7.1.3.1 Cálculo del tamaño muestral*

El tamaño de la muestra se calculó basándose en la metodología de los estudios de bioequivalencia, tomando un riesgo alfa de 0,05, un poder del 80%, una variabilidad del 30% y un posible incremento de las concentraciones de hidroxitirosol de al menos un 40%, parecían suficientes 10 sujetos en el estudio definitivo. Para aumentar la potencia se decidió que participaran 12 sujetos.

### **7.1.4 Objetivos**

Los objetivos del estudio DOPET 1 se correspondían con los dos primeros objetivos de esta memoria.

1. Establecer el papel del etanol en la generación de OHTyr.
2. Evaluar la relevancia de la dosis de etanol en la generación de OHTyr endógeno.

### **7.1.5 Variables**

#### Variables principales

- Concentraciones urinarias y plasmáticas de hidroxitirosol (OHTyr).

#### Variables secundarias

- Concentraciones urinarias y plasmáticas de tirosol (Tyr).
- Concentraciones urinarias y plasmáticas de ácido homovanílico (HVA) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC).
- Concentraciones urinarias y plasmáticas de homovanil alcohol (HVAL), el metabolito del OHTyr.
- Concentraciones sanguíneas de etanol.
- Concentraciones urinarias de etilglucurónido.
- Concentraciones plasmáticas de ésteres etílicos de ácidos grasos o FAEE (oleico, linoleico, palmítico y esteárico). No planeadas inicialmente.
- Efectos subjetivos del etanol (sensación de borrachera).
- Constantes vitales (frecuencia cardíaca, presión arterial, temperatura oral).

### **7.1.6 Criterios de inclusión y exclusión**

#### Criterios de inclusión

- 1) Voluntarios de ambos sexos con edades entre 18 y 55 años.
- 2) Historial y examen físico que demuestren no presentar trastornos orgánicos o psiquiátricos.
- 3) Electrocardiograma (ECG) y analítica general en sangre y orina realizadas antes del ensayo dentro de los límites de la normalidad. Variaciones menores o puntuales de los límites de normalidad se admitían si a criterio del investigador principal, teniendo en cuenta

## *Métodos*

el estado de la ciencia, no tenían trascendencia clínica, no suponían riesgo para los sujetos y no interferían en la valoración de los tratamientos.

- 4) Índice de masa corporal (peso/talla<sup>2</sup>) de cada sujeto comprendido entre 19 y 27 kg/m<sup>2</sup>, y peso comprendido entre 50 y 110 kg.
- 5) Comprender y aceptar los procedimientos del ensayo y firmar un consentimiento informado.

### Criterios de exclusión

- 1) No cumplir los criterios de inclusión.
- 2) Sujetos con historia de abuso de fármacos u otras drogas o consumo habitual de fármacos psicoactivos.
- 3) Haber padecido alguna enfermedad orgánica o cirugía mayor durante los tres meses anteriores al ensayo.
- 4) Antecedentes de patología psiquiátrica.
- 5) Fumadores de más de 20 cigarrillos al día.
- 6) Consumo de alcohol superior a 30 g al día.
- 7) Ingesta regular de medicación en el mes que precede al estudio. Tratamiento con dosis únicas de medicación sintomática en la semana previa al estudio no fue motivo de exclusión (se suponía que se había eliminado completamente el día del estudio).
- 8) Haber donado sangre en las 8 semanas anteriores o participado en otros ensayos clínicos con fármacos en las 12 semanas anteriores.
- 9) Antecedentes de alergia o reacciones adversas a medicamentos.
- 10) Historia de trastornos gastrointestinales, hepáticos, renales o de otro tipo que pudieran hacer sospechar una alteración de la absorción, distribución, metabolismo o excreción del etanol, o que fueran sugestivos de irritación gastrointestinal por fármacos.

- 11) Sujetos que no fueran capaces de entender la naturaleza, consecuencias del ensayo y los procedimientos a seguir.
- 12) Sujetos con serología positiva a virus de la hepatitis B (VHB), C (VHC) o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

### **7.1.7 Requerimientos del estudio**

Las 72h antes, durante y hasta 24 horas después de las sesiones experimentales los sujetos debían abstenerse de consumir bebidas alcohólicas. Tampoco debían tomar ningún tipo de fármaco ni droga de abuso durante su participación en el estudio. Para comprobarlo se les realizaron controles de drogas en orina antes de iniciar cada sesión.

Como se trataba de un estudio cuyos resultados podían estar influidos por los hábitos dietéticos, los sujetos tuvieron que dejar de consumir aceite de oliva y vino (ambas fuentes de OHTyr) durante al menos 3 días previos a la administración de los tratamientos y hasta 24 horas después. Las 24h previas a cada sesión y durante las sesiones experimentales tampoco podían consumir alimentos ricos en xantinas como café, mate, té, coca-cola o chocolate.

### **7.1.8 Sesiones experimentales**

Los sujetos se reclutaron a partir de una base de datos de voluntarios sanos de la Unidad de ensayos clínicos del IMIM. Fueron contactados telefónicamente y, tras realizarse un *screening* telefónico inicial, fueron citados para la visita de selección. Esta visita se hizo en un periodo de hasta 3 semanas previas al inicio de las sesiones experimentales. En esta visita se preguntó a los voluntarios por sus antecedentes médicos, se les hizo una exploración física y varias exploraciones complementarias para comprobar si cumplían los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. Estas exploraciones consistieron en un ECG, una analítica general de

## *Métodos*

sangre y orina, un test de drogas en orina y una alcoholemia en aire espirado.

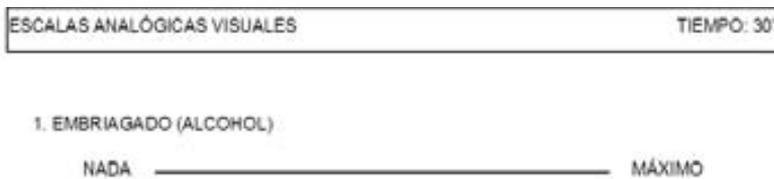
La analítica general constó de un perfil bioquímico (glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, sodio, potasio, lactato deshidrogenasas, creatina quinasa, bilirrubina total y directa, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, gamma glutamil transpeptidasa, fosfatasa alcalina, calcio, fósforo, proteínas totales, albúmina, globulinas, colesterol y triglicéridos), hemograma (hematíes, hemoglobina, hematocrito, recuento y fórmula de leucocitos), coagulación (plaquetas, tiempo de protrombina y tromboplastina), serologías (VHB, VHC y VIH), y el análisis elemental de orina de pH, glucosa, cuerpos cetónicos, bilirrubina, urobilinógeno, proteínas, hematíes/hemoglobina, leucocitos y nitritos.

Cada sujeto participó en tres sesiones experimentales, cada una de ellas separada un mínimo de 3 días. La duración total de cada sujeto en el estudio fue de unas 2 a 5 semanas. Al final del estudio los sujetos acudieron a una visita final en la que realizó de nuevo una exploración física y unas analíticas de sangre y orina completas.

Las sesiones se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Clínica del IMIM. Los sujetos debían acudir en ayunas en ayunas de 10 h para alimentos sólidos y 2 horas de ayuno para líquidos para poder iniciar las sesiones a las 08:00 de la mañana. A su llegada se les realizaron un test de drogas en orina (Instant-View® multitest:anfetaminas, cocaína, metanfetamina, morfina, tetrahidrocanabinol, fenilciclidina) y una alcoholemia en aire espirado (etilómetro portátil Dräger®) para comprobar que no habían bebido las últimas horas. Una vez en la cama se les colocó un catéter intravenoso para la extracción de las muestras de sangre y se les tomaron las constantes vitales monitores específicos (Dinamap® Pro Care, Critikon®, Tampa, FL). En total contando las analíticas de selección y final se extrajeron unos 400 ml de sangre a cada voluntario.

## Métodos

Durante las sesiones experimentales se recogieron muestras de sangre de forma continuada hasta seis horas después de las bebidas. Se recogió orina basal (muestra puntual) y posteriormente en intervalos hasta 24 horas después de la administración (0-2 h, 2-4, 4-6, 6-12h, 12-24 h). Para evaluar los efectos del alcohol se utilizó una escala analógica visual que medía la sensación de borrachera de 0 a 100 mm como la que se muestra a continuación. La escala real era exactamente de 10 cm.



Durante las sesiones no se permitió que los voluntarios durmieran y en las primeras dos horas no podían realizar ninguna actividad. El desayuno se sirvió a las 2 h de la administración, y consistió en un bocadillo de queso con unas gotas de aceite de girasol y 300 ml de agua. A las 4 h los sujetos recibieron 100 ml de agua para poder generar suficiente cantidad de orina en cada intervalo. Finalmente fueron dados de alta si la alcoholemia en aire expirado era negativa y estaban en condiciones de hacerlo. A continuación se muestra un esquema de las sesiones experimentales con los procedimientos que se realizaron en cada tiempo.

*Métodos*

Tabla 5. Esquema de las sesiones experimentales en el estudio DOPET 1.

H	HP	HR	ES	INI	EAV	PA	FC	T <sup>a</sup>	INI	ORINA
predosis										Basal
HORA INICIO ADMINISTRACIÓN ____ HORA FINAL ____										
15 min										
30 min										
45 min										
1 h										
1,5 h										
2h										Orina 0-2 h
3h										
4h										Orina 2-4 h
6h										Orina 4-6 h
H = tiempo; HP = hora prevista; HR = hora real; ES = extracción de sangre; INI = iniciales del que realiza la tarea; EAV = Escala analógica visual; PA = presión arterial; T <sup>a</sup> = temperatura oral.										

Las zonas sombreadas corresponden a tiempos en que no se determinó la variable en cuestión.

### 7.1.9 Métodos de análisis de las muestras

A continuación se describe el método analítico que se utilizó para analizar cada una de las muestras de sangre u orina.

- Concentraciones de etanol en sangre.

Se determinaron mediante un inmunoensayo: *Diagnostic Reagent Enzyme Immunoassay (DRI) Ethyl Alcohol Assay* (Thermo Fisher, Fremont, CA, USA).

- Concentraciones urinarias de OHTyr, Tyr y HVAL.

Se determinaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC/MS/MS) (Khymenets 2010, Krotonoulas 2013). Se hicieron dos análisis preliminares de las muestras por GC/MS mediante un método de doble hidrólisis. Éstos se descartaron al ser mucho más precisa la determinación con cromatografía líquida (con GCMS no se detectaba un 40% del OHTyr sulfatado).

- Concentraciones urinarias de DOPAC y HVA.

Se determinaron con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) con un método de doble hidrólisis (Miró-Casas 2001a, 2003)

### 7.1.10 Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo de todas las variables de interés en función de la dosis de alcohol, se calcularon la media, la mediana, la desviación estándar y el rango de los valores.

Para la alcoholemia se obtuvieron el área bajo la curva (AUC) mediante la regla de los trapecoides y la concentración máxima ( $C_{max}$ ) de 0 a 6 h.

En el caso de los efectos subjetivos y las constantes vitales se calcularon las diferencias a la basal de 0 a 6 h. Con estas diferencias se obtuvieron

## *Métodos*

también el efecto máximo ( $E_{max}$ ) y el AUC de 0 a 6h para cada una de las variables.

Para la alcoholemia y los efectos subjetivos se calculó adicionalmente la  $t_{max}$ .

Para calcular la excreción total de hidroxitirosol se sumó la cantidad libre con el OHTyr-3-O-glucurónido, OHTyr-4-O-glucurónido, el OHTyr-3-sulfato y el HVAL total (a la vez suma del HVAL libre y el HVAL-4-O-glucurónido). En el caso del tirosol el total se calculó como la cantidad excretada libre sumada al Tyr-4-O-glucurónido.

La razón DOPAC/OHTyr se obtuvo dividiendo la excreción urinaria de DOPAC de 0 a 6 h por la OHTyr total (o DOPET).

La asociación entre alcoholemia, efectos subjetivos, constantes vitales, hidroxitirosol, tirosol, DOPAC, razón DOPAC/OHTyr y la dosis de alcohol se estudió con modelos lineales mixtos. Estos modelos, a diferencia de los modelos lineales generales, tienen en cuenta la correlación entre las observaciones de un mismo individuo. Se hizo lo mismo con la dosis de alcohol ajustada al peso para las variables de mayor interés.

Para el AUC de 0 a 6 h de la alcoholemia se aplicó una transformación logarítmica a los datos ya que las relaciones entre las variables originales y la dosis de alcohol eran claramente no-lineales. Las variables de excreción en orina de 0 a 6 h de los distintos fenoles tampoco cumplían las condiciones de aplicación del modelo de modo que también se logaritizaron.

La relación entre estas variables transformadas se estudió mediante un modelo lineal mixto. Se optó por este tipo de análisis en cada caso tras visualizar los gráficos de residuos habituales: por un lado, el gráfico cuantil-cuantil (q-q plot) para comprobar la normalidad de los datos y, por

## *Métodos*

el otro, el gráfico de los residuos frente a las predicciones basadas en el modelo para comprobar la homocedasticidad.

En el caso del AUC de la alcoholemia se pudo observar que ambas suposiciones del modelo se cumplían razonablemente bien con ambas variables transformadas mediante el logaritmo.

Para la excreción de los distintos fenoles, así como para la razón DOPAC/OHTyr fue suficiente con logaritmizar la variable respuesta y no la dosis de alcohol. Debido a la correlación entre los datos (obtenidos en mismos individuos), no se pudo usar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para la comparación de los modelos lineales mixtos.

Para la  $t_{\max}$ , a pesar de ser una variable continua que solo puede obtener unos valores concretos, se decidió usar el mismo modelo en lugar de un análisis no paramétrico mediante una prueba de Friedman. Con esta última no era posible tener en cuenta la correlación entre los datos de los mismos sujetos ya que no todos habían tomado todas las condiciones de tratamiento.

Finalmente se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre la alcoholemia y efectos subjetivos, excreción en orina de hidroxitirosol, tirosol y DOPAC, y se usaron los modelos lineales mixtos para calcular los p-valores correspondientes a la hipótesis nula de que no existía relación lineal entre las variables. Del mismo modo se procedió para correlacionar la recuperación de DOPAC con la de OHTyr.

## 7.2 MÉTODOS ESTUDIO DOPET 2

### 7.2.1 Diseño

Ensayo clínico de fase I, de farmacocinética y de biodisponibilidad comparativa en voluntarios sanos con asignación aleatoria de los tratamientos. Se trataba de un estudio doble ciego con dos placebos, de diseño cruzado, con 4 condiciones de tratamiento (4 sesiones experimentales por sujeto).

Las condiciones alcohol y vino se controlaron con el placebo del alcohol (agua) y el placebo del vino (vino desalcoholizado), respectivamente. El período mínimo de blanqueo mínimo entre sesiones fue de 3 días.

Se diseñaron tres estudios piloto y un estudio definitivo. El esquema experimental de los 4 estudios fue idéntico. Primero se realizaron los dos pilotos con vino de 13º, vino de uso más común en nuestro entorno, y posteriormente el piloto con el vino de 8º.

Los voluntarios fueron aleatorizados a las cuatro condiciones de tratamiento. Para ello en el estudio definitivo se utilizaron 6 cuadrados latinos de 4 x 4 como el que se muestra a continuación.

Tabla 6. Cuadrado latino ejemplo.

	Sesión 1	Sesión 2	Sesión 3	Sesión 4
Sujeto 1	A	D	B	C
Sujeto 2	D	C	A	B
Sujeto 3	C	B	D	A
Sujeto 4	B	A	C	D

En principio era un estudio doble ciego, ni el el investigador ni el sujeto sabían el tratamiento que recibían. Se utilizaron recipientes opacos para las administraciones. Debido a que el sabor del vino (con o sin alcohol)

resultó imposible de enmascarar de modo que no pudo cumplirse el doble ciego por parte de los sujetos.

### **7.2.2 Condiciones de tratamiento**

Las condiciones de tratamiento y dosis en cada uno de los estudios se describen a continuación:

#### Piloto 1 (30 g de alcohol; n=6)

- Etanol 13° (293 ml solución hidroalcohólica)
- Vino de 13 ° (293 ml)
- Vino desalcoholizado (293 ml)
- Placebo (293 ml agua Fontvella® sabor limón)

#### Piloto 2 (15 g de alcohol; n=6)

- Etanol 13° (147 ml solución hidroalcohólica)
- Vino de 13 ° (147 ml)
- Vino desalcoholizado (147 ml)
- Placebo (147 ml agua Fontvella® sabor limón)

#### Piloto 3 (15 g de alcohol; n=6)

- Etanol 8° (235 ml solución hidroalcohólica)
- Vino de 8 ° (235 ml)
- Vino desalcoholizado (235 ml)
- Placebo (235 ml agua Fontvella® sabor limón)

#### Estudio definitivo (15 g de alcohol; n=28, seis del piloto 2)

- Etanol 13° (147 ml solución hidroalcohólica)
- Vino de 13 ° (147 ml)
- Vino desalcoholizado (147 ml)

## Métodos

- Placebo (147 ml agua Fontvella® sabor limón)

Las bebidas se administraron frías en recipientes opacos y en un período de 5 minutos, como en el estudio anterior.

De nuevo la cantidad de alcohol administrada en este estudio en forma de solución hidroalcohólica de vodka y agua (1,5 a 3 UBE), o la contenida en el vino, estaban dentro del rango diario de consumo de alcohol de muchas personas. Además éstas dosis han demostrado efectos beneficiosos para la salud humana (Di Castelnuovo et al, 2006).

Los placebos utilizados fueron agua Fontvella® sabor limón, para la condición etanol y vino desalcoholizado, para la condición vino. El agua utilizada para diluir el Vodka Absolut® (40% de alcohol; es decir 40°) y obtener la solución hidroalcohólica también fue agua Fontvella® sabor limón.

Los vinos del estudio los proporcionó el *French National Institute for Agricultural Research (INRA)*. Se utilizó la variedad de vino Merlot del año 2010 de graduaciones 12,79° y 7,98°.

El vino desalcoholizado (también Merlot 2010, de la misma cosecha) contenía una mínima cantidad de alcohol (0,08°) que se consideró que no interferiría en los resultados de los estudios. Se obtuvo a partir del vino de 13° utilizando una tecnología de destilación al vacío con un evaporador tubular. Con esta técnica se reduce el alcohol rápidamente hasta menos del 0,2% del volumen y la matriz se preserva, excepto el alcohol y otras sustancias volátiles (Aguera 2010, Escudier 1990, Bourzeix 1998).

## Métodos

Los g de alcohol de una bebida se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$\text{g alcohol} = \text{grados de la bebida} \times \text{ml de bebida} \times 0,8 / 100$$

Para calcular los ml de vino o de vodka que se debían administrar en cada caso se procedió del siguiente modo:

Ej. Estudio definitivo

- ml de vino =  $15 \text{ g de alcohol} \times 100 / 12,79^\circ \times 0,8 = 147 \text{ ml}$
- ml de vodka =  $15 \text{ g de alcohol} \times 100 / 40^\circ \times 0,8 = 47 \text{ ml}$

Así, los ml fueron los siguientes:

- En el piloto 1 se mezclaron 94 ml de Vodka con 199 ml de agua
- En el piloto 2 y el definitivo se mezclaron 47 ml de Vodka con 100 ml de agua
- En el piloto 3 se mezclaron 47 ml de Vodka con 188 ml de agua.

### 7.2.3 Sujetos

Hombres y mujeres, de edad comprendida entre los 18 y 55 años. Finalmente sólo se reclutaron hombres.

Se diseñaron los tres estudios piloto con 6 sujetos cada uno. El estudio definitivo debía tener al menos 24 sujetos (según cálculo del tamaño muestral). En el estudio definitivo finalmente participaron 28 sujetos, ya que se utilizaron los datos de los seis sujetos del piloto 2, que tenía un diseño idéntico.

De cara a la sección de resultados los sujetos del piloto 1 (n=6) formaron la cohorte 1, los del estudio definitivo la cohorte 2 y los del piloto 3 la cohorte 3.

### 7.2.3.1 Cálculo del tamaño muestral

En el estudio DOPET 2 había 4 condiciones de tratamiento a comparar. Se preveía que existirían diferencias en las concentraciones de hidroxitirosol al menos entre el grupo alcohol y su placebo (agua) y también entre el vino con alcohol y su placebo (vino desalcoholizado).

En los análisis preliminares de DOPET 1, con GCMS, la cantidad total de hidroxitirosol excretada de 0 a 6 h tras la ingestión de 12 g de alcohol osciló entre 0,046 y 0,481  $\mu\text{g}$  (promedio de 6 sujetos:  $0,184 \pm 0,180 \mu\text{g}$ ).

El tamaño de la muestra para DOPET 2 se calculó teniendo en cuenta una alfa ajustada por las comparaciones múltiples (0,05/6) y una potencia de al menos 80%. Considerando una diferencia respecto al placebo de 0,14  $\mu\text{g}$  y una desviación típica de 0,18  $\mu\text{g}$  eran necesarios 24 sujetos para encontrar diferencias entre al menos dos de las condiciones de tratamiento, el alcohol (vodka diluido) y su placebo (agua).

### 7.2.4 Objetivos

El objetivo de este estudio se correspondía con el tercer objetivo de la memoria:

-Establecer la contribución de los distintos componentes del vino en las concentraciones de hidroxitirosol en el organismo y sus efectos biológicos.

### 7.2.5 Variables

Variables principales:

- Concentraciones urinarias y plasmáticas de hidroxitirosol.

Variables secundarias:

- Concentraciones en sangre de etanol.
- Concentración de etanol en aire espirado a los 30 minutos.

## Métodos

- Efectos subjetivos (sensación de borrachera).
- Concentraciones en sangre y en orina de HVAL (biomarcador del metabolismo oxidativo de la dopamina y del hidroxitirosol de origen natural).
- Concentraciones en sangre y en orina de DOPAC y HVA (biomarcadores del metabolismo oxidativo de la dopamina).
- Excreción urinaria de 4-HPAA y tirosina (añadidas *a posteriori*).
- Concentraciones plasmáticas de biomarcadores de oxidación e inflamación, perfil lipídico y glucosa. Se determinaron peróxidos lipídicos (TBARS), LDL oxidada (LDLox), colesterol total, colesterol HDL (HDLc), triglicéridos (TG), glucosa (Glu), proteína C reactiva (PCR), interleucina 6 (IL-6) y las moléculas de adhesión vascular (VCAM) e intercelular (ICAM).
- Seguridad y tolerabilidad del vino y el alcohol a las dosis empleadas.
- Rendimiento psicomotor (estudio definitivo). Se midió mediante el Test de sustitución de dígitos por símbolos (DSST).

### 7.2.6 Criterios de inclusión y exclusión

#### Criterios de inclusión

- 1) Voluntarios de ambos sexos con edades entre 18 y 55 años.
- 2) Comprender y aceptar los procedimientos del ensayo y firmar un consentimiento informado.
- 3) Historial y examen físico que demuestren no presentar trastornos orgánicos o psiquiátricos.
- 4) El ECG y la analítica general en sangre y orina realizados antes del ensayo debían estar dentro de los límites de la normalidad. Se admitieron variaciones menores o puntuales de los límites de la normalidad si a criterio del Investigador Principal, teniendo en cuenta el estado de la ciencia, no tenían trascendencia clínica, no

## Métodos

suponían riesgo para los sujetos y no interferían en la valoración de los tratamientos.

- 5) Índice de masa corporal ( $IMC = \text{peso}/\text{talla}^2$ ) comprendido entre 19 y  $25 \text{ kg/m}^2$ , y peso entre 50 y 100 kg. La correlación entre IMC y la grasa corporal varía en función del sexo, raza, edad y masa muscular. Las mujeres tienden a tener mayor grasa corporal que los hombres para un mismo IMC, del mismo modo que la gente de mayor edad en comparación con los jóvenes. Los deportistas pueden tener mayor IMC debido a un aumento de la masa muscular. Así pues sujetos con valores entre  $25$  y  $27 \text{ kg/m}^2$  podían ser incluidos a criterio del Investigador Principal.
- 6) Mujeres con un ciclo menstrual de duración entre 26-32 días y que fuera regular.
- 7) Sujetos con consumo social o recreacional de alcohol, y que hubieran tomado vino alguna vez en la vida.

### Criterios de exclusión

- 1) No cumplir los criterios de inclusión.
- 2) Antecedentes o evidencia clínica de trastornos gastrointestinales, hepáticos, renales o de otro tipo que pudieran suponer una alteración de la absorción, distribución, metabolismo o excreción de las bebidas, o que fueran sugestivos de irritación gastrointestinal por fármacos.
- 3) Antecedentes o evidencia clínica de trastornos psiquiátricos, alcoholismo, abuso de fármacos u otras drogas o consumo habitual de fármacos psicoactivos.
- 4) Haber donado sangre en las 8 semanas anteriores o participado en otros ensayos clínicos con fármacos en las 12 semanas anteriores.

## *Métodos*

- 5) Haber padecido alguna enfermedad orgánica o cirugía mayor en los tres meses previos al inicio del estudio.
- 6) Sujetos que presentaran intolerancia o reacciones adversas al alcohol o el vino.
- 7) Haber tomado medicación regularmente en el mes previo a las sesiones del estudio, a excepción de vitaminas, remedios a base de hierbas o complementos dietéticos que, a juicio del Investigador Principal o los colaboradores designados por éste, no supusieran riesgo para los sujetos y no interfirieran en los objetivos del estudio. Tratamiento con dosis únicas de medicación sintomática en la semana previa a las sesiones del estudio no fue motivo de exclusión si se suponía que se había eliminado completamente el día de la sesión experimental.
- 8) Fumadores o exfumadores desde hacía menos de un año.
- 9) Consumo de más de 20 g de alcohol diarios en las mujeres y más de 40 g en los hombres.
- 10) Consumidores de más de 5 cafés, té, bebidas de cola, u otras bebidas estimulantes o con xantinas diarios en los 3 meses previos al inicio del estudio.
- 11) Sujetos que no fueran capaces de entender la naturaleza del ensayo y los procedimientos que se les solicitaba seguir.
- 12) Sujetos con serología positiva para VHB, VHC o VIH.
- 13) Mujeres embarazadas o en período de lactancia, o que utilizaran anticonceptivos hormonales o no utilizaran medidas anticonceptivas fiables durante el estudio (como la abstinencia, los dispositivos intrauterinos, métodos de doble-barrera o con pareja vasectomizada).
- 14) Mujeres con amenorrea o síndrome premenstrual de intensidad moderada-severa.

## *Métodos*

- 15) Consumo de AINE (especialmente ácido acetilsalicílico) o antioxidantes o suplementos vitamínicos las dos semanas previas al inicio de los estudios.
- 16) Colesterol total en sangre superior 6 mmol/l (240 mg/dl) o triglicéridos superiores a 2,26 mmol/l (200 mg/dl).
- 17) Sujetos vegetarianos o con dietas aberrantes.
- 18) Ejercicio físico > 2h/día o > 3000 Kcal/semana.

### **7.2.7 Requerimientos del estudio**

Los participantes debían evitar el ejercicio físico extenuante desde 48 h antes de las sesiones experimentales y no podían tomar medicamentos o cualquier tipo de droga durante el estudio.

Las 24h previas a cada sesión y durante las sesiones experimentales tampoco podían consumir alimentos ricos en xantinas como café, mate, té, coca-cola o chocolate.

A su vez debían abstenerse de tomar cualquier bebida alcohólica durante los mismos plazos de tiempo y de usar colutorios con alcohol.

Los voluntarios debían seguir una dieta pobre en fenoles las 72 h previas al inicio de cada sesión experimental y hasta 24 horas después. Todos los sujetos recibieron un listado de los alimentos permitidos y prohibidos. Debían seguir su dieta habitual exceptuando las restricciones dietéticas. Se les entregó también un modelo de dieta, con lo que podían desayunar, comer y cenar los 3 días previos a cada sesión experimental. El listado es el que se describe a continuación.

#### Alimentos permitidos

- Pan, bollería, pastelería (sin chocolate)
- Cereales: maíz , trigo, arroz
- Leche, queso, yogur, mantequilla, margarina, helado, flan
- Huevos
- Pasta
- Carne roja y blanca, embutidos, pescado azul y blanco, mariscos
- Plátano
- Patatas chips, fritos (en aceite vegetal, no aceite de oliva)
- Tónicas
- Aceite de girasol

Alimentos prohibidos

- Algunas verduras y legumbres (la cebolla, el apio, las patatas, la lechuga, los guisantes, el tomate, el brócoli, las endivias, las lentejas y la col)
- Frutas y zumos, mermeladas
- Cualquier bebida alcohólica (cerveza, vino, destilados)
- Café, té, mate, coca-cola, cacao, chocolate, bebidas energéticas
- Aceite de oliva y aceitunas

Además los voluntarios debían cumplimentar un registro dietético para comprobar si habían seguido bien la dieta.

A continuación se muestra una página del registro a modo de ejemplo.

Métodos

REGISTRO DIETÉTICO

VOL: \_\_\_\_ CODIGO: PRE-SESIÓN 1

DIETA POBRE FENOLES Y SIN ALCOHOL

Día de la semana \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/ 2011

Alimentos Desayuna Hora:	Modo de preparación	Cantidad (medida casera)
Alimentos Media mañana Hora:	Modo de preparación	Cantidad (medida casera)
Alimentos Comida Hora:	Modo de preparación	Cantidad (medida casera)
Alimentos Merienda Hora:	Modo de preparación	Cantidad (medida casera)
Alimentos Cena Hora:	Modo de preparación	Cantidad (medida casera)

### **7.2.8 Sesiones experimentales**

Los sujetos se reclutaron del mismo modo que en el anterior estudio (DOPET 1). La visita de selección se realizó en un período de hasta 3 semanas previas al inicio de las sesiones experimentales.

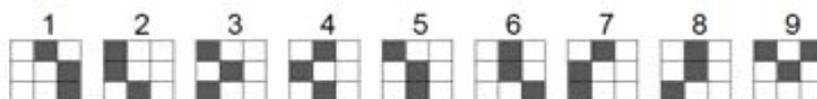
En esta visita se hicieron los mismos procedimientos que en el DOPET1. Además se explicó a los voluntarios la dieta que tenían que seguir y se les hizo un entrenamiento en la prueba de rendimiento psicomotor (test de sustitución de dígitos por símbolos-digit symbol substitution test, DSST).

El DSST es una prueba que valora la atención y reconocimiento de estímulos, la velocidad de respuesta y la coordinación visuomotora de los participantes. Hay que emparejar dígitos con formas geométricas lo más rápido posible y cometiendo el mínimo número de errores. Se hace mediante ordenador y tiene una duración de 90 segundos.

El formato de las figuras es una matriz cuadrada de 3 x 3, sombreada aleatoriamente. A cada figura le corresponde un número. El voluntario con el teclado numérico del ordenador tiene que componer la forma numérica que corresponde al número aleatorio que aparece en la pantalla. En el ejemplo siguiente si el dígito fuera 2 el sujeto debería apretar en el teclado numérico las teclas 7,4,2.

## Métodos

Figura 4. Ejemplo en que se muestra como realizar el DSST.



2



El entrenamiento consistía en hacer la prueba en al menos 20 ocasiones para alcanzar la meseta de aprendizaje. Se calculaba el coeficiente de variación del número de respuestas correctas de las 5 últimas ocasiones y si era menor del 5% indicaba que el sujeto ya estaba bien entrenado de cara a las sesiones experimentales.

Cada sujeto participó en cuatro sesiones experimentales, cada una de ellas separada un mínimo de 3 días. La duración total de los estudios fue de un mínimo de 4 semanas (una para la selección, dos para la realización de las 4 sesiones experimentales, y una para la visita final).

Los sujetos debían acudir en ayunas para poder iniciar las sesiones a las 08:00 de la mañana. Debían a su vez aportar la orina de las 24 h previas en unos contenedores especiales.

## *Métodos*

A su llegada se les realizaron un test de drogas en orina (Instant-View® multitest: anfetaminas, cocaína, metanfetamina, morfina, tetrahidrocanabinol, fenilciclidina) y una alcoholemia en aire espirado (etilómetro portátil Drager®) para comprobar que no habían bebido las últimas horas. Una vez en la cama se les colocó un catéter intravenoso para la extracción de las muestras de sangre y se les tomaron las constantes vitales monitores específicos (Dinamap® Pro Care, Critikon®, Tampa, FL). A su vez, en el estudio definitivo se realizó el DSST en dos ocasiones (se seleccionó como basal la mejor de ambas).

Una diferencia importante respecto al estudio DOPET 1 es que los sujetos recibieron las bebidas experimentales 2 h después de haber recibido un vaso de agua de 300 ml, hacia las 10:00 de la mañana. De este modo se podía determinar el hidroxitirosol basal de cada sesión (-2 h a 0h) y asegurar que en la orina no quedaban restos de hidroxitirosol del día anterior.

Durante las sesiones experimentales se recogieron muestras de sangre de forma continuada, a los 15, 30, 45 minutos, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 y 22 horas. En total contando las analíticas de selección y final se extrajeron unos 490 ml de sangre a cada voluntario.

Se recogió orina en intervalos hasta 22 horas después de la administración (24 después del agua inicial) (0-2 h, 2-4 h, 4-6 h, 6-12 h, 12-22 h). Para evaluar los efectos subjetivos alcohol se utilizó una escala analógica visual que media la sensación de borrachera de 0 a 100 mm como en el estudio previo. También se evaluó el rendimiento psicomotor mediante el DSST a los 30 minutos, 1 h, 2 h y 6 h. Se realizó de nuevo un test de alcoholemia en aire espirado en el momento previsto de la concentración máxima de alcohol o  $t_{max}$  (30 minutos) y antes de dar el alta a los voluntarios, a las 6 h tras la administración de las bebidas experimentales.

## *Métodos*

Los sujetos desayunaron a las 2 horas de las bebidas un bocadillo de queso con unas gotas de aceite de girasol y 300 ml de agua. A las 4 h se administraron 100 ml de agua adicionales y a las 6 h comieron un plato de pasta sin condimentos.

Al final del estudio los sujetos acudieron a una visita final en la que realizó de nuevo una exploración física y unas analíticas de sangre y orina completas.

A continuación se muestra una tabla resumen de los procedimientos que se realizaron durante las sesiones experimentales

## Métodos

Tabla 7. Esquema de las sesiones experimentales en el estudio DOPET 2.

H	HP	HR	ES	INI	EAV	PA	FC	T <sup>a</sup>	INI	ORINA
predosis										Orina -2-0 h 300ml agua
HORA INICIO ADMINISTRACIÓN ____ HORA FINAL ____										
15 min.										
30 min.										DSST
45 min.										
1 h										DSST
1,5 h										
2 h										Orina 0-2 h DSST
3 h										
4 h										Orina 2-4 h
6 h										Orina 4-6 h DSST
22 h										Orina 6-12 h, 12 h-22 h
H = tiempo; HP = hora prevista; HR = hora real; ES = extracción de sangre; INI = iniciales del que realiza la tarea; EAV = Escala analógica visual; PA = presión arterial; T <sup>a</sup> = temperatura oral.										

Las zonas sombreadas corresponden a tiempos en que no se determinó la variable en cuestión.

### **7.2.9 Métodos de análisis de las muestras**

- Análisis los distintos fenoles en los vinos.

El tirosol, la tirosina y la tiramina se cuantificaron mediante cromatografía de ultra-alta presión acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. La tiramina se analizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

- Concentraciones de alcohol en sangre y de los distintos fenoles en orina.

Mismas técnicas que en el estudio DOPET 1.

- Excreción urinaria de intermediarios y metabolitos en la síntesis de dopamina (tirosina, DOPAC, HVA, y 4-HPAA).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, utilizando el etilcloroformato como agente derivatizante, con ligeras modificaciones a métodos ya publicados previamente (Qiu 2007, Namera 2002, Husek 1991).

- Determinaciones en plasma de glucosa y lípidos.

Métodos enzimáticos automatizados. La fracción LDL del colesterol se calculó mediante la fórmula de Friedewald:  $\text{Colesterol LDL} = \text{colesterol total} - (\text{colesterol HDL} + \text{triglicéridos}/5)$  en mg/dl.

- La PCR se analizó mediante inmunturbidimetría, la LDLox mediante ELISA y los peróxidos lipídicos (TBARS) mediante métodos fluorimétricos. Para la IL-6, VCAM e ICAM se utilizó un analizador de citometría de flujo y un enzimoimmunoensayo (luminex)

### **7.2.10 Análisis estadístico**

Se hizo un análisis descriptivo de todas las variables para cada uno de los tratamientos.

Antes de proceder al análisis de los datos para algunas variables se calcularon las diferencias a la basal: concentraciones de los biomarcadores de inflamación, oxidación, lípidos y glucosa, puntuaciones de las variables subjetivas, rendimiento psicomotor, y mediciones de las constantes vitales.

Se calculó el efecto máximo ( $E_{max}$ ) o concentración máxima ( $C_{max}$ ), el tiempo para alcanzarlos ( $t_{max}$ ) y el área bajo la curva (AUC) de 0 a 6h mediante la regla de los trapecoides para cada una de estas variables. En el caso de la glucosa los parámetros se calcularon las 2 primeras horas tras la administración mientras que para TBARS, PCR y las LDL oxidada fue para las primeras 22h.

Se comparó el AUC y la  $C_{max}$  de estas variables mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas con el tratamiento (bebida experimental) como factor. Cuando con el ANOVA se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se hicieron comparaciones múltiples posthoc dos a dos ajustadas mediante el test de Tukey.

El análisis de  $t_{max}$  se hizo mediante la prueba no paramétrica correspondiente (Friedman). Se hicieron comparaciones múltiples 2 a 2 mediante el test de Wilcoxon.

Se hizo además una comparación del curso temporal entre los distintos tratamientos para cada una de las variables mediante un ANOVA de medidas repetidas con dos factores, el tratamiento, y el tiempo. De nuevo, cuando la interacción tiempo x tratamiento resultó

## *Métodos*

estadísticamente significativa se hicieron comparaciones múltiples dos a dos para cada punto en el tiempo ajustadas mediante el test de Tukey.

Para las concentraciones de alcohol se calcularon los siguientes parámetros cinéticos:  $C_{max}$ , AUC de 0 a 6h mediante la regla de los trapezoides y  $t_{max}$ . La  $C_{max}$  y el AUC de las dos bebidas alcohólicas se comparó mediante una *t*-Student para datos apareados mientras que para la  $t_{max}$  se usó el test de Wilcoxon.

Para calcular la excreción total de hidroxitirosol se sumó la cantidad libre con el OHTyr-3-O-glucurónido, OHTyr-4-O-glucurónido, el OHTyr-3-sulfato y el HVAL total (a la vez suma del HVAL libre y el HVAL-4-O-glucurónido). En el caso del tirosol el total se calculó como la cantidad excretada libre sumada al Tyr-4-O-glucurónido.

La excreción de los distintos fenoles y metabolitos de la dopamina en orina de 0 a 6 h se comparó mediante una ANOVA de medidas repetidas con el tratamiento como factor. Para los fenoles fue necesario logaritmizar las variables ya que no se cumplían las condiciones de aplicación de la prueba, en algunos casos la normalidad y en otros la esfericidad. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se hicieron comparaciones múltiples dos a dos ajustadas mediante el test de Tukey.

Los análisis se realizaron mediante SPSS Statistics for Windows (version 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se consideró estadísticamente significativa una  $p < 0,05$ .



## 8. RESULTADOS

### 8.1. RESULTADOS DOPET 1

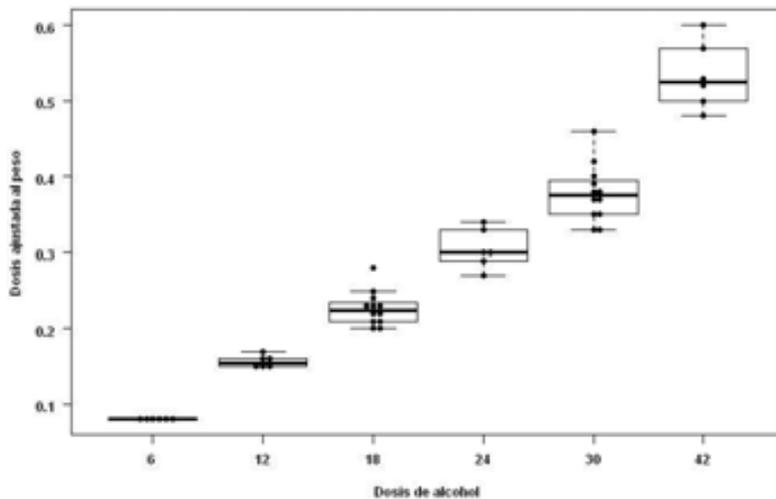
#### 8.1.1. Características demográficas basales

Los voluntarios de los estudios pilotos y el estudio definitivo (total n=24) eran todos hombres sanos con una edad de  $25,75 \pm 4,51$  años, un peso de  $79,17 \pm 6,54$  kg y un IMC de  $24,27 \pm 2,22$  kg/m<sup>2</sup>. Una tercera parte de ellos (8) eran fumadores y el 91% consumía alcohol de forma regular (5 UBE por semana). El resto aunque no consumía de forma regular si lo hacía esporádicamente.

#### 8.1.2. Dosis de alcohol vs. dosis ajustada al peso

En la siguiente figura se muestra que a pesar de que en el estudio la dosis de alcohol no se ajustó al peso, no hubo apenas solapamiento entre las dosis correlativas cuando éstas se ajustaron. Las dosis de 24 y 30 g fueron las más parecidas entre ellas.

Figura 5. Bloxplot de la dosis ajustada por dosis de alcohol.



## Resultados

A continuación se muestran los resultados en tablas y figuras para cada una de las variables del estudio

En las figuras se han representado los valores de las distintas variables por dosis de alcohol. Para las variables de mayor interés se muestran también los datos ajustados al peso de los sujetos. Si la relación entre la dosis de alcohol y la variable parecía ser no lineal se elaboraron figuras con distintos ajustes con la/s variable/s logaritmizadas. Estos gráficos, juntamente con los gráficos q-q plot y los de homocedasticidad para las variables con y sin logaritmizar se utilizaron para decidir si era o no más adecuado aplicar el modelo de regresión con los datos transformados.

Para la  $t_{\max}$  de la alcoholemia y los efectos subjetivos se han usado gráficos *balloon plot* que son útiles para identificar visualmente si existe una relación con la dosis de alcohol.

En las distintas tablas para cada variable se muestra el análisis descriptivo de la misma, los parámetros del modelo lineal mixto y su significación, las estimaciones de las medias con el modelo y su intervalo de confianza (IC) del 95%.

El modelo lineal mixto permite tener en cuenta la correlación que existe entre los datos obtenidos de un mismo individuo. La ecuación de todo modelo de regresión es  $y = ax + b$ , donde  $a$  es la pendiente y  $b$  es la intersección o valor de  $y$  cuando  $x$  es 0. Los parámetros que se aportan en las tablas son la pendiente ( $a$ ), que nos informa del incremento o disminución en unidades de la variable por cada gramo de alcohol, y la intersección ( $b$ ). Cuando la  $p$  de la pendiente es  $<0,05$  indica que existe relación entre la dosis de alcohol y dicha variable.

En los gráficos que hay una línea azul esta corresponde a un ajuste suavizado. No utiliza todos los datos sino los más cercanos entre ellos.

## Resultados

### 8.1.3. Concentraciones de alcohol en sangre

#### 8.1.3.1. Concentraciones máximas ( $C_{max}$ )

Tabla 8. Análisis descriptivo de  $C_{max}$  (nmoles/ml).

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
6 g	6	0	2,79	0,67	2,72	1,95	3,60
12 g	6	0	5,32	1,70	5,09	3,36	7,81
18 g	12	0	7,45	2,38	6,95	4,56	10,81
24 g	6	0	12,62	2,77	12,80	8,47	16,06
30 g	12	0	11,91	2,63	11,61	8,47	16,06
42 g	6	0	19,28	3,62	19,10	14,54	25,40

Figura 6.  $C_{max}$  en función de la dosis de alcohol.

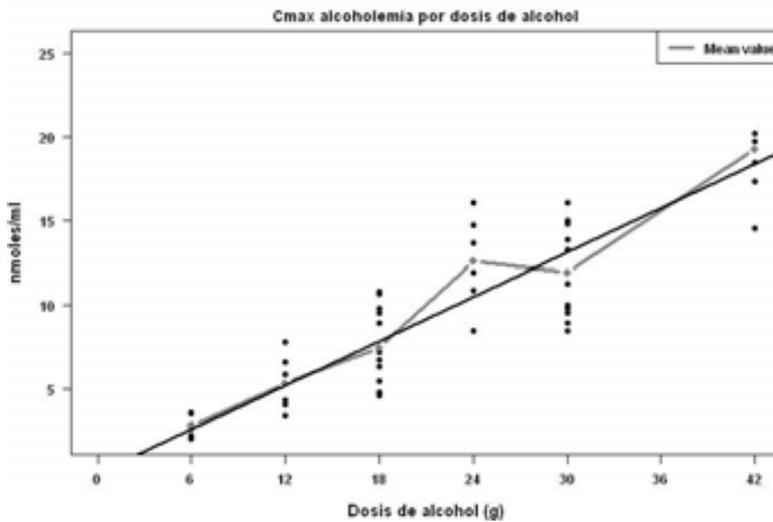


Tabla 9. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	0,271	0,901	23	0,301	0,766
Dosis alcohol [g]	0,425	0,035	23	12,086	<0.001

Por cada g de alcohol  $C_{max}$  aumenta en 0,425 nmoles/ml.

## Resultados

Tabla 10. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol.

	Estimación	2,5%	97,5%
6 g	2,82	1,33	4,32
12 g	5,38	4,20	6,55
18 g	7,93	6,98	8,87
24 g	10,48	9,59	11,37
30 g	13,03	11,99	14,07
42 g	18,14	16,46	19,81

A continuación se muestran los resultados con la dosis ajustada al peso.

Figura 7.  $C_{max}$  en función de la dosis ajustada al peso

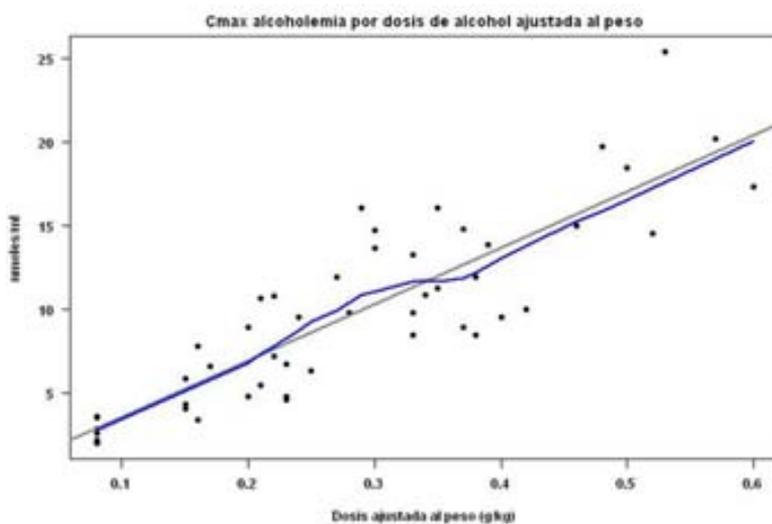


Tabla 11. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	0,584	0,944	23	0,618	0,542
Dosis [g/kg]	32,436	2,858	23	11,349	<0,001

Por cada g/kg de alcohol  $C_{max}$  aumenta 32,436 nmoles/ml.

## Resultados

Tabla 12. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol ajustada al peso.

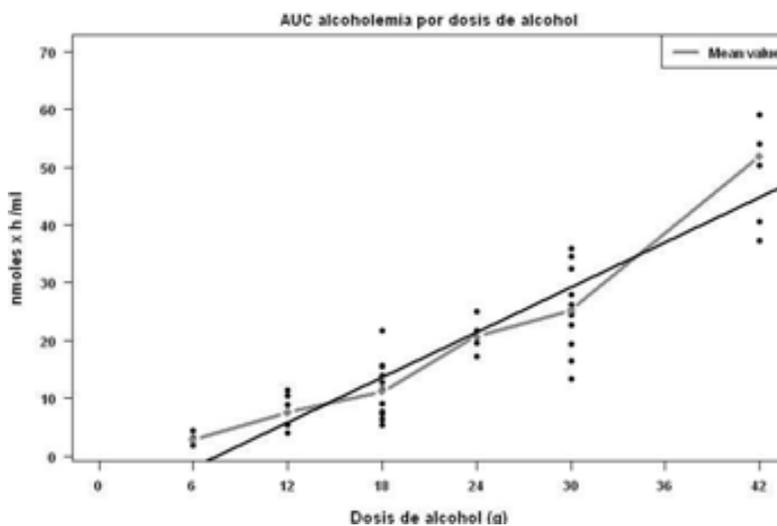
	Estimación	2,5%	97,5%
0,1 g/kg	3,83	2,35	5,30
0,2 g/kg	7,07	5,97	8,18
0,3 g/kg	10,31	9,33	11,30
0,4 g/kg	13,56	12,36	14,75
0,5 g/kg	16,80	15,20	18,41
0,6 g/kg	20,05	17,94	22,15

### 8.1.3.2. Área bajo la curva (AUC)

Tabla 13. Análisis descriptivo de AUC (nmoles x h/ml).

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
6 g	6	0	2,92	0,97	3,01	1,81	4,5
12 g	6	0	7,63	3,06	7,14	4,07	11,5
18 g	12	0	11,16	4,94	10,38	5,40	21,7
24 g	6	0	20,80	2,60	20,55	17,28	25,1
30 g	12	0	25,30	6,89	25,20	13,29	35,8
42 g	6	0	51,90	12,04	52,16	37,36	70,1

Figura 8. AUC concentración alcohol en función de la dosis.



## Resultados

A continuación se muestran los resultados con la dosis ajustada al peso.

Figura 9. AUC en función de la dosis ajustada al peso.

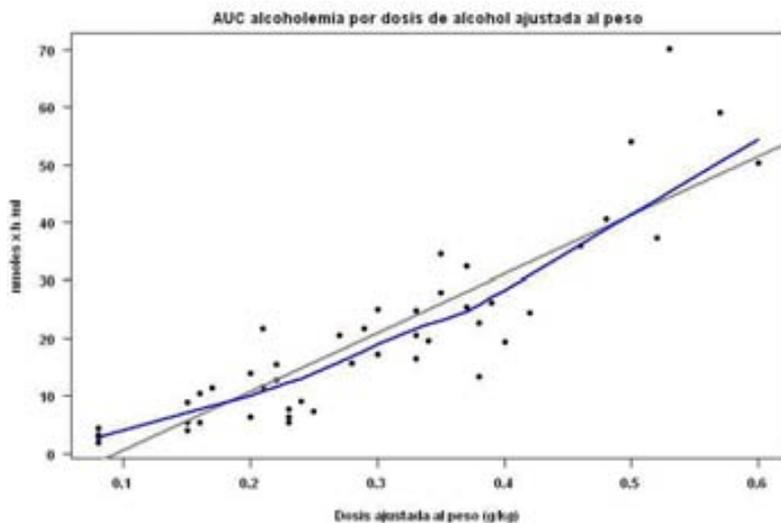
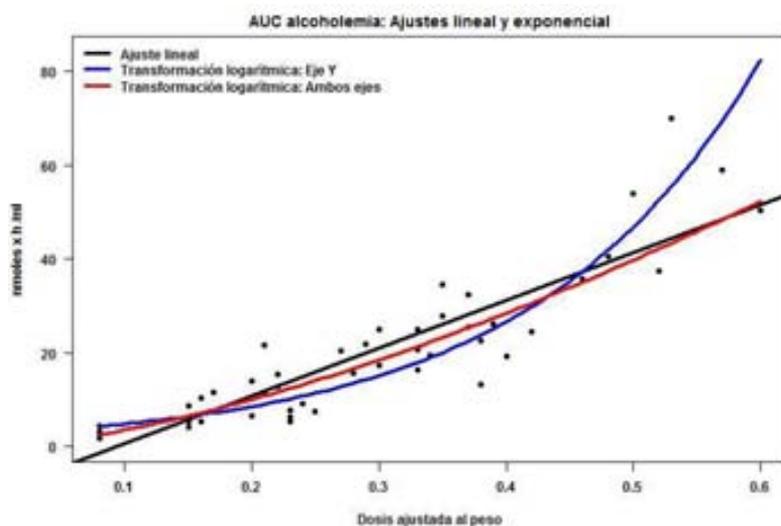


Figura 10. Ajustes lineal y exponencial de los datos con la dosis/kg.



## Resultados

En los gráficos previos se puede observar que se obtiene un mejor ajuste de los datos al logaritmizar la variable AUC. Una vez superados los 30 g de alcohol o los 0,5 g/kg la relación entre ambas variables deja de ser lineal.

Figura 11. Gráficos para comprobar normalidad (izquierda) y homocedasticidad (derecha). Se muestran los correspondientes a ambas variables logaritmizadas, que son los que cumplen más las condiciones de aplicación del modelo.

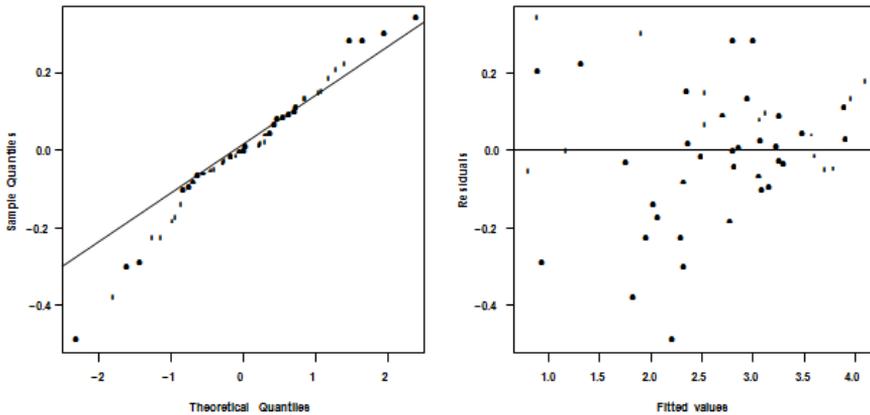


Tabla 14. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros (escala logarítmica en ambas variables).

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	4,725	0,136	23	34,734	<0.001
Log dosis [g/kg]	1,503	0,086	23	17,468	<0.001

## Resultados

Tabla 15. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis ajustada (escala original).

	Estimación	2,5%	97,5%
0,1 g/kg	3,54	2,35	5,34
0,2 g/kg	10,04	7,54	13,37
0,3 g/kg	18,47	14,90	22,88
0,4 g/kg	28,45	24,17	33,49
0,5 g/kg	39,78	35,17	45,01
0,6 g/kg	52,32	47,77	57,30

### 8.1.3.3. Tiempo máxima concentración ( $t_{max}$ )

Tabla 16. Análisis descriptivo de  $t_{max}$  de las concentraciones (h)

Dosis	N	Perdidos	Mediana	Min	Max
6 g	6	0	0,38	0,25	0,75
12 g	6	0	0,50	0,50	0,75
18 g	12	0	0,50	0,25	1,00
24 g	6	0	0,75	0,25	1,50
30 g	12	0	0,62	0,50	1,50
42 g	6	0	0,75	0,50	1,50

## Resultados

Figura 12. Representación gráfica de  $t_{max}$  (h) en función de la dosis de alcohol.

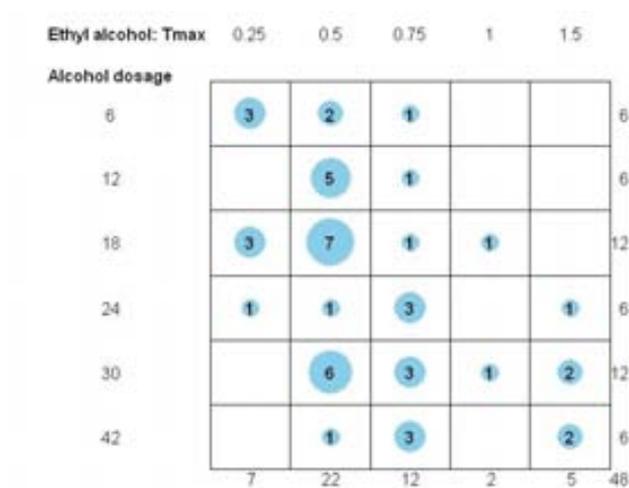


Tabla 17. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros

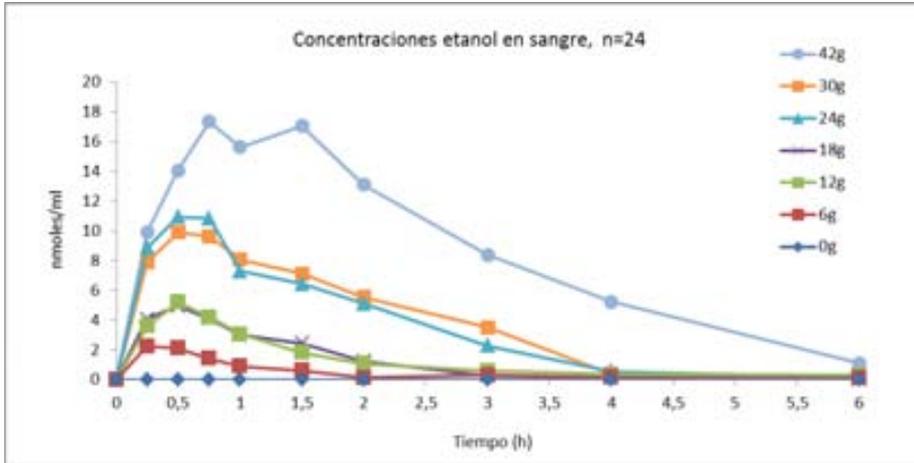
	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	0,294	0,105	23	2,792	0,010
Dosis alcohol [g]	0,016	0,004	23	3,849	0,001

Por cada g de alcohol aumenta la  $t_{max}$  en 0,016 h (57,6 s).

## Resultados

### 8.1.3.4. Curso temporal

Figura 13. Concentraciones de alcohol de 0 a 6 h en función de la dosis administrada.



A medida que aumenta la dosis se pueden detectar durante más tiempo alcohol en sangre, que ha desaparecido a las 6 h para todas las dosis. Del mismo modo a medida que aumenta la dosis lo hacen las concentraciones máximas y el AUC. Hay un cierto solapamiento entre dosis correlativas como la de 24 y 30 g y la de 12 y 18 g.

## Resultados

### 8.1.3.5 Resumen de alcohol en sangre

-Las concentraciones de alcohol en sangre aumentaron con la dosis administrada, y resultaron indetectables a las 6 h.

-Existió una relación entre los parámetros farmacocinéticos de la alcoholemia ( $C_{max}$ , AUC y  $t_{max}$ ) y la dosis de alcohol. A medida que aumentaba la dosis de alcohol aumentaron dichos parámetros.

-Tanto para la  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  como para el curso temporal de las concentraciones se pudo observar un solapamiento entre algunas de las dosis (12-18 g y 24-30 g). Este hecho se puede explicar por la variabilidad interindividual en la cinética del etanol, ya que los sujetos que tomaron una de esas dosis no tomaron la correlativa. Al ajustar la dosis de alcohol al peso de los sujetos estas pequeñas discrepancias se redujeron.

-La  $C_{max}$  siguió una relación lineal con la dosis de alcohol. Para el AUC el valor de 42 g se disparó respecto al resto sugiriendo que la relación con la dosis de alcohol a partir de cierto punto deja de ser lineal. Tras probar distintas estrategias logaritmizando una, otra u ambas variables el mejor ajuste se obtuvo con las dos variables logaritmizadas.

-La  $t_{max}$  de las concentraciones se obtuvo a los 30 minutos de la administración en la mayoría de los sujetos, aunque se pudo observar un ligero aumento a medida que lo hacía la dosis administrada (hasta 1,5 h en 5 de los voluntarios de la dosis más alta).

## Resultados

### 8.1.4. Efectos subjetivos (sensación de borrachera)

#### 8.1.4.1. Efectos máximos ( $E_{max}$ )

Tabla 18. Análisis descriptivo de  $E_{max}$  (mm).

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
0 g	24	0	1,0	3,49	0,0	0	17
6 g	6	0	6,0	9,59	3,0	0	25
12 g	6	0	18,5	25,29	5,5	0	61
18 g	12	0	15,8	14,96	12,5	0	51
24 g	6	0	28,5	27,92	19,5	4	73
30 g	12	0	31,6	21,19	34,0	2	60
42 g	6	0	38,5	24,02	26,5	18	73

Figura 14.  $E_{max}$  en función de la dosis de alcohol.

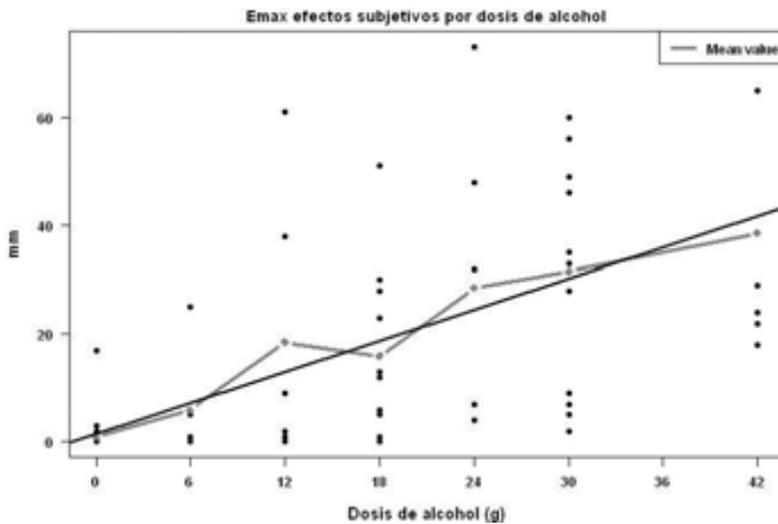


Tabla 19. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	1,254	3,068	47	0,409	0,684
Dosis alcohol [g]	0,974	0,123	47	7,944	<0.001

Por cada gramo de alcohol  $E_{max}$  aumenta en 0,974 mm.

## Resultados

Tabla 20. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol.

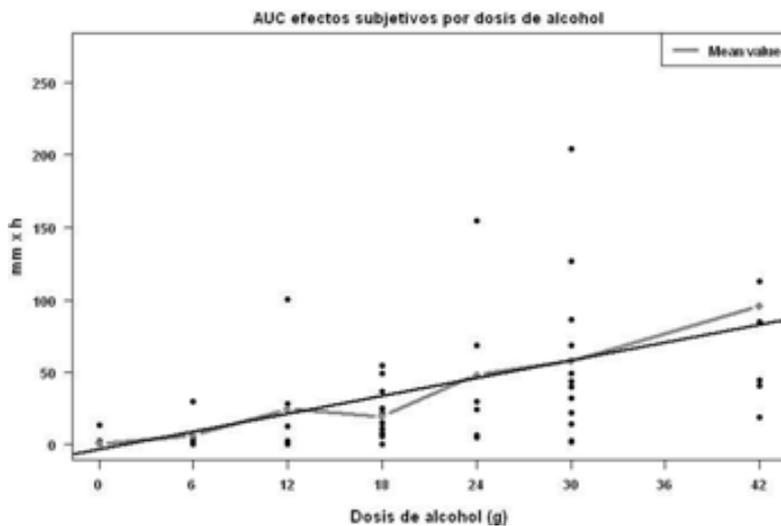
	Estimación	2,5%	97,5%
6 g	1,25	-4,92	7,43
12 g	7,10	1,68	12,51
18 g	12,94	7,94	17,93
24 g	18,78	13,79	23,78
30 g	24,63	19,21	30,04
42 g	30,47	24,30	36,64

### 8.1.4.2. Área bajo la curva (AUC)

Tabla 21. Análisis descriptivo de la AUC de los efectos (mm x h).

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
0 g	24	0	0,85	2,84	0,00	0,00	13,8
6 g	6	0	6,54	11,57	2,00	0,00	29,8
12 g	6	0	24,50	38,63	7,88	0,00	100,5
18 g	12	0	19,63	18,63	13,38	0,00	54,8
24 g	6	0	48,17	56,87	27,25	5,00	154,2
30 g	12	0	57,63	58,48	42,25	1,75	204,0
42 g	6	0	96,00	93,07	64,88	19,00	273,0

Figura 15. AUC efectos en función de la dosis de alcohol.



## Resultados

Tabla 22. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	-3,081	7,472	47	-0,412	0,682
Dosis alcohol [g]	2,056	0,314	47	6,556	0,001

Tabla 23. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol.

	Estimación	2,5%	97,5%
6 g	-3,08	-18,11	11,95
12 g	9,26	-3,73	22,24
18 g	21,59	9,76	33,42
24 g	33,93	22,10	45,76
30 g	46,27	33,28	59,25
42 g	58,60	43,57	73,63

## Resultados

### 8.1.4.3. Tiempo máximo efecto ( $t_{max}$ )

Tabla 24. Análisis descriptivo de  $t_{max}$  de los efectos (h).

Dosis	N	Perdidos	Mediana	Min	Max
0 g	24	0	0,0	0,0	1
6 g	6	0	0,5	0,0	1
12 g	6	0	0,5	0,0	1
18 g	12	0	0,5	0,0	1
24 g	6	0	0,5	0,5	1
30 g	12	0	0,5	0,5	2
42 g	6	0	1	0,5	2

Figura 16. Representación gráfica de  $t_{max}$  (h) en función de la dosis de alcohol.

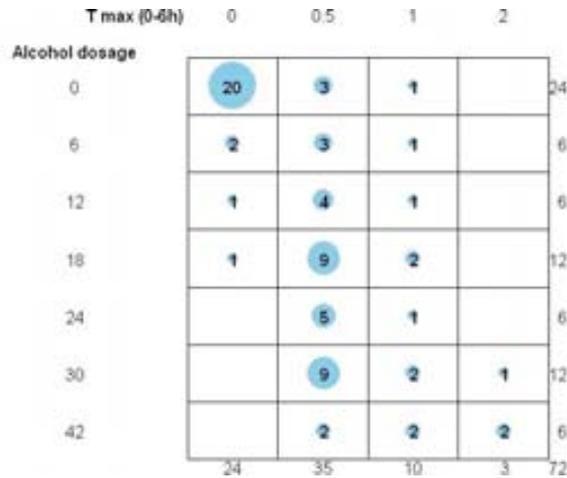


Tabla 25. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

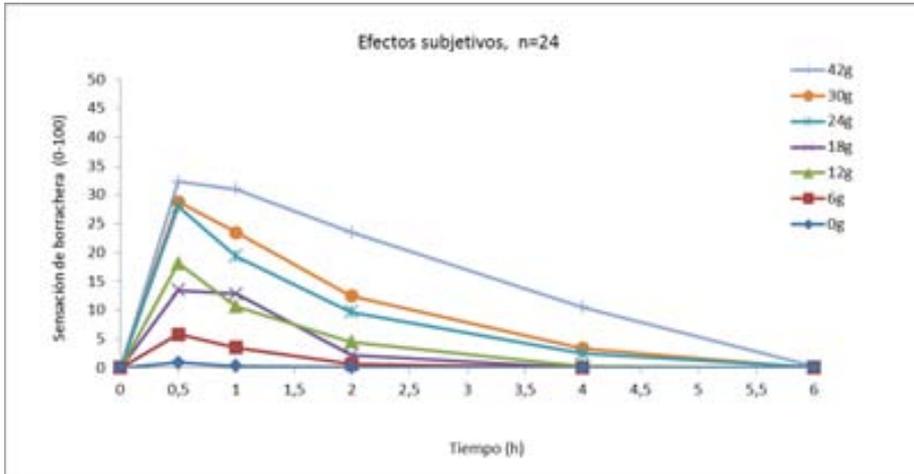
	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	0,133	0,063	47	2,111	0,040
Dosis alcohol [g]	0,022	0,003	47	7,578	<0,001

Por cada gramo de alcohol aumenta la  $t_{max}$  de los efectos en 0,022h (1,32 minutos).

## Resultados

### 8.1.4.4. Curso temporal

Figura 17. Efectos subjetivos de 0 a 6 h en función de la dosis.



A medida que aumenta la dosis se pueden detectar durante más tiempo efectos subjetivos, que habían desaparecido a las 6 h para todas las dosis. Del mismo modo a medida que aumenta la dosis los efectos máximos y el AUC. Hay un cierto solapamiento entre dosis correlativas como la 12 y 18 g.

*8.1.4.5. Resumen de efectos subjetivos*

-Los efectos subjetivos (sensación de borrachera) con todas las dosis administradas fueron leves ya que no llegaron a superar los 35 mm (en promedio), y desaparecieron a las 4 h en la mayoría de voluntarios, exceptuando las dosis de 42 g con la que habían desaparecido a las 6 h.

-Existe una relación entre los parámetros farmacocinéticos de los efectos subjetivos del alcohol ( $E_{max}$ , AUC,  $t_{max}$ ) y la dosis de alcohol. A medida que aumentó la dosis de alcohol aumentaron dichos parámetros. Los efectos subjetivos también aumentaron para mismos tiempos a medida que lo hacía la dosis.

-La sensación de borrachera que produce una misma dosis de alcohol es muy variable de un individuo a otro (el CV para las distintas dosis de alcohol osciló entre el 63% y 150%). Ver también la dispersión de puntos para una misma dosis en las figura 14. Por este motivo los IC de los efectos estimados con las distintas dosis se solapan la mayoría de ellos.

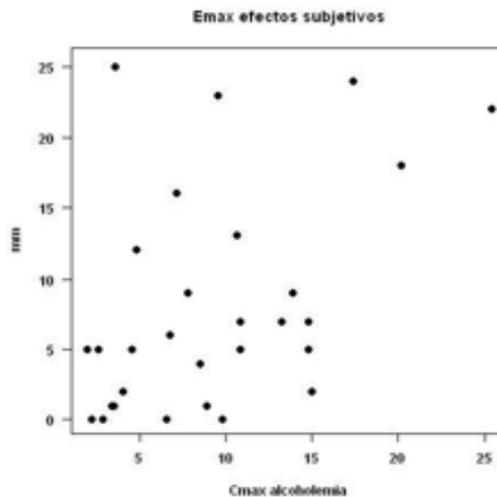
-La  $t_{max}$  de los efectos se produjo a los 30 minutos para la mayoría de las dosis estudiadas y sujetos (ver gráfico balloonplot), sin embargo en 3 sujetos apareció hasta 2 h después de la administración.

### 8.1.5. Correlación entre concentraciones y efectos

Se observó una correlación positiva baja estadísticamente significativa entre el AUC de las concentraciones de 0 a 6 h y el AUC de los efectos subjetivos de 0 a 6 h ( $r=0,353$   $p=0,01$ ).

También se correlacionaron aunque sin alcanzar la significación estadística  $C_{\max}$  y  $E_{\max}$  ( $r=0,308$ ,  $p=0,055$ ).

Figura 18. Correlación entre concentraciones y efectos máximos



El hecho de que no se correlacionen mejor estas variables es porque hay una gran variabilidad de un sujeto a otro en los efectos a pesar de tener mismas concentraciones. El distinto grado de tolerancia al alcohol de los individuos es la explicación más plausible.

### 8.1.6 Excreción urinaria de hidroxitirosol

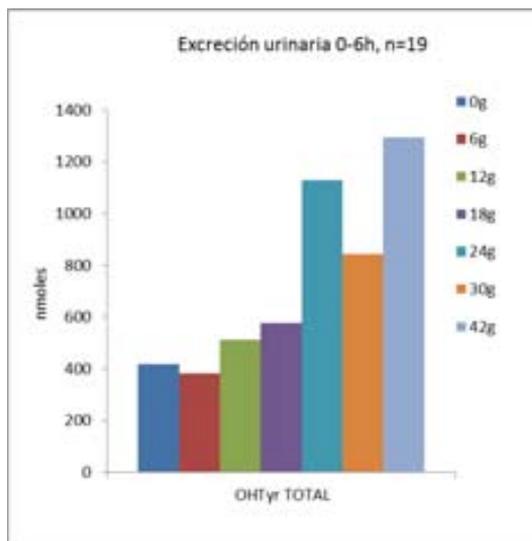
#### 8.1.6.1. Hidroxitirosol total

Tabla 26. Análisis descriptivo del hidroxitirosol total (nmoles totales 0-6 h)

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
0 g	19	5	427	498	268	87	2337
6 g	4	2	383	300	270	173	822
12 g	4	2	513	256	406	347	891
18 g	9	3	577	288	577	226	950
24 g	6	0	1131	1038	824	295	3196
30 g	9	3	844	802	624	166	2748
42 g	6	0	1296	984	925	444	3144

Los sujetos con datos perdidos se deben a la falta de muestra tras haberla analizado con diferentes técnicas analíticas en varias ocasiones.

Figura 19. Excreción urinaria de hidroxitirosol total de 0 a 6 h en función de la dosis de alcohol.



## Resultados

Figura 20. Excreción de OHTyr total de 0 a 6 h respecto a la dosis de alcohol (con promedio y datos individuales)

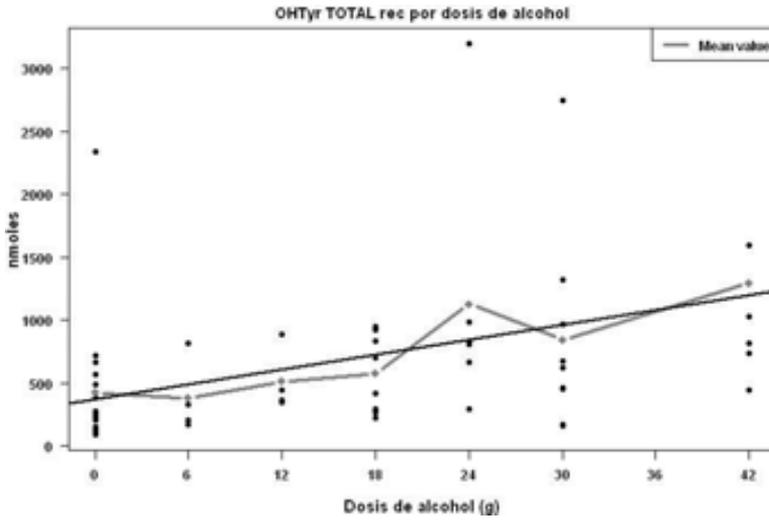
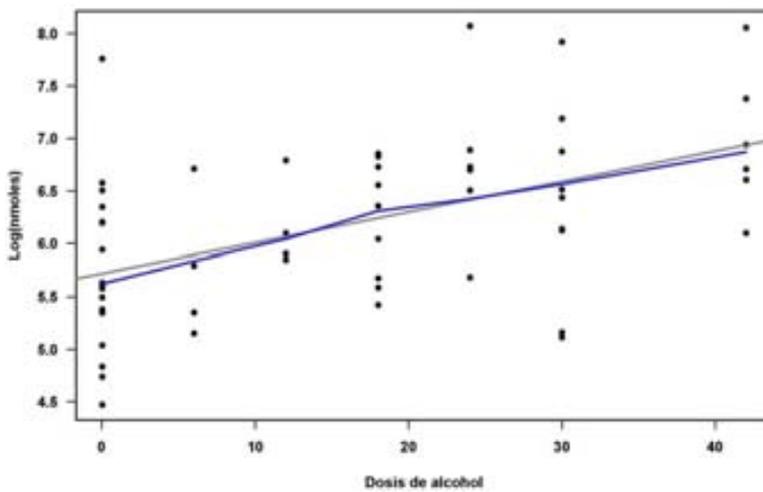


Figura 21. Transformación logarítmica de la ordenada (excreción de OHTyr total de 0-6 h)



## Resultados

Figura 22. Gráficos para comprobar las premisas de normalidad (izquierda y homocedasticidad (derecha) con la ordenada logaritmizada.

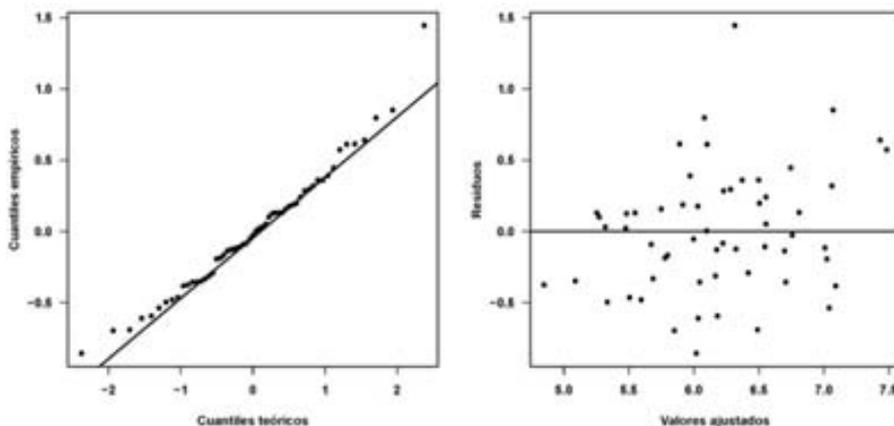


Tabla 27. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	5,774	0,156	37	36,988	<0,001
Dosis alcohol [g]	0,026	0,005	37	4,897	<0,001

Por cada g de alcohol el logaritmo del hidroxitirosol aumenta en 0,026.

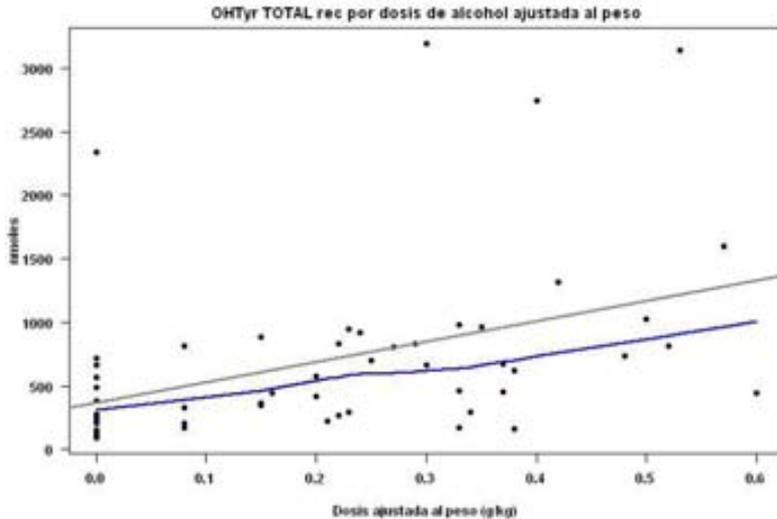
Tabla 28. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol (en escala original).

	Estimación	2,5%	97,5%
0 g	321,76	234,51	441,46
6 g	375,09	281,27	500,22
12 g	437,27	333,28	573,72
18 g	509,76	389,29	667,51
24 g	594,26	448,10	788,09
30 g	692,77	509,23	942,460
42 g	941,48	639,99	1385,05

## Resultados

A continuación se muestran los resultados con la dosis de alcohol ajustada al peso.

Figura 23. Hidroxitirosol en función de la dosis ajustada al peso.



De nuevo el ajuste fue mejor con la ordenada logaritmizada. A continuación se muestran los resultados del modelo con el logaritmo de la variable.

Tabla 29. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	5,771	0.155	37	37,289	<0,001
Dosis [g/kg]	2,053	0.413	37	4,970	<0,001

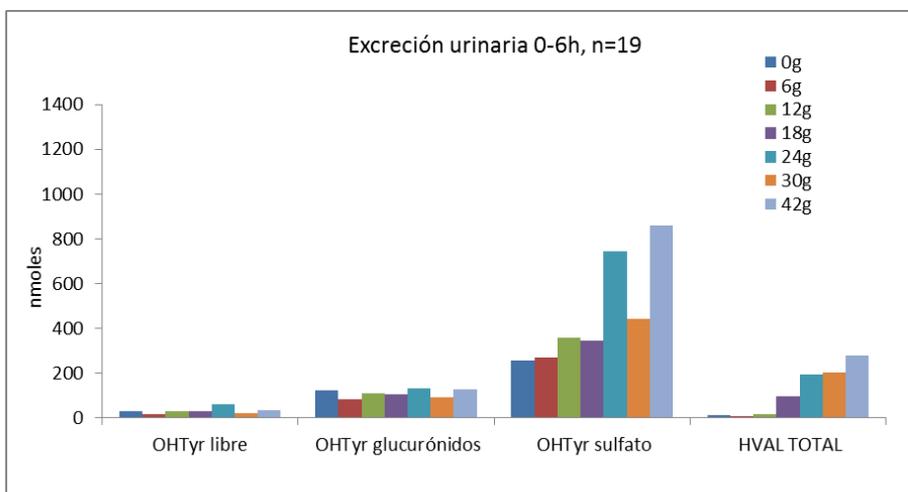
Por cada g/kg de alcohol el log del hidroxitirosol aumenta en 2,053.

## Resultados

Tabla 30. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol ajustada al peso.

	Estimación	2,5%	97,5%
0,1 g/kg	393,91	298,14	520,44
0,2 g/kg	483,66	370,63	631,17
0,3 g/kg	593,87	449,05	785,38
0,4 g/kg	729,18	531,99	999,45
0,5 g/kg	895,32	620,28	1292,31
0,6 g/kg	1099,31	715,87	1688,14

Figura 24. Excreción urinaria de 0 a 6 h del hidroxitirosol libre y conjugado así como de su metabolito principal, el homovanil alcohol (HVAL) total.



Para poder cumplir las condiciones del modelo, del mismo modo que para el hidroxitirosol total, se logaritizaron los valores de todos sus metabolitos y la fracción libre.

## Resultados

### 8.1.6.2. Hidroxitirosol sulfato

Tabla 31. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	3,525	0,656	37	5,373	<0,001
Dosis alcohol [g]	0,060	0,030	37	1,977	0,056

Por cada g de alcohol el logaritmo del hidroxitirosol sulfato aumenta en 0,060. Casi se alcanzó la significación estadística.

Tabla 32. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol.

	Estimación	2,5%	97,5%
0 g	33,95	8,99	128,25
6 g	48,59	16,31	144,70
12 g	69,54	27,14	178,18
18 g	99,52	39,59	250,19
24 g	142,43	50,28	403,51
30 g	203,85	57,79	719,02
42 g	417,53	65,91	2645,19

A continuación se muestra el análisis con la dosis ajustada al peso.

Tabla 33. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	3,472	0,649	37	5,348	<0,001
Dosis [g/kg]	5,028	2,387	37	2,107	0,042

## Resultados

Por cada g/kg de alcohol el logaritmo del hidroxitirosol sulfato aumenta en 5,028.

Tabla 34. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol ajustada al peso.

	Estimación	2,5%	97,5%
0,1 g/kg	53,26	19,22	147,57
0,2 g/kg	88,06	35,73	217,04
0,3 g/kg	145,59	52,08	406,95
0,4 g/kg	240,70	63,70	909,50
0,5 g/kg	397,95	71,53	2213,92
0,6 g/kg	657,94	77,20	5607,16

### 8.1.6.3. Hidroxitirosol libre

Tabla 35. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	2,726	0,348	37	7,838	<0,001
Dosis alcohol [g]	0,008	0,015	37	0,540	0,592

No hay relación entre esta variable y la dosis de alcohol.

### 8.1.6.4. Hidroxitirosol glucurónidos

Tabla 36. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	4,545	0,282	37	16,142	<0,001
Dosis alcohol [g]	-0,007	0,013	37	-0,553	0,584

No hay relación entre esta variable y la dosis de alcohol.

## Resultados

### 8.1.6.5. Homovanil alcohol total

Tabla 37. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	1,379	0,336	37	4,101	<0,001
Dosis alcohol [g]	0,114	0,015	37	7,640	<0,001

Por cada g de alcohol el logaritmo del homovanil alcohol aumenta en 0,184.

Tabla 38. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol.

	Estimación	2,5%	97,5%
0 g	3,97	2,01	7,85
6 g	7,87	4,45	13,90
12 g	15,59	9,46	25,69
18 g	30,89	18,91	50,46
24 g	61,22	35,47	105,67
30 g	121,31	63,41	232,09
42 g	476,36	188,02	1206,89

## Resultados

### 8.1.6.6. Hidroxitirosol basal

El hidroxitirosol basal se analizó en una muestra puntual de orina. Se conoce la concentración pero no la cantidad excretada.

Figura 25. Hidroxitirosol total basal en función de la dosis de alcohol (nmoles/ml). Datos analizados por GC/MS en lugar de LC/MS.

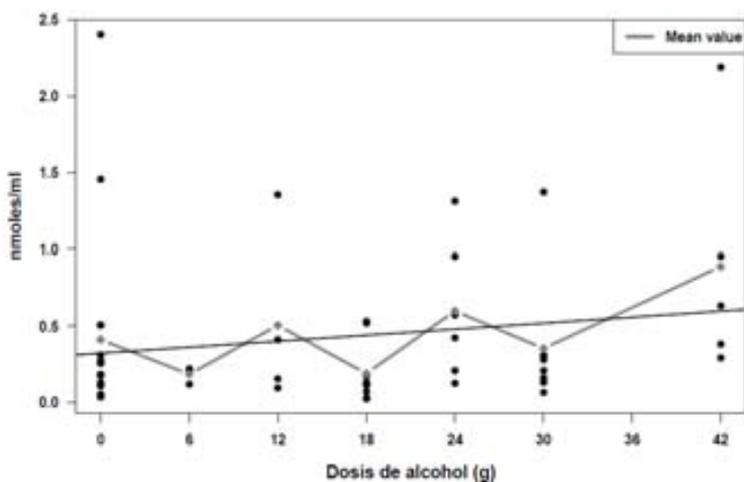


Tabla 39. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	-1,594	0,221	32	-7,204	<0,001
Dosis alcohol [g]	0,013	0,007	32	1,787	0,083

No hay relación entre el hidroxitirosol basal y la dosis de alcohol.

## *Resultados*

### *8.1.6.7. Resumen de hidroxitirosol*

-Se observó una gran variabilidad entre individuos en la excreción de hidroxitirosol total tras la ingesta de alcohol (los CV para las distintas dosis de alcohol oscilaron entre el 49 y 78% y para el placebo fue del 116%). Ver también la dispersión de los puntos en la figura 20.

-El hidroxitirosol total aumentó con la dosis de alcohol administrada. También lo hicieron el hidroxitirosol sulfato y el homovanil alcohol.

El hidroxitirosol se excretó en orina principalmente conjugado con sulfato en lugar de ácido glucurónico (diferencia notable con el aceite de oliva, en que se excreta principalmente glucuronizado).

-En el caso del hidroxitirosol libre y el hidroxitirosol glucurónido no se observó relación con la dosis de alcohol administrada. La cantidad de hidroxitirosol excretada en la forma libre fue muy pequeña.

-Con los análisis de muestras basales realizados no se puede descartar una transgresión dietética por parte de alguno de los sujetos. Sin embargo, como todos refirieron buen cumplimiento de las restricciones (alcohol, aceite) y las alcoholemias fueron todas negativas al inicio de las sesiones, se decidió no excluir a ninguno de los análisis.

-El alcohol no contiene hidroxitirosol y la cantidad excretada sin intervención es mínima (ver grupo placebo o 0 g) por lo que se deduce que el hidroxitirosol detectado en orina se generó de forma endógena.

## Resultados

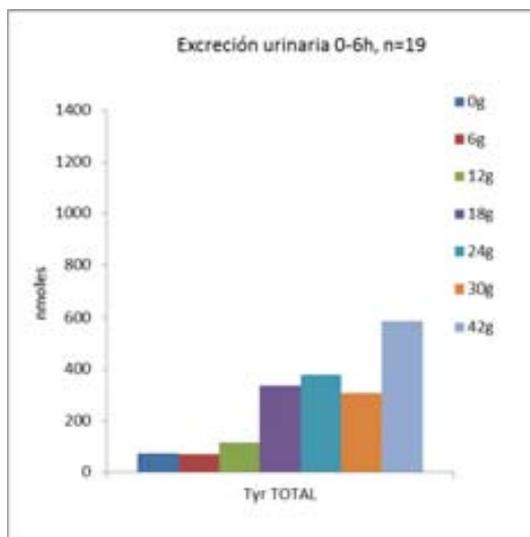
### 8.1.7. Excreción urinaria de tirosol

Tabla 40. Análisis descriptivo del tirosol (nmoles) por LC/MS.

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
0 g	19	5	91,0	95,7	74,9	9,21	435
6 g	4	2	69,9	56,6	52,7	24,17	150
12 g	4	2	115,4	113,3	72,5	37,57	279
18 g	9	3	335,4	719,5	96,6	28,18	2247
24 g	6	0	378,4	257,0	281,4	122,12	721
30 g	9	3	307,1	279,7	261,7	110,33	1002
42 g	6	0	586,2	427,9	432,3	246,60	1368

Los sujetos con datos perdidos se deben a la falta de muestra tras el análisis repetido de la misma con diferentes técnicas analíticas.

Figura 26. Excreción de tirosol de 0 a 6 h en función de la dosis de alcohol.



## Resultados

Figura 27. Excreción de tirosol de 0 a 6 h en función de la dosis de alcohol (promedio y datos individuales)

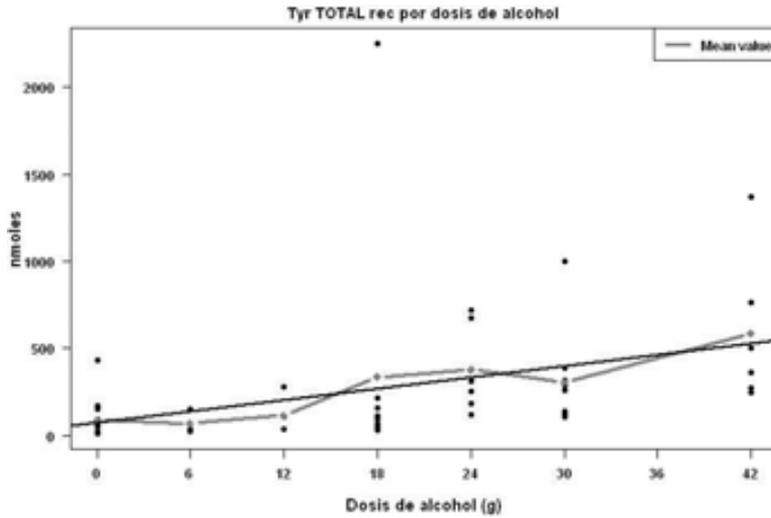
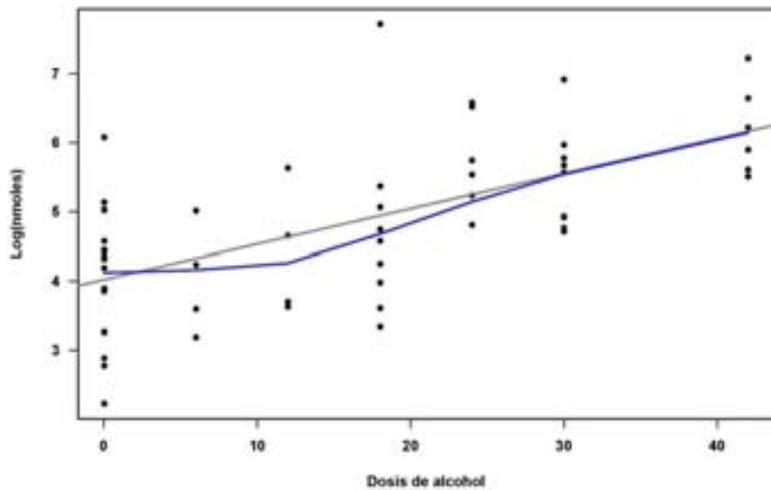


Figura 28. Transformación logarítmica de la ordenada (excreción de Tyr total de 0-6 h).



## Resultados

Figura 29. Gráficos para comprobar las premisas de normalidad (izquierda) y homocedasticidad (derecha).

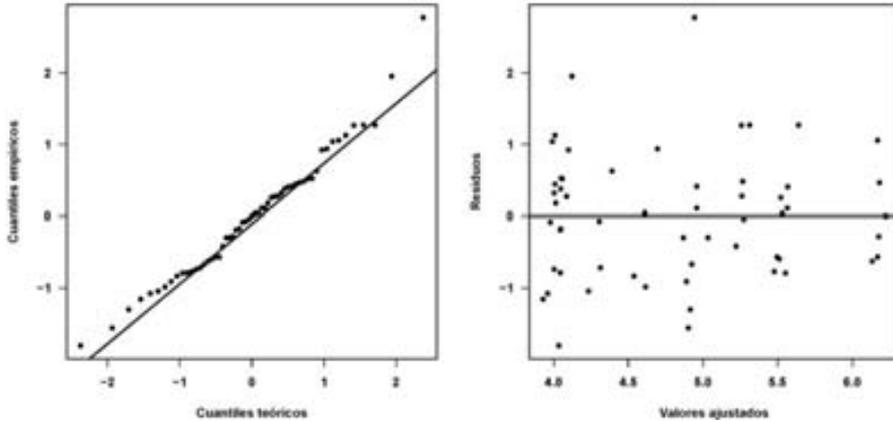


Tabla 41. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	4,027	0,181	37	22,220	<0,001
Dosis alcohol [g]	0,051	0,008	37	6,044	<0,001

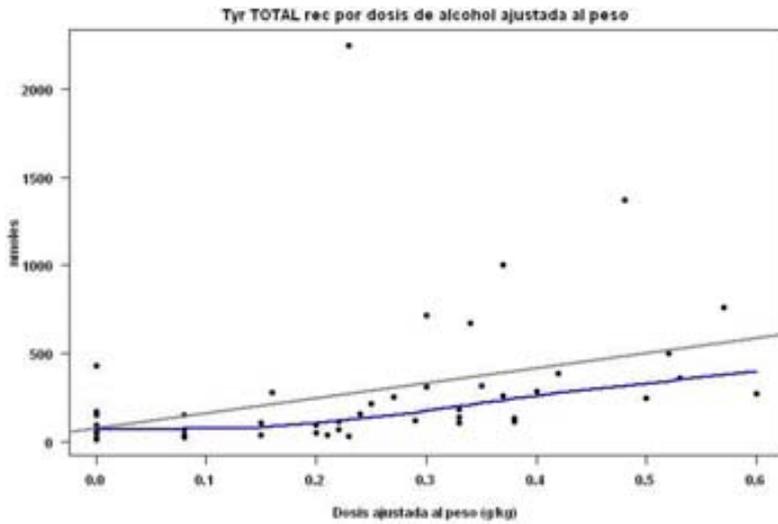
Por cada g de alcohol el logaritmo del tirosol aumenta en 0,051.

Tabla 42. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol.

	Estimación	2,5%	97,5%
0 g	56,09	38,85	80,98
6 g	75,98	56,22	102,68
12 g	102,93	79,42	133,41
18 g	139,44	108,16	179,77
24 g	188,89	141,73	251,75
30 g	255,88	180,65	362,45
42 g	469,58	281,80	782,47

## Resultados

Figura 30. Tirosol en función de la dosis ajustada al peso.



De nuevo se logaritizó la variable para cumplir las condiciones del modelo.

Tabla 43. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	4,017	0,177	37	22,631	<0,001
Dosis [g/kg]	4,084	0,662	37	6,170	<0,001

Por cada g/kg de alcohol el logaritmo del tirosol aumenta en 4,084.

## Resultados

Tabla 44. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol ajustada al peso.

	Estimación	2,5%	97,5%
0,1 g/kg	83,54	63,40	110,07
0,2 g/kg	125,67	98,61	160,15
0,3 g/kg	189,05	143,12	249,72
0,4 g/kg	284,40	197,73	409,06
0,5 g/kg	427,83	266,87	685,86
0,6 g/kg	643,60	356,40	1162,24

### 8.1.7.1. Resumen de tirosol

-La dosis de alcohol se relacionó con la excreción urinaria de tirosol de 0 a 6 h, de modo que a más dosis mayor cantidad en orina de este fenol.

-Los nmoles de tirosol excretados fueron de 2 a 5 veces inferiores a los de hidroxitirosol.

-Dado que el alcohol no contiene tirosol y que la cantidad presente en el cuerpo sin intervención es mínima (ver grupo placebo o 0 g) el tirosol detectado en orina se generó de forma endógena.

-De nuevo se apreció gran variabilidad entre individuos en la excreción de tirosol para una misma dosis (los CV oscilaron entre el 67 y 214%, CV=104% para el placebo).

## Resultados

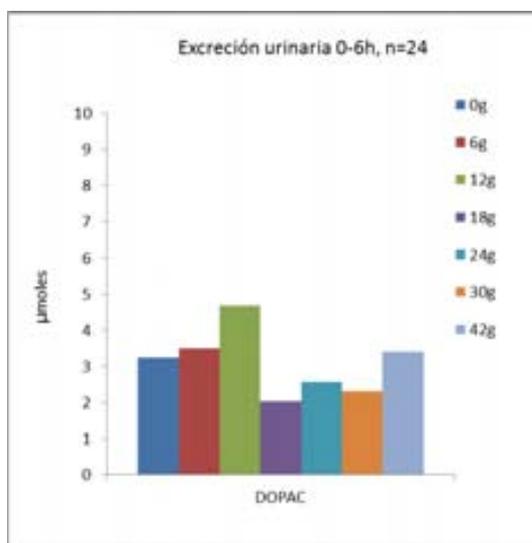
### 8.1.8. Excreción urinaria de DOPAC, HVA y razón DOPAC/OHTyr

#### 8.1.8.1 Ácido 3-4-dihidroxiifenilacético (DOPAC)

Tabla 45. Análisis descriptivo del DOPAC (nmoles)

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
0 g	24	0	3239	2126	2206	292	7803
6 g	6	0	3484	2419	2776	1635	8330
12 g	6	0	4688	3487	4111	616	10666
18 g	12	0	2024	1110	1836	373	4793
24 g	6	0	2559	1142	2319	1223	4296
30 g	12	0	2190	827	2040	1118	3745
42 g	6	0	3393	1707	3001	1794	6088

Figura 31. Excreción de DOPAC de 0 a 6 h en función de la dosis de alcohol.



## Resultados

Tabla 46. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	3169,292	381,713	47	8,303	<0,001
Dosis alcohol [g]	-14,024	12,989	47	-1,080	0,286

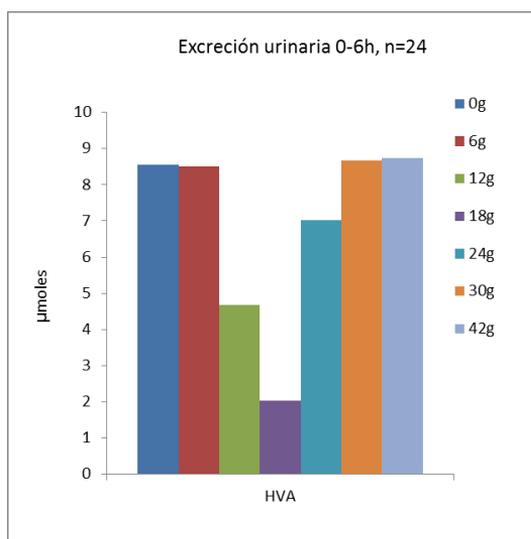
No hubo relación entre la dosis de alcohol y la excreción de DOPAC.

### 8.1.8.2. Ácido homovanílico (HVA)

Tabla 47. Análisis descriptivo del ácido homovanílico (nmoles).

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
0 g	24	0	8548	4907	7921	41	21413
6 g	6	0	8501	2008	8205	6374	10899
12 g	6	0	7598	830	7705	6464	8696
18 g	12	0	7232	3729	8081	52	12166
24 g	6	0	7375	2015	6854	4923	10501
30 g	12	0	8223	3809	7691	50	15851
42 g	6	0	8749	1787	8575	6702	11050

Figura 32. Excreción urinaria de ácido homovanílico de 0 a 6 h.



## Resultados

Tabla 48. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros

No hubo relación entre la dosis de alcohol y la excreción de HVA.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	8381,071	701,031	47	11,955	<0,001
Dosis alcohol [g]	-18,035	26,434	47	-0,682	0,498

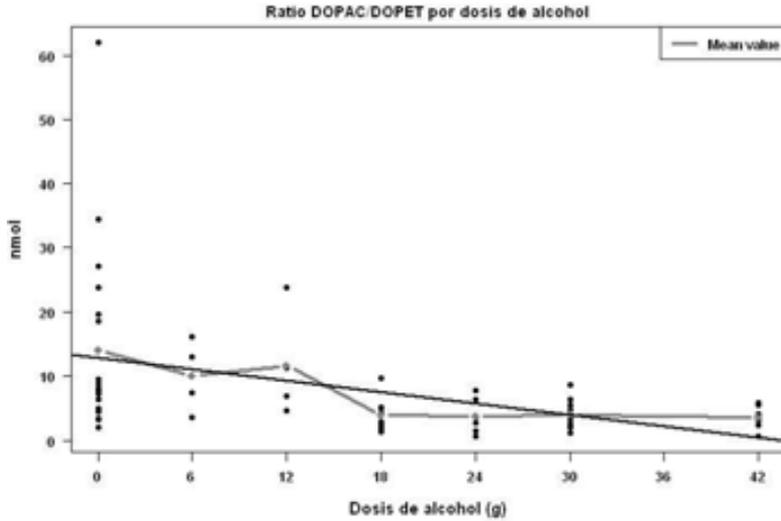
### 8.1.8.3. Razón DOPAC/OHTyr

Tabla 49. Análisis descriptivo de la razón DOPAC/OHTyr

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
0 g	19	5	14,04	14,68	7,96	2,076	61,96
6 g	4	2	10,08	5,64	10,28	3,557	16,20
12 g	4	2	11,67	8,66	9,09	4,555	23,96
18 g	9	3	3,89	2,55	2,84	1,276	9,63
24 g	6	0	3,78	2,83	3,17	0,533	7,82
30 g	9	3	4,04	2,46	3,21	1,097	8,59
42 g	6	0	3,57	1,98	3,51	0,632	5,90

## Resultados

Figura 33. Razón DOPAC/OHTyr de 0 a 6 h en función de la dosis de alcohol.



En este caso también se decidió logaritmizar la variable para aplicar el modelo.

Tabla 50. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	2,133	0,172	37	12,381	<0,001
Dosis alcohol [g]	-0,030	0,006	37	-4,726	<0,001

Por cada g de alcohol se reduce el log de la razón en 0,030.

## Resultados

Tabla 51. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol.

	Estimación	2,5%	97,5%
0 g	8,44	5,95	11,97
6 g	7,05	5,17	9,62
12 g	5,89	4,42	7,86
18 g	4,92	3,70	6,55
24 g	4,11	3,04	5,56
30 g	3,43	2,45	4,81
42 g	2,40	1,54	3,72

## *Resultados*

### *8.1.8.4. Resumen de DOPAC, HVA, razón DOPAC/OHTyr*

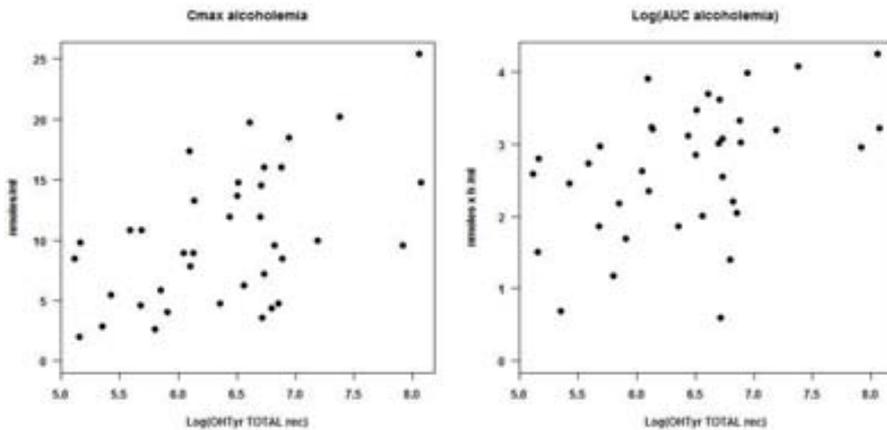
-La dosis de alcohol no se relacionó con la excreción urinaria de DOPAC ni la de HVA. Ambos compuestos son intermediarios en el metabolismo de la dopamina y se encuentran en cantidades elevadas en el cuerpo de forma basal, a diferencia del hidroxitirosol. En el grupo placebo por ejemplo, se detectó 7 veces más DOPAC en orina de 0 a 6 h que OHTyr.

-En cuanto a la razón DOPAC/OHTyr a medida que se administró más cantidad de alcohol se observó una disminución de la razón. La disminución de la razón se produjo principalmente a expensas de un aumento del OHTyr.

### 8.1.9. Correlación entre hidroxitirosol, alcohol, tirosol y DOPAC

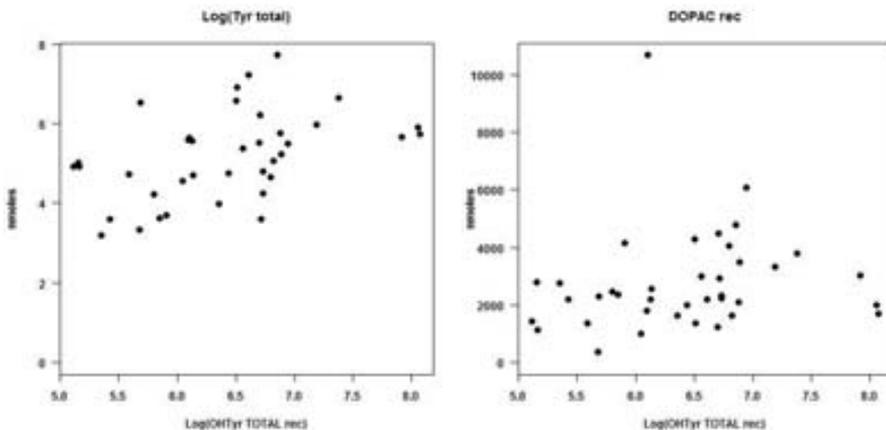
Se observó una correlación positiva moderada estadísticamente significativa entre la  $C_{max}$  de la alcoholemia de 0 a 6 h y la excreción de hidroxitirosol de 0 a 6 h ( $r=0,529$ ,  $p=0,005$ ). También entre el AUC de la alcoholemia y la excreción de hidroxitirosol ( $r=0,445$ ,  $p=0,025$ ).

Figura 34. Correlaciones entre hidroxitirosol y alcoholemia



Por otro lado el hidroxitirosol excretado se correlacionó positivamente con el tirosol excretado ( $r=0,452$ ,  $p=0,014$ ) pero no con el DOPAC ( $r=0,146$ ,  $p=0,084$ ).

Figura 35. Correlaciones entre OHTyr yTyr, y entre OHTyr y DOPAC.



#### **8.1.10. Constantes vitales**

Para ninguna de las constantes vitales (FC, PAS, PAD y temperatura) evaluadas se observó relación con la dosis de alcohol. Ni para la  $E_{max}$ , el AUC ni el curso temporal.

#### **8.1.11. Acontecimientos adversos**

A lo largo del estudio se recogieron 26 acontecimientos adversos (AA) en 14 voluntarios. El AA más prevalente fue la cefalea (11 casos). Todos ellos fueron leves, exceptuando un mareo e inestabilidad a la marcha que fueron de intensidad moderada. No se comunicó ningún acontecimiento adverso grave y/o inesperado.

La mitad de los AA se consideró que podían estar relacionados con el tratamiento. Concretamente todas las cefaleas reportadas varias horas después de la administración (10 casos), unas náuseas, un mareo y una inestabilidad de la marcha. Estos tres últimos efectos adversos los presentó el mismo voluntario de forma autolimitada con la dosis de 42 g. Ninguno de los voluntarios vomitó la bebida administrada.

Las cefaleas reportadas al mediodía o por la tarde eran probablemente un síntoma de resaca al beber en ayunas a primera hora de la mañana. Se puede concluir que en general las distintas dosis de alcohol fueron bien toleradas.

Algunos voluntarios tuvieron dificultades para ingerir la dosis de 42 g porque estaba muy concentrada y comentaron que tenía mal sabor.



## **8.2. RESULTADOS ESTUDIO DOPET 2**

### **8.2.1. Características demográficas basales**

En este estudio, contando los pilotos y el estudio definitivo, participaron 40 voluntarios de sexo masculino. Su edad, peso e IMC promedio  $\pm$  DE fueron  $26,35 \pm 3,87$  años,  $73,77 \pm 7,34$  kg, y  $23,72 \pm 1,90$  kg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Ninguno de los participantes era fumador y todos ellos consumían alcohol de forma regular, un promedio de 7,1 UBE a la semana.

La cohorte 1 es el piloto 1, la cohorte 3 es el piloto 3 y la cohorte 2 es el estudio definitivo (incluye los seis sujetos del piloto 2).

No hubo diferencias en las características demográficas entre las distintas cohortes. La dosis de alcohol ajustada al peso de los individuos fue de 0,40 g/kg en la cohorte 1 (30 g alcohol), 0,21 g/kg en la cohorte 2 y 0,20 g/kg en la cohorte 3 (ambas con 15 g de alcohol).

### 8.2.2. Características basales de las principales variables del estudio

En la siguiente tabla se muestran los valores basales para las variables de interés de la cohorte 2 (estudio definitivo). Esta cohorte es la que tiene mayor número de sujetos y por tanto, la más representativa. Estos valores corresponden a las determinaciones pre-administración de la sesión 1 para cada sujeto.

Tabla 52 .Características basales cohorte 2, n=28.

<b>Variable</b>	<b>Media ± DE</b>
PAS, mmHg	118,0 ± 8,7
PAD, mmHg	68,0 ± 6,3
FC, lpm	60,3 ± 9,4
Glucosa, mg/dl	87,7 ± 4,7
Colesterol total, mg/dl	160,2 ± 29,7
Colesterol HDL, mg/dl	44,1 ± 6,8
Colesterol LDL mg/dl	99,8 ± 27,1
LDL oxidada, U/l	36,7 ± 8,5
Triglicéridos, mg/dl	81,2 ± 31,9
PCR, mg/dl	0,04 ± 0,03
TBARS, μmoles/l	3,4 ± 2,0
Tirosol total, nmoles	40,7 ± 29,9
Hidroxitirosol total, nmoles	297,2 ± 304,0

No se observaron diferencias en la cantidad de hidroxitirosol y tirosol excretadas de -2 h a 0 h en la sesión 1 para las distintas condiciones de tratamiento (con las variables logaritmizadas,  $p=0,672$  y  $p=0,981$  para el hidroxitirosol y el tirosol respectivamente con ANOVA de un 1 factor). Lo mismo sucedió para el resto de variables de la tabla.

### **8.2.3. Contenido en fenoles de los vinos**

En la tabla 53 se muestran las concentraciones en los distintos vinos de tirosol, hidroxitirosol, y sus potenciales precursores (tirosina y tiramina). A su vez se ha calculado la dosis de estos compuestos para cada una de las cohortes. También incluye los mismos datos para un estudio previo realizado con aceite de oliva virgen (VOO), con el que se van a comparar los resultados de los estudios con vino (Kymeneths 2010).

Las dosis de tirosol e hidroxitirosol administradas con el vino de 0<sup>o</sup> y el de 13<sup>o</sup> fueron prácticamente idénticas. Esto también sucedió para la tirosina y tiramina. En la cohorte 1, como el volumen administrado fue el doble que en las otras dos cohortes, las dosis de los distintos compuestos administradas con el vino también fueron del doble.

El VOO tenía concentraciones muy superiores de hidroxitirosol que el vino (67,6 mg/l vs. 1,2 mg/l). En el estudio con aceite se administraron 50 ml, correspondientes a 22  $\mu$ moles.

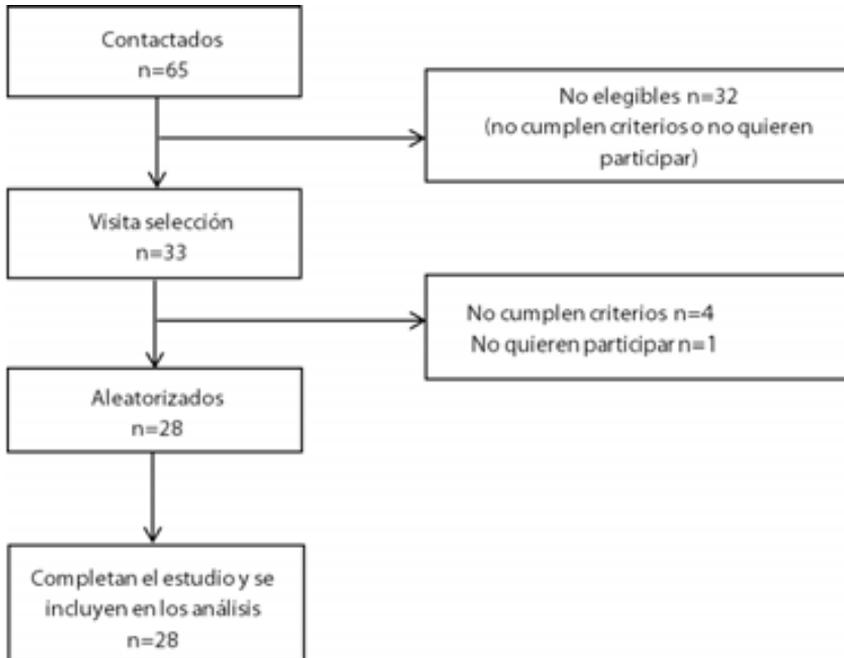
Tabla 53. Contenido en fenoles, tirosina y tiramina de los vinos y dosis administrada en cada cohorte.

Condición	Concentración (mg/l)				Volumen (l)	Dosis mg (μmoles)			
	OHTyr	Tyr	Tirosina	Tiramina		OHTyr	Tyr	Tirosina	Tiramina
Vino 0° (cohorte 2,3)	1,2	3,6	1,9	3,7	0,147	0,2(1,1)	3,5(25,1)	0,3(1,5)	0,5(3,9)
Vino 0° (cohorte 1)	1,2	3,6	1,9	3,7	0,293	0,3(2,3)	6,9(50,0)	0,6(3,0)	1,1(7,9)
Vino 13° (cohorte 2,3)	1,1	0,7	3,9	2,9	0,147	0,2(1,0)	3,0(22,0)	0,6(3,2)	0,4(3,1)
Vino 13° (cohorte 1)	1,1	0,7	3,9	2,9	0,293	0,3(2,1)	6,1(43,9)	1,1(6,3)	0,8(6,2)
VOO	67,6	2,0			0,050	3,4(22,0)	2,1 (15,2)		

### 8.2.4. Diagrama de flujo de los participantes

A continuación se muestra el diagrama de flujo de los participantes para la cohorte más representativa, la 2. Al tratarse de un estudio en voluntarios sanos en el que se administraron dosis bajas de alcohol, no hubo complicaciones y todos los sujetos que fueron aleatorizados completaron el estudio.

Figura 36. Diagrama de flujo de los participantes de la cohorte 2 (definitivo)

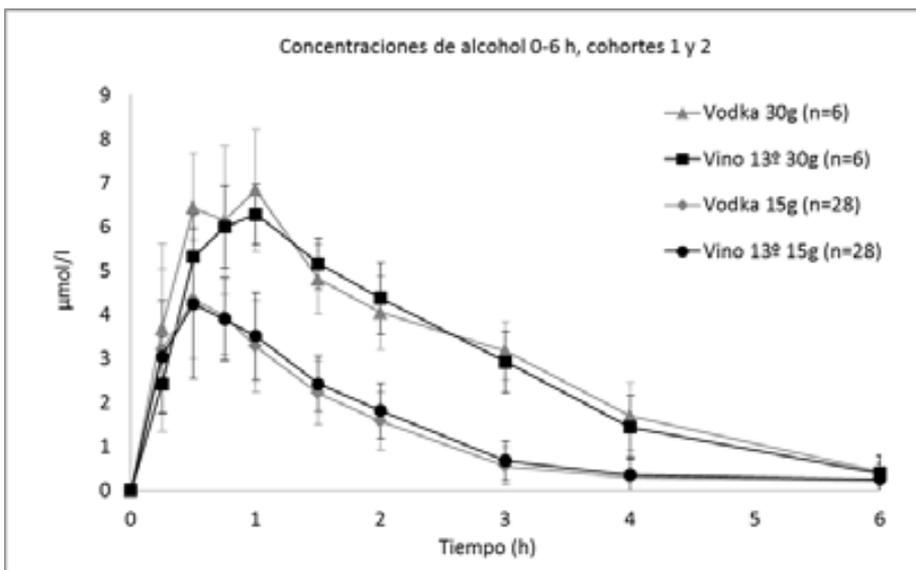


### 8.2.5. Concentraciones de alcohol en sangre

No se observaron diferencias en las concentraciones de alcohol a lo largo del tiempo para la condición vino y la condición vodka en cada una de las cohortes.

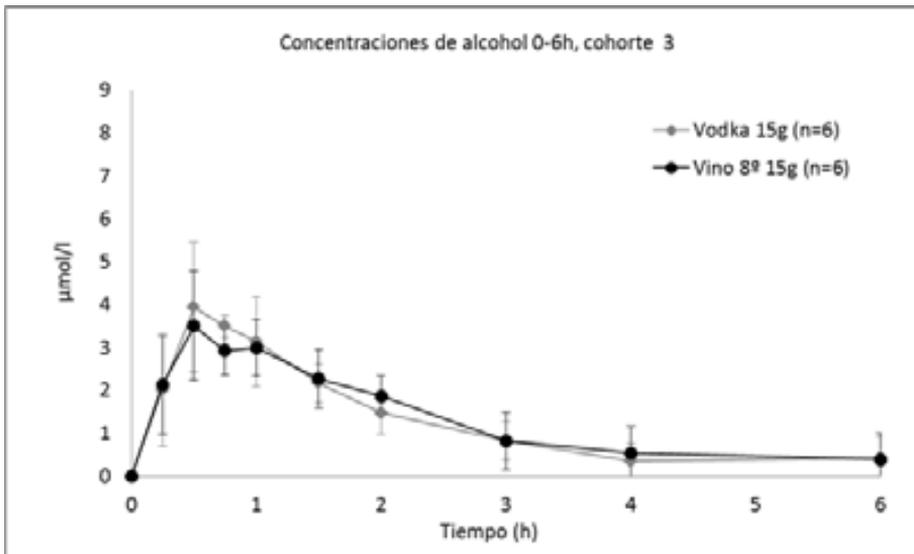
A continuación se muestran las alcoholemias en las tres cohortes.

Figura 37. Alcoholemias en las cohortes 1 y 2.



## Resultados

Figura 38. Alcoholemias en la cohorte 3.



Tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros cinéticos calculados entre ambas bebidas alcohólicas.

Como era de esperar tanto el AUC como la  $C_{\text{max}}$  fueron alrededor del doble con 30 g que con 15 g de alcohol (entre 1,5 y 2,5 veces según cohorte y condición).

## Resultados

Tabla 54. Parámetros cinéticos alcoholemia y resultados estadísticos

Condición Estudio	Vodka	Vino	t-Student	
	Media ± DE*	Media ± DE*	t (gl)*	p
<i>Cohorte 1 (30 g, vino 13º)</i>				
$C_{max}$ (µmol/l)	7,78 ± 1,37	6,73 ± 0,70	-2,282 (5)	0,071
AUC (µmol x h/l)	18,25 ± 3,05	17,17 ± 2,86	-0,864 (5)	0,427
$t_{max}$ (h)	0,63 (0,25-1)	0,88 (0,5-1)	-1,069	0,285
<i>Cohorte 2 (15 g, vino 13º)</i>				
$C_{max}$ (µmol/l)	4,84 ± 1,17	4,69 ± 1,61	-0,586 (27)	0,563
AUC (µmol x h/l)	7,65 ± 2,03	8,20 ± 1,98	1,636 (27)	0,113
$t_{max}$ (h)	0,50 (0,25-1)	0,63 (0,25-1)	-1,348	0,178
<i>Cohorte 3 (15 g, vino 8º)</i>				
$C_{max}$ (µmol/l)	4,63 ± 1,02	3,83 ± 0,85	-2,271 (5)	0,072
AUC (µmol x h/l)	7,56 ± 1,40	7,86 ± 2,20	-0,324 (5)	0,759
$t_{max}$ (h)	0,63 (0,50-0,75)	0,50 (0,50-0,75)	-1,342	0,180

\*Para la  $t_{max}$  los valores corresponden a la mediana, max, min y el resultado del test de Wilcoxon (valor de z y p).

## *Resultados*

### *8.2.5.1 Comparación entre las cohortes*

Se hicieron comparaciones entre cohortes de los parámetros cinéticos de la borrachera para las bebidas alcohólicas mediante un análisis de la varianza y comparaciones dos a dos ajustadas por Tukey. En la cohorte 1 con 30 g el AUC y  $C_{\max}$  fueron superiores que con las otras dos cohortes, entre las que no se apreciaron diferencias ( $F=60,186$ ,  $gl=2$ ,  $p<0,001$  para el AUC y  $F=15,741$ ,  $gl=2$ ,  $p<0,001$  para  $C_{\max}$ . Las comparaciones posthoc entre cohorte 2 y 1 o 3 tuvieron  $p<0,001$ ).

### **8.2.6. Concentraciones de alcohol en aire espirado**

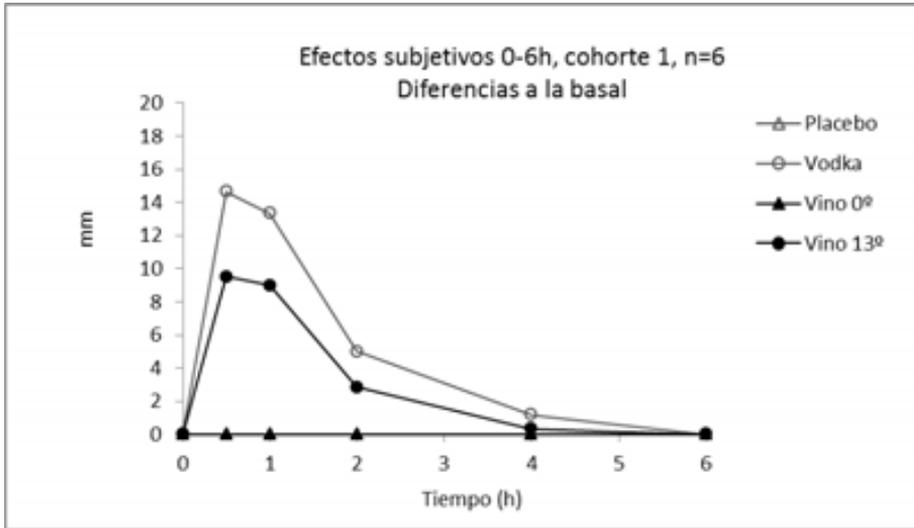
No se observaron diferencias entre las dos bebidas alcohólicas en las concentraciones de alcohol en aire espirado en las dos primeras cohortes. Las concentraciones para la cohorte 1 fueron  $0,26 \pm 0,06$  mg/l para el vodka y  $0,23 \pm 0,05$  mg/l para el vino. En la cohorte 2 fueron  $0,14 \pm 0,04$  mg/l para el vodka y  $0,14 \pm 0,05$  mg/l para el vino. En la tercera cohorte las concentraciones fueron ligeramente superiores con el vodka ( $0,14 \pm 0,03$ ) que con el vino ( $0,10 \pm 0,04$ );  $t=7,746$  (5),  $p=0,001$ .

Las concentraciones de alcohol en aire espirado a los 30 minutos se correlacionaron positivamente con las concentraciones en sangre correspondientes ( $n=40$ ,  $r^2=0,754$  para el vodka y  $r^2=0,662$  para el vino;  $p < 0,001$ ).

### 8.2.7. Efectos subjetivos

En las siguientes figuras se muestran los efectos subjetivos obtenidos en cada una de las cohortes.

Figura 39. Sensación de borrachera en la cohorte 1 con 30 g de alcohol.



## Resultados

Figura 40 .Sensación de borrachera en la cohorte 2 con 15 g de alcohol.

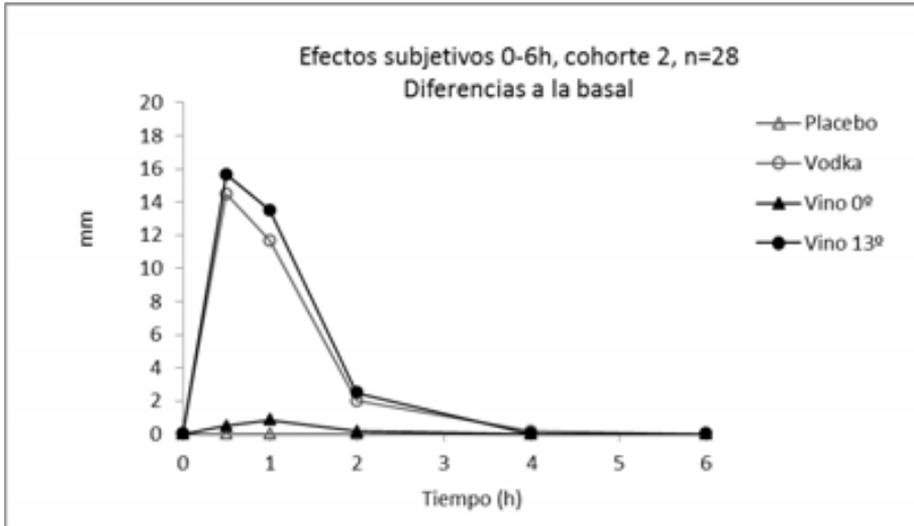
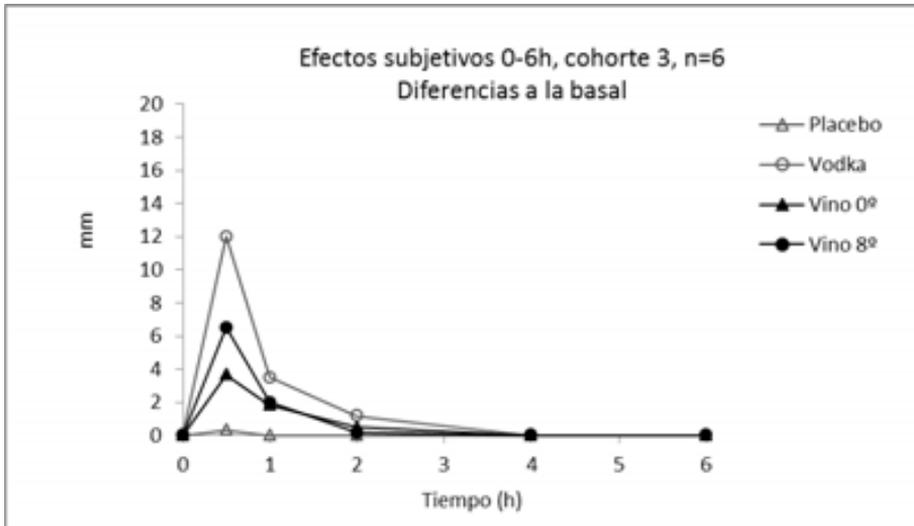


Figura 41. Sensación de borrachera cohorte 3 con 15 g de alcohol.



## *Resultados*

La sensación de borrachera con las dosis administradas de 15 y 30 g de etanol fue leve en los tres estudios ( $<20$  mm). Los efectos desaparecieron a las 4 h tras la administración. Se apreció mucha variabilidad intersujetos en los efectos. Este hecho también puede explicar porque los sujetos que recibieron 30 g no mostraron mayores efectos que los de 15 g.

Tanto para el curso temporal como para los distintos parámetros cinéticos no se observaron diferencias entre las dos bebidas alcohólicas ni entre las dos bebidas sin alcohol. El vino desalcoholizado produjo efectos mínimos en 6 de 40 sujetos, todos ellos en las cohortes con 15 g.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los análisis para las diferentes cohortes.

Tabla 55. Parámetros de los efectos (borrachera) del alcohol y resultados estadísticos.

Condición Estudio	Placebo Media ± DE*	Vodka Media ± DE*	Vino 0° Media ± DE*	Vino Media ± DE*	ANOVA p	Tukey 2 a 2
<i>Cohorte 1 (30 g)</i>						
E <sub>max</sub> (mm)	0 ± 0	18,33 ± 11,25	0 ± 0	12,67 ± 10,25	<0,001	P-E; p-v; d-v; D-E
AUC (mm x h)	0 ± 0	27,16 ± 15,96	0 ± 0	16,42 ± 9,71	<0,001	P-E,V; D-V,E
t <sub>max</sub> (h)	0	1 (0,5-4)	0	1 (0,5-1)	0,001	
<i>Cohorte 2 (15 g)</i>						
E <sub>max</sub> (mm)	0 ± 0	13,57 ± 12,17	0,89 ± 3,31	12,54 ± 14,06	<0,001	P-E,V; D-V, E
AUC (mm x h)	0 ± 0	15,37 ± 16,90	0,71 ± 2,47	14,27 ± 17,92	<0,001	P-E,V; D-V, E
t <sub>max</sub> (h)	0	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	0 (0-1)	<0,001	P-E,V; D-V, E
<i>Cohorte 3 (15 g)</i>						
E <sub>max</sub> (mm)	0,33 ± 0,82	12,0 ± 16,48	3,6 ± 5,99	6,5 ± 7,0	0,222	P-E,V; D-V, E
AUC (mm x h)	0,17 ± 0,41	10,38 ± 17,18	4,0 ± 6,25	5 ± 4,76	0,359	P-E,V; D-V, E
t <sub>max</sub> (h)	0 (0-0,5)	0,25 (0-0,5)	0 (0-0,5)	0,5	0,008	

P:placebo, E:vodka, D:vino desalcoholizado, V:vino. Letras mayúsculas p<0,01, minúsculas p<0,05.. \*Para la t<sub>max</sub> mediana, max, min y el resultado del test de Friedman (Wilcoxon 2 a 2 para las comparaciones múltiples).

#### *8.2.7.1 Comparación entre cohortes*

Se hicieron comparaciones entre cohortes de los parámetros cinéticos de la borrachera para las bebidas alcohólicas mediante un análisis de la varianza. No se observaron diferencias entre ellos.

#### **8.2.8. Correlación entre efectos y concentraciones**

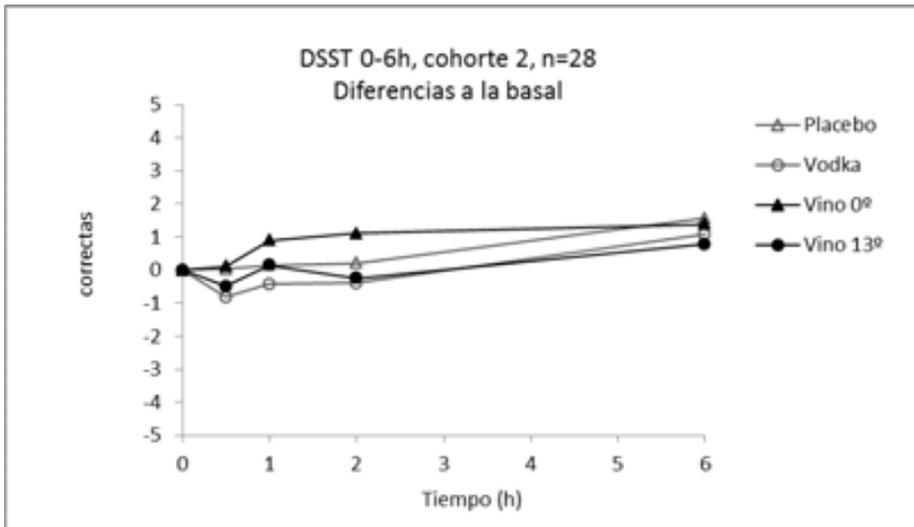
En la cohorte 2 el AUC de la borrachera de 0 a 6 h no se correlacionó con el AUC de la alcoholemia de 0 a 6h para ambas bebidas alcohólicas ( $r=0,155$   $p=0,255$ ) pero sí la  $C_{max}$  con la  $E_{max}$  ( $r=0,355$ ,  $p=0,007$ ), aunque débilmente.

### 8.2.9. Rendimiento psicomotor

No se observaron diferencias en el rendimiento psicomotor medido mediante el DSST (número de respuestas correctas) entre las 4 condiciones de tratamiento de la cohorte 2. Como se puede observar en la figura siguiente los 4 tratamientos en promedio no llegaron en ningún momento a presentar una variación superior a 2 respuestas correctas respecto a la basal.

El promedio de respuestas correctas basales fue 57,8 para el placebo, para el vodka 58, para el vino 0 58 y para el vino 13 57,3.

Figura 42. Rendimiento psicomotor (número de respuestas correctas en el DSST) en la cohorte 2.



## *Resultados*

### *8.2.9.1. Resumen de efectos subjetivos y rendimiento psicomotor*

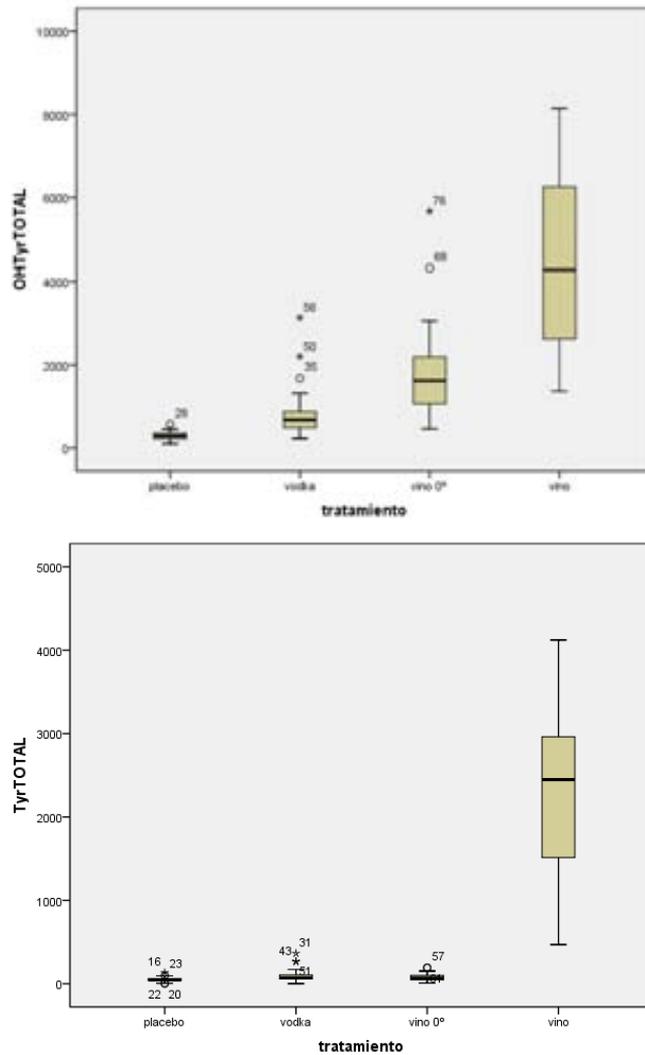
La sensación de borrachera con 15 o 30 g de alcohol fue leve y hubo una gran variabilidad entre individuos (en la cohorte 2 CV Emax 90% con el vodka y 79% con el vino). La administración de 15 g de alcohol en forma de vino o vodka no alteró el rendimiento psicomotor.

## Resultados

### 8.2.10. Excreción urinaria de hidroxitirosol y tirosol

En la figura siguiente se muestra el boxplot para OHTyr total y Tyr total para cada tratamiento. No se cumplía normalidad en el OHTyr según la prueba de Kolmogorov excepto para el placebo, mientras que para el Tyr fue justo al contrario.

Figura 43. Diagramas de caja (box plots) OHTyr y Tyr por tratamiento.



## Resultados

Teniendo en cuenta que al realizar el análisis de la varianza de medidas repetidas tampoco se cumplía esfericidad en estas variables se decidió logaritmizarlas.

En las siguientes figuras (media  $\pm$  EE) se puede observar la excreción de los distintos fenoles para cada una de las cohortes. También se han representado las diferentes fracciones que constituyen el hidroxitirosol total (OHTyr sulfato, OHTyr glucuronidos, OHTyr libre y HVAL total).

Figura 44. Excreción de fenoles de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g.

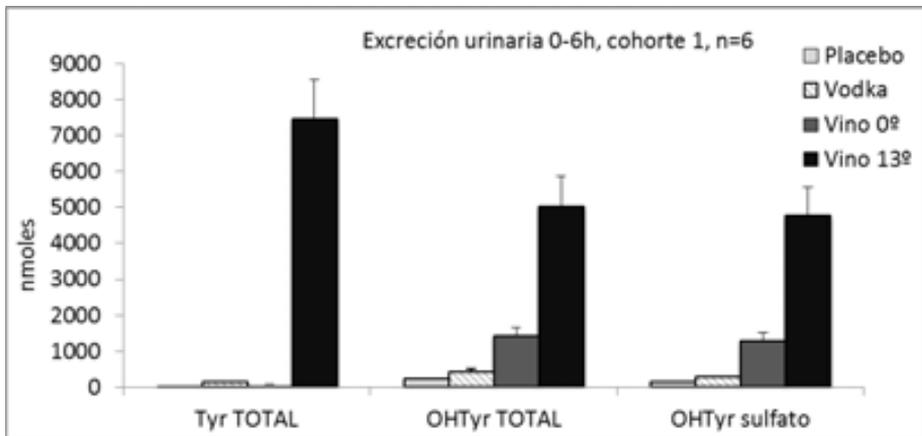
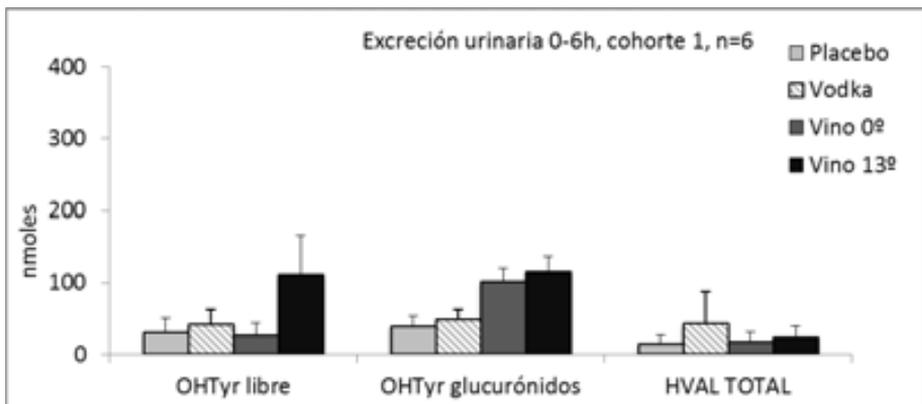


Figura 45. Excreción de hidroxitirosol libre, glucuronizado y HVAL en la cohorte 1, 30 g.



## Resultados

Figura 46. Excreción de fenoles de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.

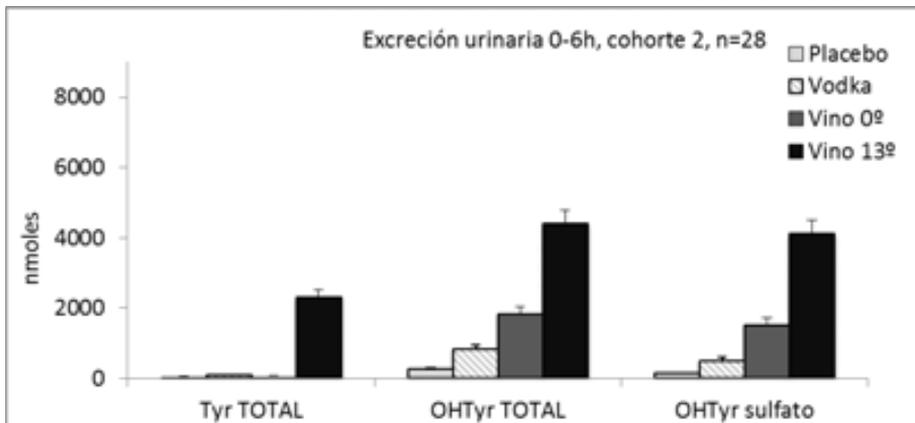
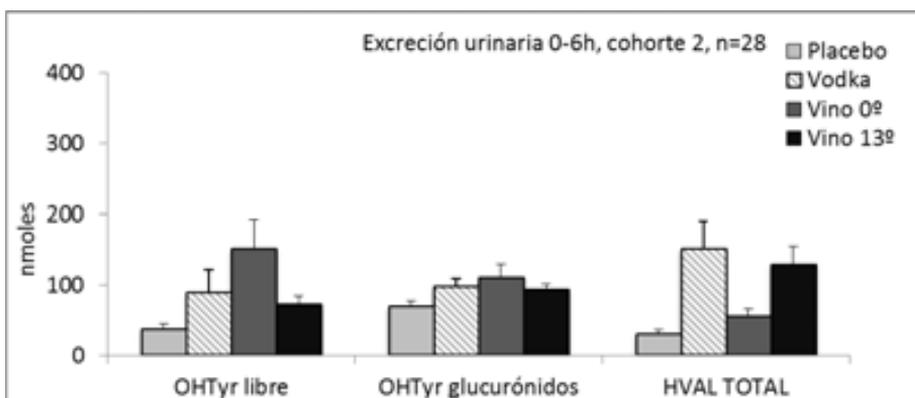


Figura 47. Excreción de hidroxitirosol libre, glucuronizado y HVAL en la cohorte 2, 15 g.



## Resultados

Figura 48. Excreción de fenoles de 0 a 6 h en la cohorte 3, 15 g.

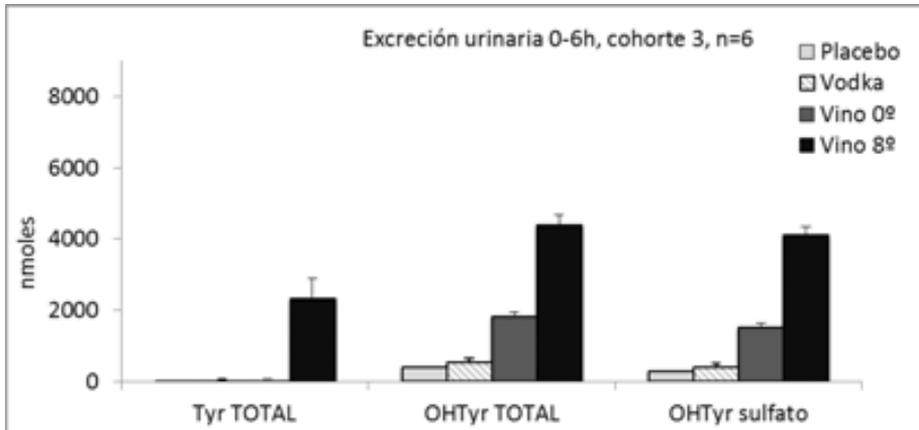
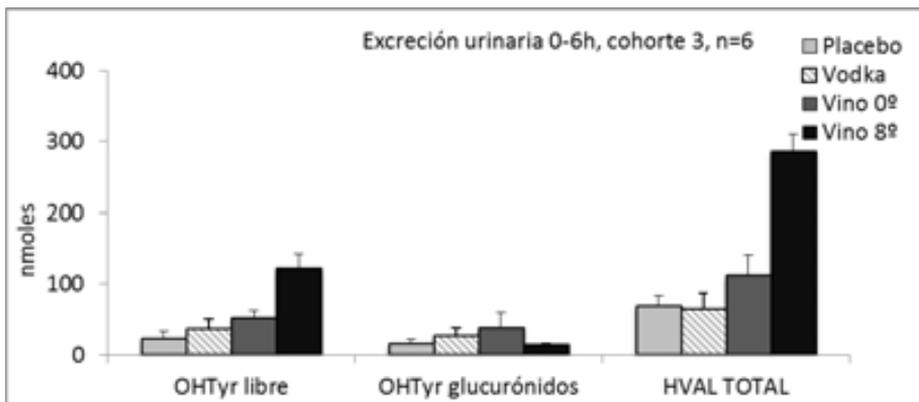


Figura 49. Excreción de hidroxitirosol libre, glucuronizado y HVAL en la cohorte 2, 15 g.



El OHTyr, como en el DOPET 1, tras la administración de las distintas bebidas se excretó principalmente sulfatado. El porcentaje de OHTyr excretado de este modo osciló entre un 50 y un 95%, según la cohorte y tipo de bebida.

Las tres cohortes tuvieron en común una mayor excreción de hidroxitirosol y tirosol totales tras la administración de vino en comparación con el resto de condiciones.

## Resultados

Para las variables hidroxitirosol y tirosol totales se muestran los datos y el análisis estadístico de las 3 cohortes en la siguiente tabla. El resto de compuestos fenólicos sólo se detallan para la cohorte 2, la más representativa.

Tabla 56. Excreción de fenoles de 0 a 6 h en las cohortes 1 y 3 (nmoles).

Fenol	Placebo Media ± DE	Vodka Media ± DE	Vino 0° Media ± DE	Vino Media ± DE
<i>Cohorte 1, 30 g</i>				
<b>Total OHTyr</b>	228 ± 33	429 ± 226	1428 ± 593	5015 ± 2065
	p<0,001 gl:3,15 V-P,E,D; D-E,P			
<b>Total Tyr</b>	16 ± 20	138 ± 68	71 ± 17	7454 ± 2690
	p<0,001 gl:3,15 V-P,E,D; D-P, E-P			
<i>Cohorte 3, 15 g</i>				
<b>Total OHTyr</b>	399 ± 131	546 ± 240	1352 ± 282	3560 ± 639
	p<0,001 gl:3,15 V-P,E,D; D-E,P			
<b>Total Tyr</b>	25 ± 16	73 ± 49	78 ± 13	3910 ± 1391
	p<0,001 gl:3,15 V-P,E,D; D-P, e-p			

P:placebo, E:vodka, D:vino desalcoholizado, V:vino. En mayúsculas p<0,01, en minúsculas p<0,05.

Tabla 57. Excreción de fenoles en la cohorte 2 (nmoles).

Compuesto fenólico	Placebo	Vodka	Vino 0°	Vino	ANOVA	Tukey 2 a 2
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	gl 3,81; p	
<b>Total OHTyr</b>	287,1 ± 114,7	841,2 ± 612,7	1840 ± 1116	4409 ± 2047	<0,001	V-P,E,D; D-E,P; E-P
OHTyr sulfato	149,5 ± 87,1	502,1 ± 495	1524 ± 999,2	4114 ± 2009	<0,001	V-P,E,D; D-E,P; E-P
OHTyr glucurónidos	69,7 ± 40	98,4 ± 59	110 ± 102	93,2 ± 45,3	0,008	p-e,d,v
OHTyr libre	37,2 ± 40,7	89,2 ± 174,2	150,8 ± 224,7	72,3 ± 66,4	0,079	
Total HVAL	30,7 ± 26,8	151,5 ± 210,3	55,8 ± 55,3	129,1 ± 133	0,003	p-e
<b>Total Tyr</b>	49,9 ± 30,8	98,3 ± 80,2	80,7 ± 45,8	2324 ± 997,5	<0,001	V-P,E,D; d-p
Tyr-4-O-glucurónido	48,5 ± 30,8	96,1 ± 78,1	79,5 ± 45	2245 ± 981,5	<0,001	V-P,E,D; D-P; V-P
Tyr libre	1,4 ± 3	2,2 ± 5,5	1,2 ± 2,4	78,1 ± 103,4	<0,001	V-P,E,D

P:placebo, E:vodka, D:vino desalcoholizado, V:vino. En mayúsculas p<0,01, en minúsculas p<0,05

### 8.2.10.1. Hidroxitirosol

La excreción de hidroxitirosol total siguió el siguiente orden para las distintas condiciones de tratamiento en las tres cohortes: la mayor se encontró tras el vino, después tras el vino dealcoholizado, el alcohol y la menor con placebo (placebo<vodka <vino 0º<vino). Las diferencias entre todas las comparaciones posibles fueron estadísticamente significativas en las tres cohortes, exceptuando la comparación placebo-vodka que solo fue estadísticamente significativa en la cohorte 2. Este hecho se puede explicar debido al reducido tamaño muestral de las otras dos cohortes y la gran variabilidad en la cantidad de OHTyr excretada por los distintos individuos.

Cohorte 2 (estudio definitivo):

La variabilidad en esta cohorte en cuanto a la excreción de hidroxitirosol con las distintas condiciones también fue considerable (CV: placebo 39%, alcohol 72%, vino 0º 60% y vino 13º 46%).

La cantidad de hidroxitirosol sulfato representó el 93% del total en el vino, el 83% del total en el vino desalcoholizado, el 59% del total en el vodka y el 51% en el placebo. Los porcentajes restantes se repartieron entre los glucurónidos, el OHTyr libre y el HVAL total.

El OHTyr sulfato también siguió el mismo patrón de excreción: placebo<vodka<vino 0º<vino. Los glucurónidos fueron algo superiores en las distintas bebidas en comparación con el placebo. No se obtuvieron diferencias entre tratamientos el hidroxitirosol libre. Para el metabolito del OHTyr, el HVAL, se observó una mayor excreción en las dos condiciones con alcohol en comparación con las otras dos, siendo significativa solo la comparación entre placebo y etanol.

### 8.2.10.2. *Tirosol*

La cantidad de tirosol excretada fue superior con el vino que con el resto de condiciones en las tres cohortes y estos resultados fueron estadísticamente significativos. El tirosol se excretó principalmente en forma de glucurónido mientras que la cantidad libre fue inferior al 5%.

La cantidad de tirosol total en orina con el vino en la cohorte 1 (30g) fue tres veces superior a la cohorte 2 y el doble que la de la cohorte 3 (7454,4, 2245 y 3919,4 nmoles respectivamente).

También se apreció una importante variabilidad en la excreción de tirosol para una misma condición de tratamiento (CV: placebo 61,7%, vodka 81%, vino 0º 57% y vino 13% 42%)

### 8.2.10.3 *Comparación entre cohortes*

Se hicieron comparaciones entre cohortes en la excreción de ambos fenoles mediante un análisis de la varianza, ajustado posthoc con test de Tukey.

La excreción de hidroxitirosol total con el vino fue ligeramente superior en la cohorte 1 que en la cohorte 2 (5014,7 vs 4409 nmoles), pero no alcanzó la significación estadística. A pesar que la dosis de alcohol administrada fue el doble la cantidad de hidroxitirosol aumentó solo un 14%. Este hecho sugiere que dosis de alcohol más altas en forma de vino podrían no aportar ningún beneficio en términos de generación de hidroxitirosol. En la cohorte 3 la cantidad de hidroxitirosol excretada fue algo inferior a la de la cohorte 2, ambas con 15 g (3560,3 vs 4409) pero esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa.

Para la condición vodka la cantidad de hidroxitirosol fue superior en la cohorte 2 que en la cohorte 1 ( $p < 0,045$ ). Este resultado no fue el esperable, teniendo en cuenta los resultados del DOPET 1. Puede

## *Resultados*

explicarse porque los sujetos que tomaron ambas dosis fueron distintos, y por tanto la diferencia podría deberse a la variabilidad interindividual.

No hubo diferencias en la excreción de hidroxitirosol entre cohortes para el vino desalcoholizado o el placebo.

Para el tirosol en los tratamientos placebo, vodka y vino sin alcohol no se observaron diferencias entre cohortes. Para el vino en la cohorte con 30 g se observó mayor excreción de tirosol que en las otras dos cohortes con 15 g (7454 vs 2324 y 3910 nmoles). La diferencia fue estadísticamente significativa para la comparación entre la cohorte 2 y las otras dos ( $p < 0,001$  vs cohorte 1 y  $p = 0,028$  vs. cohorte 3).

### 8.2.11. Recuperación urinaria de hidroxitirosol y tirosol

Dado que el vino (vino 8°, vino 13°, vino 0°) contiene tirosol y hidroxitirosol en pequeñas cantidades se calculó la cantidad en orina recuperada de ambos fenoles teniendo en cuenta la dosis administrada con cada bebida. La cantidad de hidroxitirosol que tiene el vino es unas ocho veces inferior a la del aceite (ver tabla 53). En la siguiente tabla se muestran los resultados para la cohorte 2. A vez se ha añadido una columna con los datos del estudio previo con 50 ml de aceite de oliva con fines comparativos.

Tabla 58. Recuperación (R) en nmoles (%)

	Vino 0° R nmoles Media ± DE (%)	Vino 13° R nmoles Media ± DE (%)	Virgin olive oil* R nmoles Media ± DE (%)
<b>Total OHTyr</b>	1840 ± 1116 (161,4)	4409 ± 2047 (419,9)	3602 ± 1583 (16,4)
OHTyr sulfato	1524 ± 999,2 (133,7)	4114 ± 2009 (391,9)	1309 ± 945,5 (6,0)
OHTyr glucuronidos	110 ± 102,2 (9,6)	93,2 ± 45,3 (8,8)	956,7 ± 438,6 (4,3)
OHTyr libre	150,8 ± 224,7 (13,2)	72,3 ± 66,4 (6,9)	583,5 ± 324,2 (2,7)
HVAL total	55,8 ± 55,3 (4,9)	129,1 ± 133,0 (12,3)	753,5 ± 182,4 (3,4)
<b>Total Tyr</b>	80,7 ± 45,8 (0,3)	2324 ± 997,2 (10,6)	1389 ± 467,6 (9,1)
Tyr-4-glucuronido	79,5 ± 45,0 (0,3)	2245 ± 981,5 (10,2)	912,7 ± 426,4 (6%)
Tyr libre	1,2 ± 2,4 (0,005)	78,1 ± 103,4 (0,4)	476,5 ± 129,1 (3,1)

## *Resultados*

La recuperación en orina de hidroxitirosol total con el vino fue del 419,9%, con el vino desalcoholizado del 161,4% y con el aceite del 16,4%. Por otro lado para el tirosol total la cantidad recuperada fue muy inferior, siendo del 10,6% con el vino, del 0,3% con el vino desalcoholizado y del 9,1% con el aceite.

## **8.2.12. Excreción urinaria de DOPAC, HVA y razón DOPAC/OHTyr**

### *8.2.12.1 Ácido 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC)*

La excreción de 0 a 6 h de DOPAC y su metabolito, el HVA, se analizaron en la cohorte 2 y por tanto la razón DOPAC/OHTyr se calculó también para los 28 sujetos de esta cohorte. En la figura 50 se pueden observar los resultados obtenidos y la significación estadística de las comparaciones entre los diferentes grupos.

Para el DOPAC se apreció un aumento con el vino desalcoholizado respecto al resto de condiciones, siendo significativa la diferencia con placebo y vodka.

En la misma figura se aporta de nuevo la excreción de OHTyr en la misma escala para poder interpretar mejor los datos de DOPAC y OHTyr así como la razón. La excreción de DOPAC en el vino de 13 ° fue 4 veces superior a la de OHTyr, mientras que en el vino de 0° fue hasta 10 veces superior.

### *8.2.12.2 Ácido homovanílico (HVA)*

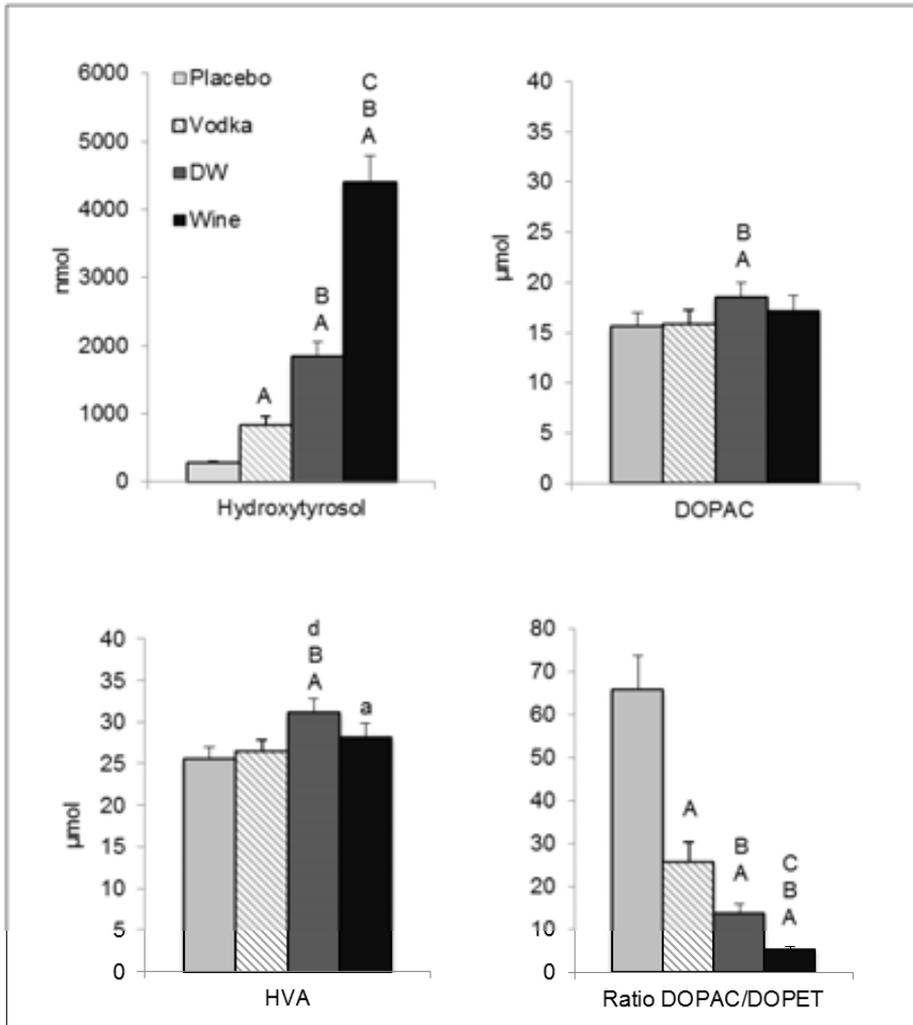
Para el metabolito de DOPAC, el HVA, el resultado siguió la misma tendencia, siendo el vino de 0° superior al resto de condiciones.

### *8.2.12.3 Razón DOPAC/OHTyr*

En cuanto a la razón se pudo observar un descenso del mismo en el siguiente orden: placebo (65,9)>vodka (25,8)>vino 0°(13,7)>vino 13°(5,2).

Resultados

Figura 50. Excreción urinaria de DOPET, DOPAC, HVA y razón DOPAC/OHTyr (ratio DOPAC/DOPET) de 0 a 6 h en la cohorte 2 (n=28).



Los datos se expresan como media ± EE. A: P<0,01 y a: P<0,05 vs. placebo; B: P<0,01, y b, p<0,05 vs. vodka; C: P<0,01 y c: P<0,05 vs. vino 0. D: P<0,01 y d: P<0,05 vs. vino 13.

### 8.2.13 Precursores síntesis de dopamina y tiramina

En el estudio DOPET 2 *a posteriori* se decidió analizar la excreción en orina de 0 a 6 h de la tirosina, un potencial precursor de la dopamina y la tiramina, y por tanto del hidroxitirosol y el tirosol.

En la figura 52 puede verse un esquema general de la síntesis de dopamina a partir de sus precursores y de su metabolismo.

#### 8.2.13.1 Excreción urinaria de tirosina.

Las concentraciones de tirosina no se distinguieron entre tratamientos en la cohorte 2.

Figura 51. Excreción de tirosina en orina de 0 a 6 h.

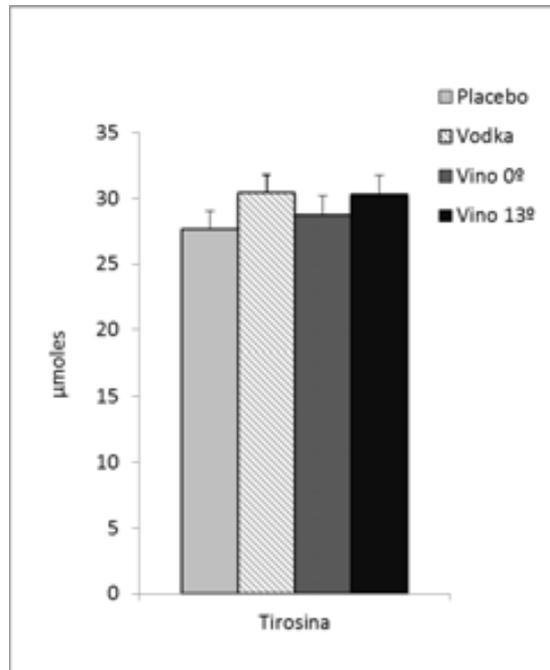
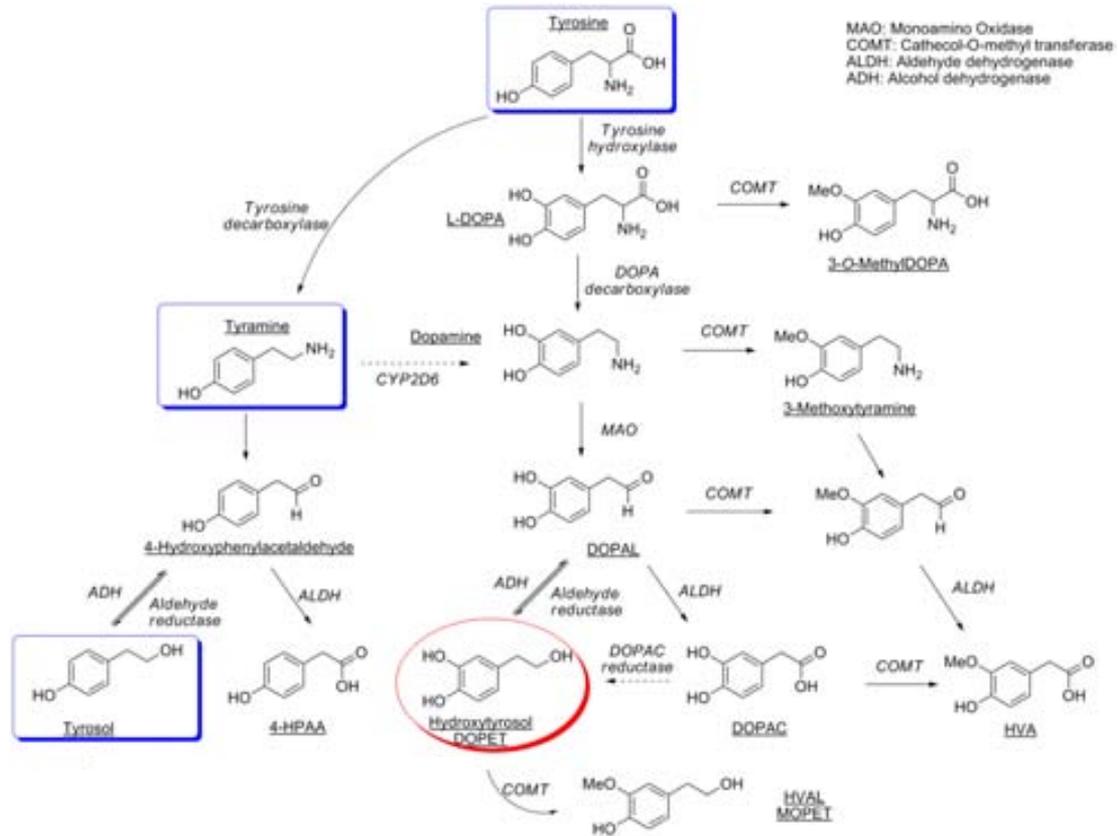


Figura 52. Diagrama general síntesis y metabolismo de la dopamina



### **8.2.14 Metabolismo de la tiramina a tirosol**

Para complementar los resultados del estudio DOPET 2, se decidió también cuantificar la excreción en orina del metabolito mayoritario del 4-hidroxifenilacetaldehído, el ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPAA). Su metabolito minoritario es el tirosol. Ver diagrama general en página anterior.

En este caso la hipótesis fue que la presencia de alcohol podría desviar el metabolismo de la tiramina de 4-HPAA a tirosol. Sucedería lo previamente descrito con el DOPAC y el DOPET, pues las enzimas involucradas en las reacciones de una a otra sustancia son las mismas, la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH).

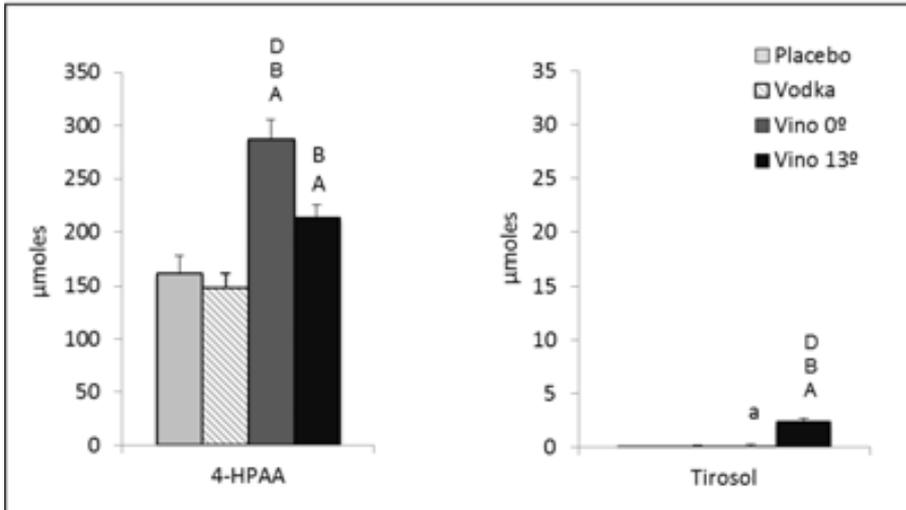
Se calculó también la razón 4-HPAA/Tyr.

#### *8.2.14.1 Excreción urinaria de ácido 4-hidroxifenilacético*

En la siguiente figura se puede observar la excreción de 4-HPAA en la cohorte 2 (n=27) y la de tirosol (n=28). La excreción de 4-HPAA fue superior en el vino 0<sup>o</sup> en comparación con el resto de condiciones experimentales. A su vez el vino también fue superior a vodka y placebo. La cantidad de 4-HPAA excretada fue enorme en relación con la de tirosol (en el vino fue 92 veces superior).

## Resultados

Figura 53. Excreción urinaria de 4-HPAA y tirosol de 0 a 6 h.



### 8.2.14.2 Razón 4-HPAA/Tyr

La razón disminuyó de placebo a vodka, de vodka a vino 0 y de vino 0 a vino (7,2 2,3 > 6,5 4,3 > 5,8 1,4 > 0,12 0,02). Esta disminución fue a expensas del aumento del tirosol. Todas las comparaciones de la razón fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) excepto la del vodka con el vino desalcoholizado.

### 8.2.15 Resumen de precursores y metabolitos mayoritarios dopamina

En la siguiente tabla se muestra un resumen de la excreción urinaria de las distintas sustancias de 0 a 6 h, con los resultados de las comparaciones estadísticas entre tratamientos.

Tabla 59. Excreción de precursores en la síntesis de dopamina y metabolitos en la cohorte 2 ( $\mu$ moles).

Compuesto	Placebo Media $\pm$ DE	Vodka Media $\pm$ DE	Vino 0 <sup>o</sup> Media $\pm$ DE	Vino Media $\pm$ DE	ANOVA gl 3,81*; p	Tukey 2 a 2
DOPAC	15,6 $\pm$ 7,5	15,9 $\pm$ 7,3	18,5 $\pm$ 7,9	17,2 $\pm$ 8,1	<0,001	V-P,E
HVA	25,6 $\pm$ 7,4	26,6 $\pm$ 7,0	31,2 $\pm$ 8,4	28,3 $\pm$ 8,1	<0,001	D-P,E; d-v; V-P
4-HPAA	161,2 $\pm$ 85,0	148,3 $\pm$ 68,3	286,8 $\pm$ 97,9	213,2 $\pm$ 65,1	<0,001	D-P,E,V; V-P,E
Tirosina	27,6 $\pm$ 10,6	30,4 $\pm$ 12,3	28,7 $\pm$ 13,2	30,2 $\pm$ 11,6	0,057	

P:placebo, E:vodka, D:vino desalcoholizado, V:vino. En mayúsculas  $p < 0,01$ , en minúsculas  $p < 0,05$ . \*gl 3,78 para 4-HPAA (n=27).

### **8.2.16. Estudio con precursores en animales**

Para poder interpretar adecuadamente los resultados obtenidos en humanos se diseñó un estudio en animales (ratas). En este estudio se administraron potenciales precursores del tirosol e hidroxitirosol, concretamente la tiramina y la tirosina. A su vez se administró también tirosol, con la hipótesis de que éste pudiera estarse transformando en hidroxitirosol (la diferencia entre ambos es solamente un grupo hidroxilo). De hecho esta transformación ya está descrita para algunas bacterias.

Se trataba de un estudio de diseño paralelo en 96 ratas, con 6-7 por grupo, en el que se administraron 10 o 20 mg/kg de tirosol, tiramina, tirosina o placebo (vehículo) tras la inyección previa de etanol (1g/kg) o suero fisiológico. El esquema experimental así como el tipo de análisis estadístico de los datos está detallado en los anexos.

Entre los hallazgos del estudio en animales destacan los siguientes:

- La tiramina aumentó en 20 veces la excreción urinaria de tirosol (aunque no fue estadísticamente significativo).
- La administración de tirosol aumenta la excreción urinaria de tirosol y también de hidroxitirosol ( $p < 0,005$ ). Compatible con que el tirosol se pudiera transformar en hidroxitirosol. La enzima que podría ser responsable de la reacción es la tirosina hidroxilasa (de la misma forma que transforma la tirosina en L-DOPA).
- El alcohol por sí mismo no produjo cambios en la recuperación de tirosol e hidroxitirosol (estos datos no concuerdan con lo observado en humanos tanto en DOPET 1 como DOPET 2).
- La administración de tirosina  $\pm$  etanol no produjo cambios en la recuperación de tirosol e hidroxitirosol.

Tabla 60. Recuperación urinaria de 0 a 4 h de tirosol e hidroxitirosol (nmoles) en ratas.

	Pre-tratamiento con etanol							
	Vehículo	Tirosina		Tirosol		Tiramina		
		10 mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	
Tirosol total	6,2 ± 1,5	6,6 ± 1,5	6,9 ± 1,9	565,9 ± 118,6*†	910,9 ± 114,5* †‡	165,3 ± 31,2	133,7 ± 32,7	
Hidroxitirosol total	15,9 ± 3,8	19,9 ± 6,9	23,2 ± 4,9	34,8 ± 3,0*	82,0 ± 17,4* ‡	23,6 ± 4,9	24,8 ± 5,9	
	Pre-tratamiento con salino							
	Vehículo	Tirosina		Tirosol		Tiramina		
		10 mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	
Tirosol total	5,2 ± 1,7	7,8 ± 1,2	8,5 ± 2,0	292,4 ± 49,4*†	483,3 ± 50,8*†	116,7 ± 34,9	92,6 ± 19,4	
Hidroxitirosol total	23,0 ± 5,7	23,0 ± 5,1	24,9 ± 5,4	48,4 ± 7,3*	105,2 ± 15,2* ‡	32,0 ± 5,0	35,4 ± 7,0	

Los datos se expresan como media ± EE. \* P<0,005, vs. vehículo; ‡ P<0,005, entre dosis; † P<0,005 entre tratamientos previos (etanol vs. salino).

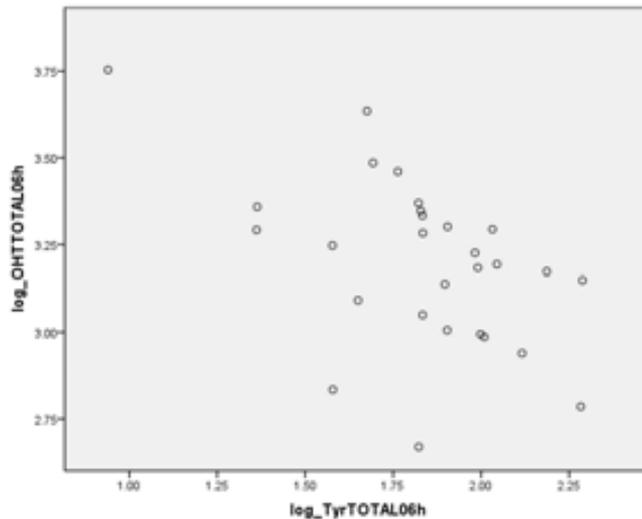
### 8.2.17. Correlaciones entre alcohol, fenoles y metabolitos de la dopamina

En cuanto al alcohol y el hidroxitirosol con los datos de las tres cohortes (n=40) para la condición vodka el AUC de la alcoholemia de 0 a 6 h se correlacionó positivamente con la excreción de hidroxitirosol (log):  $r=0,395$   $p=0,012$ .

Para la cohorte 2 existió una correlación negativa moderada entre la excreción en orina de hidroxitirosol y la de tirosol para los vinos.

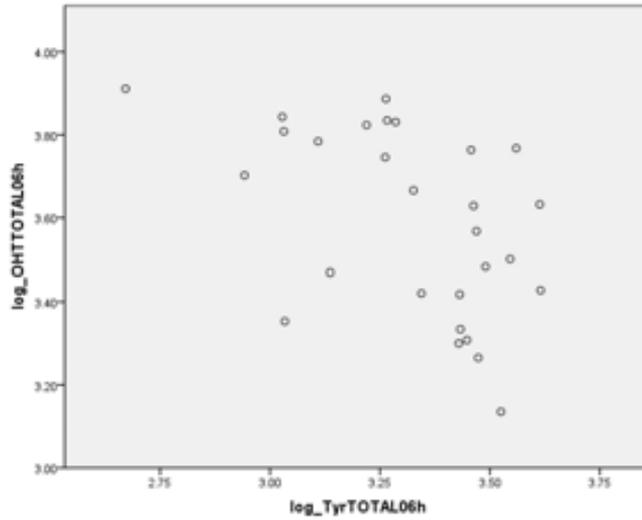
Con ambos vinos se observó que a más hidroxitirosol menos tirosol. Estos resultados concuerdan con la posibilidad de que el tirosol se transformara en hidroxitirosol también en humanos (deducida de los resultados del estudio en animales).

Figura 54. Correlación entre excreción de tirosol e hidroxitirosol de 0 a 6 h para el vino 0° ( $r=-0,521$   $p=0,005$ ).



## Resultados

Figura 55. Correlación entre excreción de tirosol e hidroxitirosol de 0 a 6 h para el vino 13° ( $r=-0,494$   $p=0,008$ )

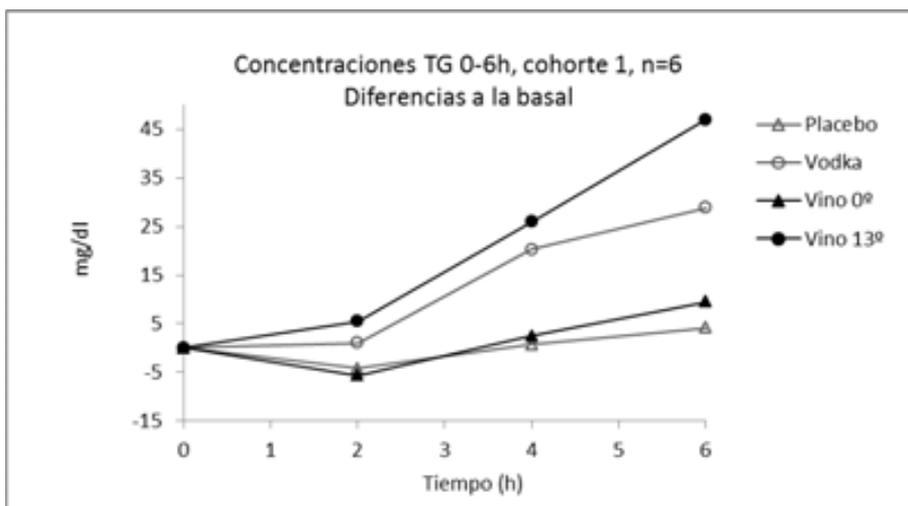


No se observó correlación entre la excreción de DOPAC y la de hidroxitirosol de 0 a 6 h en la cohorte 2 en ninguna de las condiciones experimentales. Lo mismo sucedió entre la excreción del tirosol y la de 4-HPAA.

## 8.2.18. Perfil lipídico en sangre y concentraciones de glucosa

### 8.2.18.1. Triglicéridos

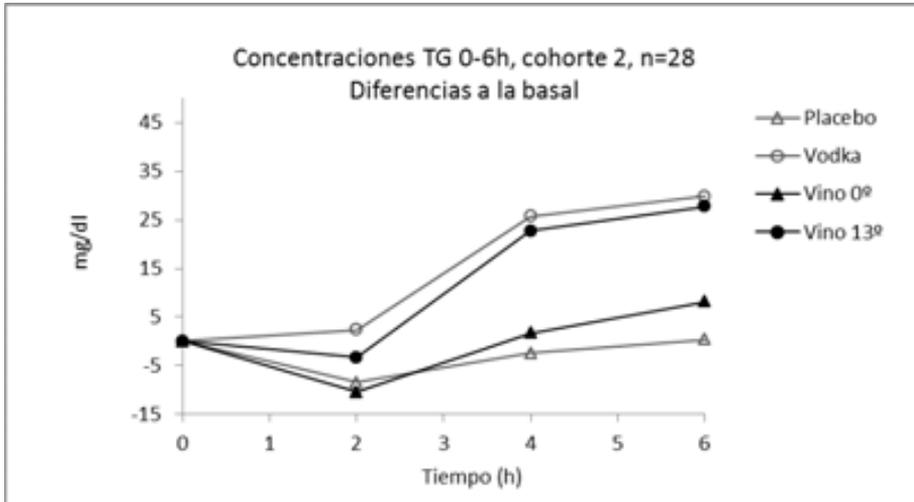
Figura 56. Concentraciones de triglicéridos en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g.



Se produjo un aumento de los triglicéridos en las dos condiciones con alcohol respecto a las que no lo tenían. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para  $C_{max}$ , AUC y en todos los tiempos para mayoría de comparaciones entre bebidas alcohólicas vs. no alcohólicas.

## Resultados

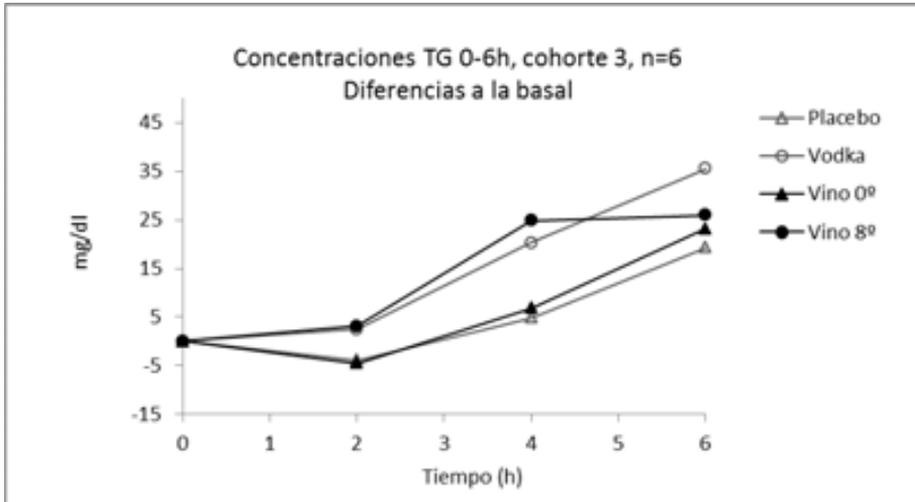
Figura 57. Concentraciones de triglicéridos en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.



Se produjo un aumento de los triglicéridos en las dos condiciones con alcohol a diferentes tiempos. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para  $C_{max}$  y AUC (exceptuando la comparación vino de 0 vs. vino de 13 ) y a las 4 y 6 h.

## Resultados

Figura 58. Concentraciones de triglicéridos en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 3, 15 g.

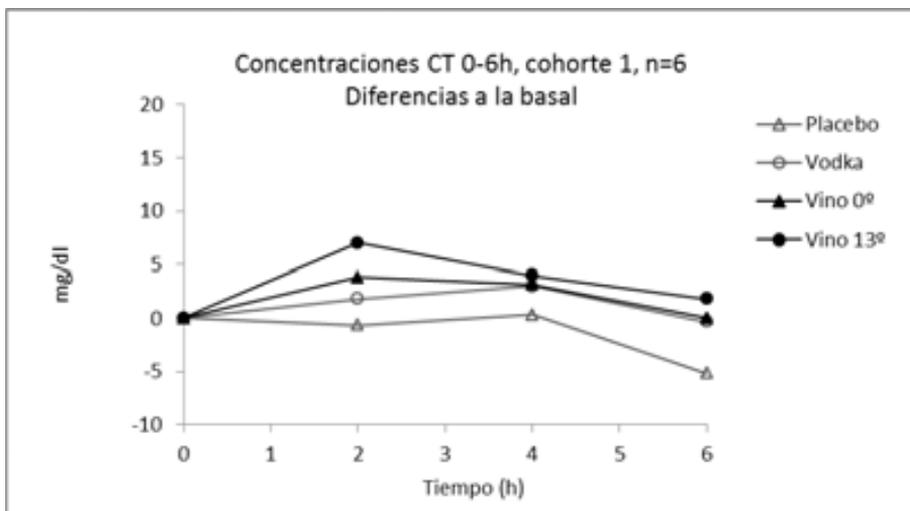


Se obtuvieron resultados similares a cohortes previas en que las bebidas con alcohol obtuvieron concentraciones más altas que la que no tenían. Estos resultados fueron estadísticamente significativos para  $C_{max}$ , AUC y a las 4 h y 6 h.

Ver en tabla 63 más adelante el resumen de los resultados de los lípidos y la estadística para más detalles.

8.2.18.2. Colesterol total

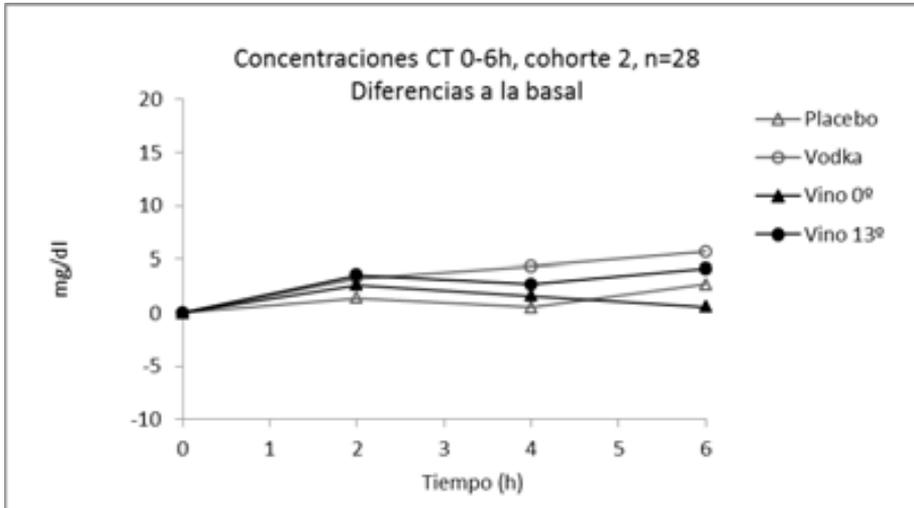
Figura 59. Concentraciones de colesterol total en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g.



Las concentraciones fueron superiores en el vino que con placebo a las 2 y 6 h y estas diferencias se observaron también en la  $E_{max}$  y AUC. Ver tabla 63 de resumen de los lípidos.

## Resultados

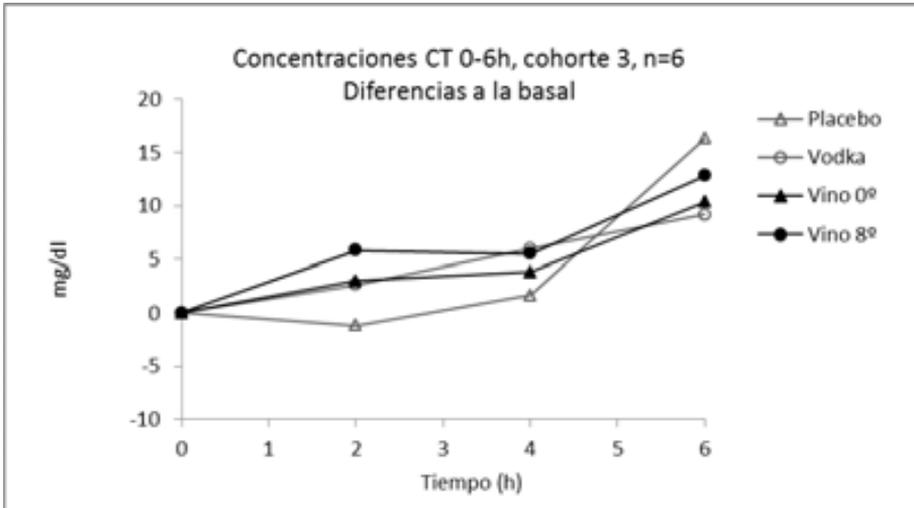
Figura 60. Concentraciones de colesterol total en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.



El AUC del etanol fue superior a la del placebo. No hubo diferencias a lo largo del tiempo entre las distintas condiciones de tratamiento. Ver tabla 63 de resumen de los lípidos.

## Resultados

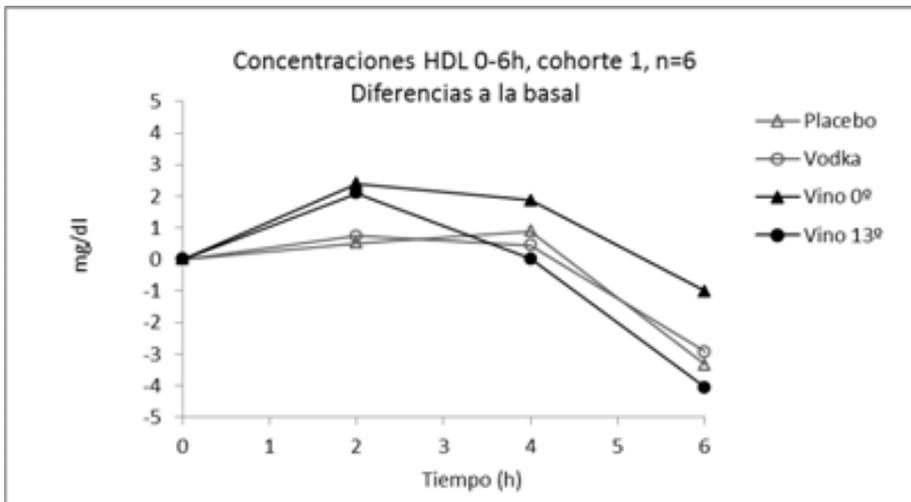
Figura 61. Concentraciones de colesterol total en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 3, 15 g.



No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en esta cohorte.

### 8.2.18.3. Colesterol HDL

Figura 62. Concentraciones de colesterol HDL en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g.

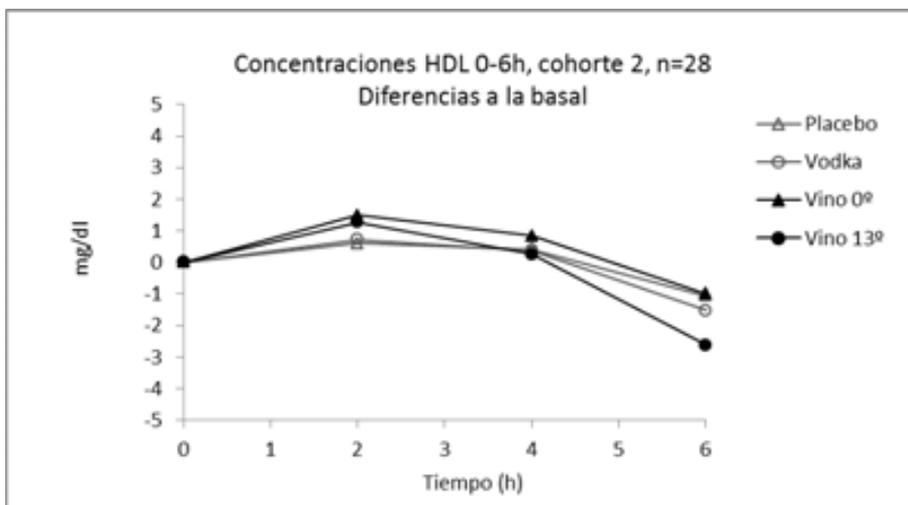


## *Resultados*

A las dos horas se pudo observar un aumento de las HDL con los dos vinos. Posteriormente (4 h, 6 h) con el vino desalcoholizado. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre el vino desalcoholizado y el placebo-vodka y entre el vino y el placebo. A las 4h el vino 0° tuvo concentraciones superiores al vino y a las 6h concentraciones superiores al resto de tratamientos (ANOVA gl 9,45, p de la interacción tiempo x tratamiento=0,003, 2 h: P-D; p-v; e-D 4 h: D-V 6 h: P-D; e-d; V-D).

## Resultados

Figura 63. Concentraciones de colesterol HDL en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.



Las concentraciones de HDL a las 2 h aumentaron discretamente con ambos vinos respecto las otras dos condiciones, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. A las 6 h con el vino las concentraciones fueron inferiores al placebo y al vino desalcoholizado (ANOVA gl 9,45, p de la interacción tiempo x tratamiento=0,044, 6 h: V-P, D)

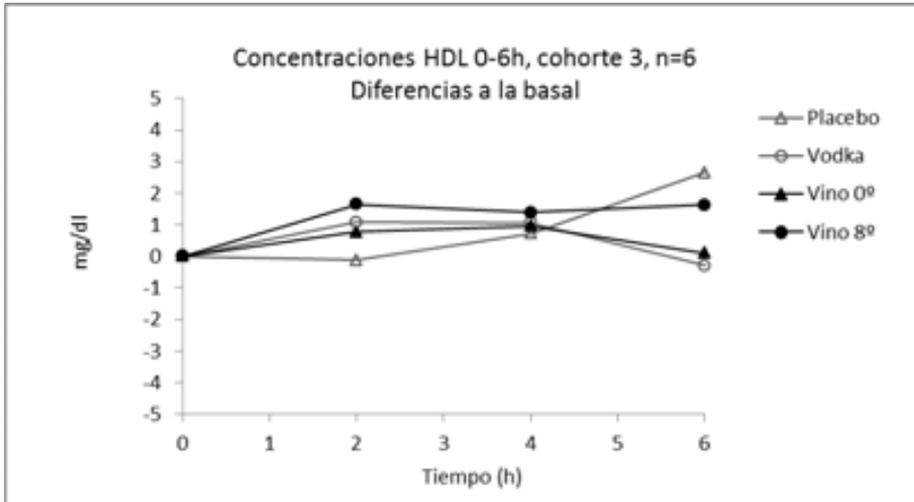
Tabla 61. Parámetros cinéticos de 0-6 h para el colesterol HDL en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$C_{max}$ (mg/dl)	-0,3	4,9	-1,0	3,8	-0,5	3,5	-2,3	4,0
AUC (mg x h/dl)	1,0	8,6	0,7	6,9	3,7	8,2	0,4	6,8
$t_{max}$ (h)	6 (2-6)		6 (2-6)		6 (2-6)		6 (2-6)	

No hubo diferencias entre tratamientos en los parámetros cinéticos.

## Resultados

Figura 64. Concentraciones de colesterol HDL en sangre de 0 a 6h en la cohorte 3, 15 g.



En esta cohorte no hubo diferencias entre tratamientos, ni a lo largo del tiempo ni para los parámetros cinéticos.

### 8.2.18.4. Colesterol LDL

Las concentraciones de colesterol LDL se calcularon mediante la fórmula de Friedewald:

Colesterol LDL= Colesterol total- (Colesterol HDL+Triglicéridos/5).

## Resultados

Figura 65. Concentraciones de colesterol LDL en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g

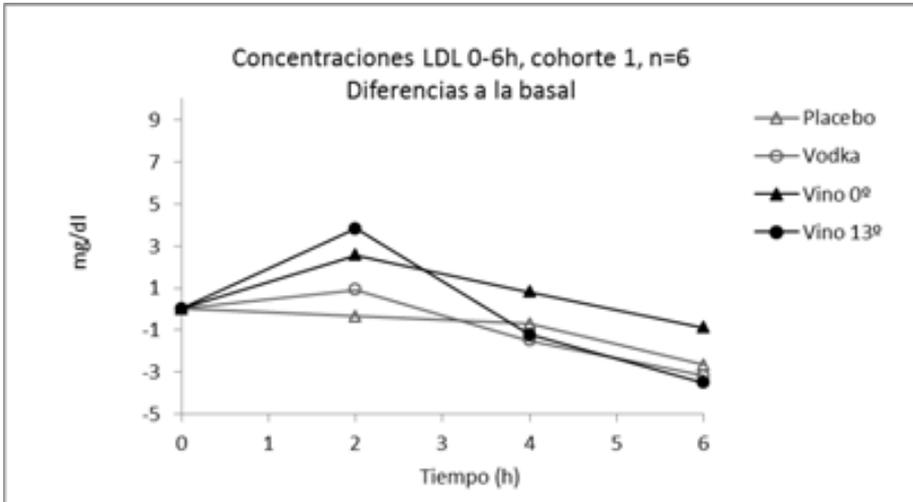
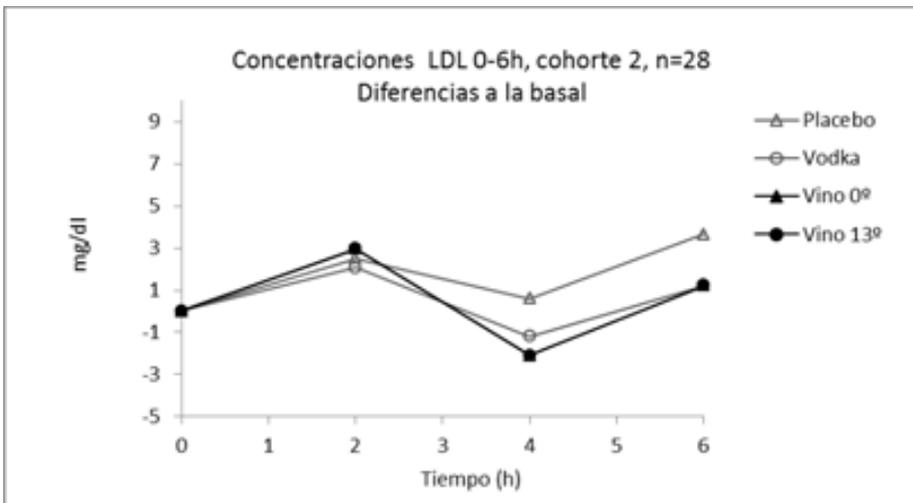


Figura 66. Concentraciones de colesterol LDL en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.

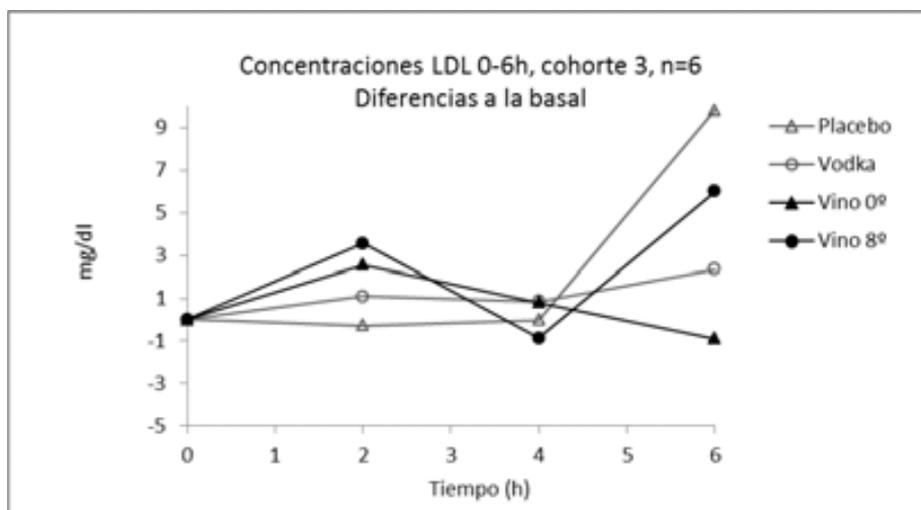


## Resultados

Tabla 62. Parámetros cinéticos de 0-6 h para el colesterol LDL en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$C_{max}$ (mg/dl)	4,4	11	1,9	8,7	0,4	14,1	1,9	14,3
AUC (mg x h/dl)	9,9	20,8	3,0	20,3	7,3	21,1	3,0	24,5
$t_{max}$ (h)	5 (2-6)		5 (1-6)		6 (2-6)		4 (2-6)	

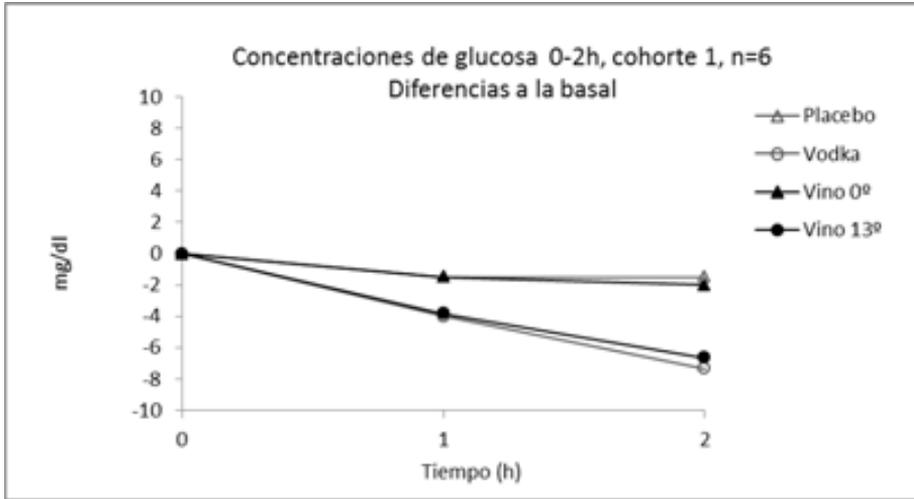
Figura 67. Concentraciones de colesterol LDL en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 3, 15 g.



En las tres cohortes no hubo diferencias entre los tratamientos a lo largo del tiempo ni para los parámetros cinéticos.

8.2.18.5. Glucosa

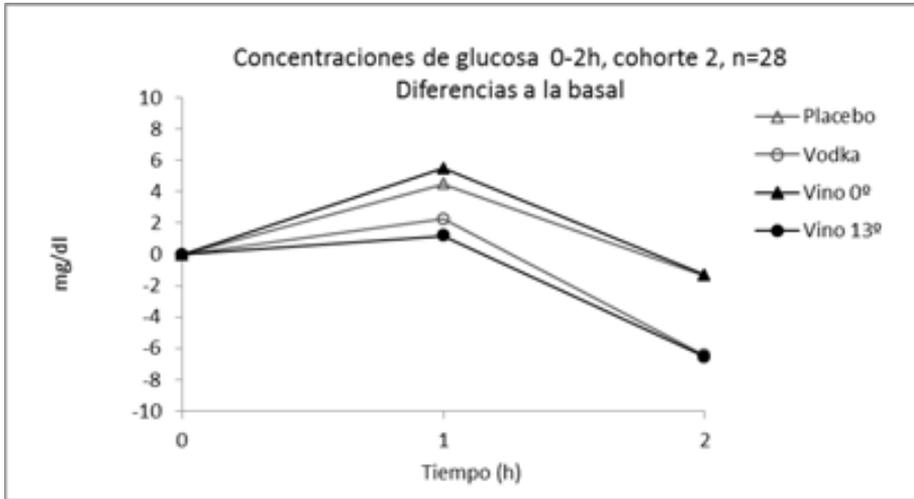
Figura 68. Concentraciones de glucosa en sangre de 0 a 2 h en la cohorte 1, 30 g.



Se observó una disminución de la glucosa a la hora y a las dos horas con las dos condiciones que tenían alcohol. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, y también para AUC y  $C_{max}$  de bebidas alcohólicas vs. no alcohólicas.

## Resultados

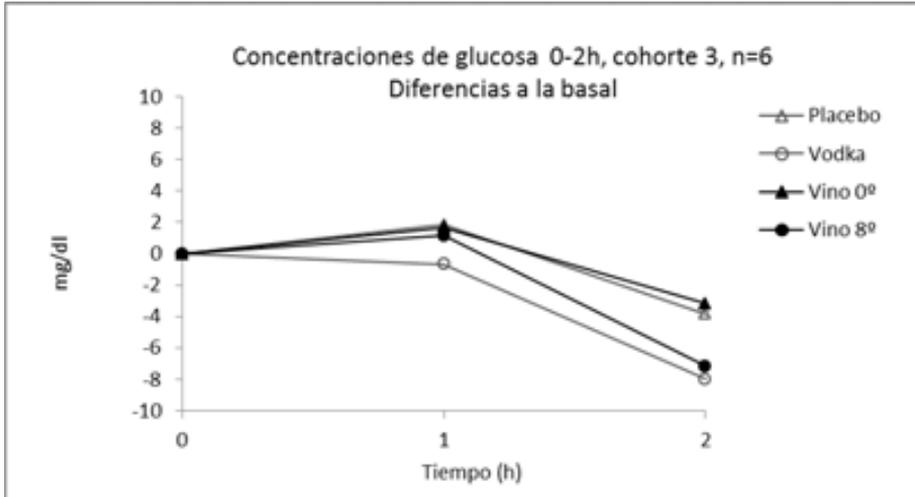
Figura 69. Concentraciones de glucosa en sangre de 0 a 2 h en la cohorte 2, 15 g.



Se produjo un aumento de la glucosa en las dos condiciones sin alcohol respecto a las otras dos a la hora, y una disminución de la glicemia a las 2 horas con las bebidas alcohólicas. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas y también para AUC y  $C_{max}$  de bebidas alcohólicas vs. no alcohólicas (ver tabla 63).

## Resultados

Figura 70. Concentraciones de glucosa en sangre de 0 a 2 h en la cohorte 3, 15 g.



Los resultados obtenidos con esta cohorte fueron similares a los obtenidos en la cohorte 2, ambas con 15 de alcohol. En este caso no se alcanzó la significación estadística.

*8.2.18.6 Resumen de lípidos y glucosa*

En resumen, para las concentraciones de lípidos y glucosa destacaron los siguientes hallazgos:

-Aumento dosis dependiente de las HDL a las 2 horas de administración con los vinos.

-Aumento de los TG con las bebidas alcohólicas respecto a las que no contenían alcohol.

-Disminución de la glucosa con las bebidas alcohólicas respecto a las que no contenían alcohol.

-Tendencia, no significativa en mayoría de los casos, al aumento del CT en las dos condiciones con alcohol respecto a las otras dos.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los parámetros cinéticos de las concentraciones de lípidos y glucosa y el curso temporal en las diferentes cohortes. Sólo se muestran las variables y parámetros en los que hubo diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 63. Parámetros cinéticos y curso temporal de las variables de perfil lipídico y glucosa.

Variable (Cohorte)	Parámetro	Placebo Media ± DE*	Vodka Media ± DE*	Vino 0° Media ± DE*	Vino 13° Media ± DE*	ANOVA gl/ p	Tukey 2 a 2
TG (1)	C <sub>max</sub>	1,7 ± 18,0	27,3 ± 33,1	3,8 ± 17,8	47,0 ± 28,8	3,15 / <0,001	P-E,V; e-d,v; D-V
	AUC	-2,8 ± 53,0	71,5 ± 82,0	3,1 ± 39,1	110 ± 78,1	3,15 / <0,001	p-e; P-V; e-d; D-V
	C-T 0-6 h	gl 9,45 p<0,001 2 h: P-E,V; D-E,V 4 h:P-E,V; p-d; D-E,V 6 h:P-E,D,V; E-V; D-E,V					
TG (2)	C <sub>max</sub>	-4,5 ± 16,5	31,9 ± 40,3	2,3 ± 35	26,5 ± 38,9	3,81 / 0,001	P-E; p-v; d-e
	AUC	-21,4 ± 50,9	86 ± 124	-9,5 ± 115	66,6 ± 111,2	3,81 / 0,001	P-E; p-v; d-e
	C-T 0-6 h	gl 9,243 p<0,001 2: P-E; D-E 4,6 h:P-V,E; D-E,V					
TG (3)	C <sub>max</sub>	12,2 ± 23,7	36,0 ± 25,8	11,6 ± 35,7	26,2 ± 16,2	3,15 / 0,026	e-p,d
	AUC	-21,3 ± 44,5	81,2 ± 79,9	27,8 ± 69,6	82,0 ± 69,4	3,15 / 0,021	---
	C-T 0-6 h	gl 9,45 p=0,009 4 h: P-E,V; D-E,V 6 h: P-E; D-E; e-v					
CT (1)	C <sub>max</sub>	-4,3 ± 6,6	0,5 ± 8,5	1,6 ± 14,0	7,0 ± 12,1	3,15 / 0,241	P-V
	AUC	-5,8 ± 17,4	9,3 ± 12,6	9,1 ± 22,7	16,7 ± 19,5	3,15 / 0,028	P-V
	t <sub>max</sub>	6 (4-6)	5 (2-6)	6(2-6)	4(2-6)	0,030	---
CT (2)	C <sub>max</sub>	3,7 ± 15,3	7,0 ± 9,7	1,6 ± 14,0	7,0 ± 12,1	3,81 / 0,241	p-e e-v
	AUC	6,6 ± 26,1	20,8 ± 20,7	9,1 ± 22,7	16,7 ± 19,5	3,81 / 0,028	
	t <sub>max</sub>	6 (2-6)	6(2-6)	6(2-6)	4(2-6)	0,030	
Glu (1)	C <sub>max</sub>	-1,8 ± 3,9	-7,3 ± 2,3	-2,0 ± 4,0	-6,7 ± 3,1	3,15 / 0,002	p-e,v; d-e,v
	AUC	-4,5 ± 9,5	-15,3 ± 6,5	-5 ± 9,3	-18,7 ± 8,6	3,15 / 0,001	p-e; d-e; V-P,VS
	t <sub>max</sub>	2(1-2)	2(1-2)	1(1-2)	2(1-2)	0,024	---
	C-T 0-2 h	gl 6,30 p<0,001 1h: e-p,d 2h: P-E,V; D-E,V					
Glu (2)	C <sub>max</sub>	3,4 ± 6,7	-1,8 ± 8,7	4,9 ± 7,1	-4,6 ± 6,4	3,81 / <0,001	p-e; P-V; d-e; D-V
	AUC	7,6 ± 11,9	-1,9 ± 14,7	9,7 ± 13,2	-4,2 ± 11,0	3,81 / <0,001	p-e; P-V; D-E; D-V
	T <sub>max</sub>	1(0-2)	2(1-4)	1(1-2)	2(1-2)	<0,001	p-e; P-V; d-e; D-V
	C-T 0-2 h	gl 6,162 p<0,001 1 h: p-e, P-V; D-E; D-V 2 h: P-E,V; D-E,V					

## *Resultados*

$C_{\max}$  en mg/dl, AUC en mg x h/dl,  $t_{\max}$  en h, P: placebo, E: vodka, D: vino desalcoholizado, V: vino. C-T: Curso temporal de las concentraciones (comparaciones a cada tiempo). En mayúsculas  $p < 0,01$ , en minúsculas  $p < 0,05$ .

\*Para la  $t_{\max}$  los valores corresponden a la mediana, máx, min y el resultado del test de Friedman (Wilcoxon 2 a 2 para las comparaciones múltiples).

### **8.2.19. Correlaciones entre glucosa y lípidos, alcohol e hidroxitirosol**

Se realizaron las correlaciones en la cohorte 2 para las variables que aumentaron con las dos bebidas alcohólicas:

-Los TG aumentaron en las dos condiciones con alcohol y la glucosa disminuyó. El AUC de estas variables no se correlacionó con el AUC de la alcoholemia en la condición vino. Para la condición vodka si hubo una correlación positiva moderada ( $r=0,407$   $p=0,031$ ) con la glucosa.

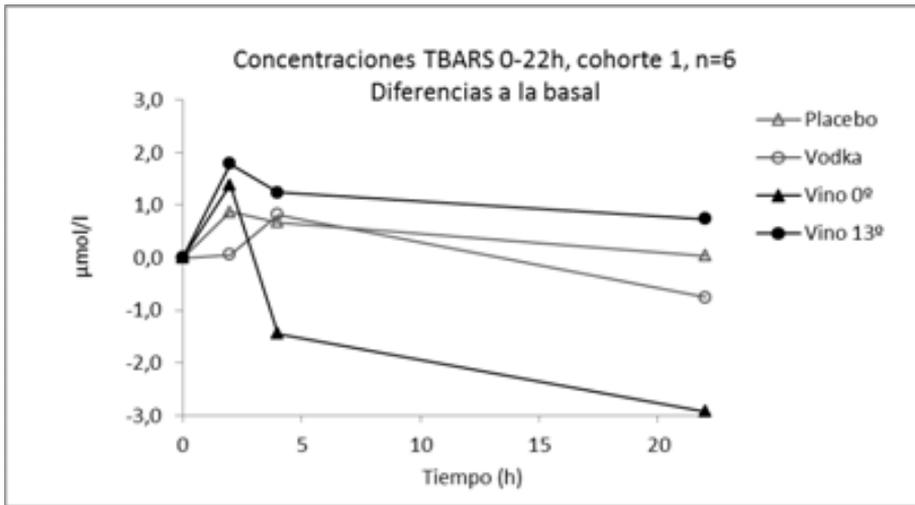
A su vez se correlacionaron las variables que se modificaron en las condiciones con más hidroxitirosol:

-Las HDL aumentaron a las 2 h con los vinos. No hubo correlación entre la excreción de hidroxitirosol (log) y el AUC del colesterol HDL para ninguno de los dos vinos.

## 8.2.20 Biomarcadores de oxidación

### 8.2.20.1. Peróxidos lipídicos (TBARS)

Figura 71. Concentraciones de TBARS en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 1, 30 g.



La reducción de TBARS a las 4 h y 22 h con el vino de 0 se debió a los datos un solo voluntario. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

## Resultados

Figura 72. Concentraciones de TBARS en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 2, 15 g.

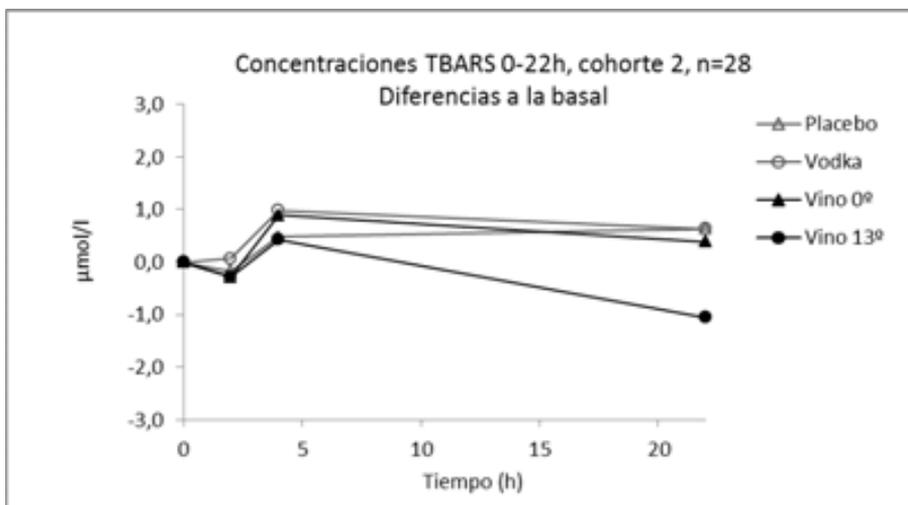


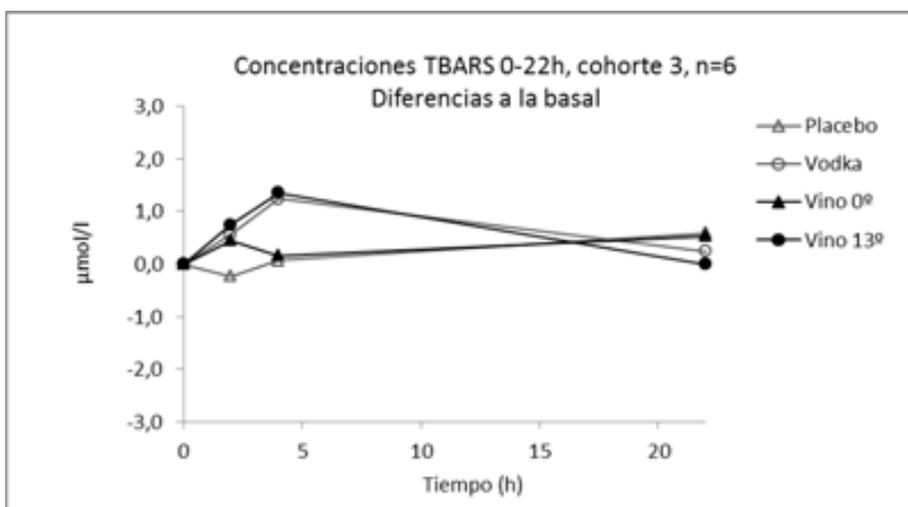
Tabla 64. Parámetros cinéticos de 0-22h para TBARS en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$C_{max}$ ( mol/l)	0,9	2,2	1,0	2,2	1,1	2,0	0,06	2,9
AUC ( mol x h/l)	8,4	26,8	15,7	24,4	11,9	28,1	-5,7	47,7
$t_{max}$ (h)	4 (2-22)		4 (2-22)		4 (2-22)		4 (2-22)	

Se observó una disminución de TBARS con el vino a las 22 h, y esta diferencia fue estadísticamente significativa en comparación con el resto de tratamientos (ANOVA gl 9,243, p interacción tiempo x tratamiento = 0,008, 22 h: V-P, E, D). No hubo diferencias en los parámetros cinéticos.

## Resultados

Figura 73. Concentraciones de TBARS en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 3, 15 g.

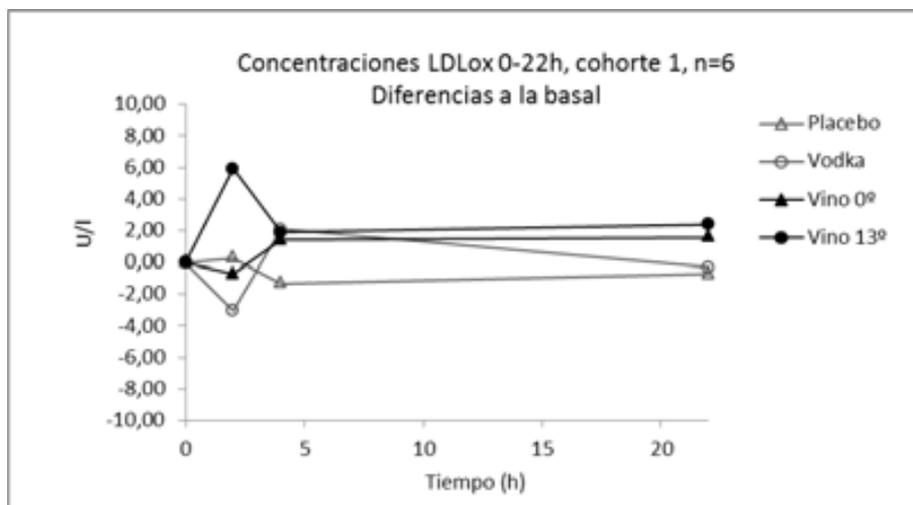


No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en esta cohorte.

## Resultados

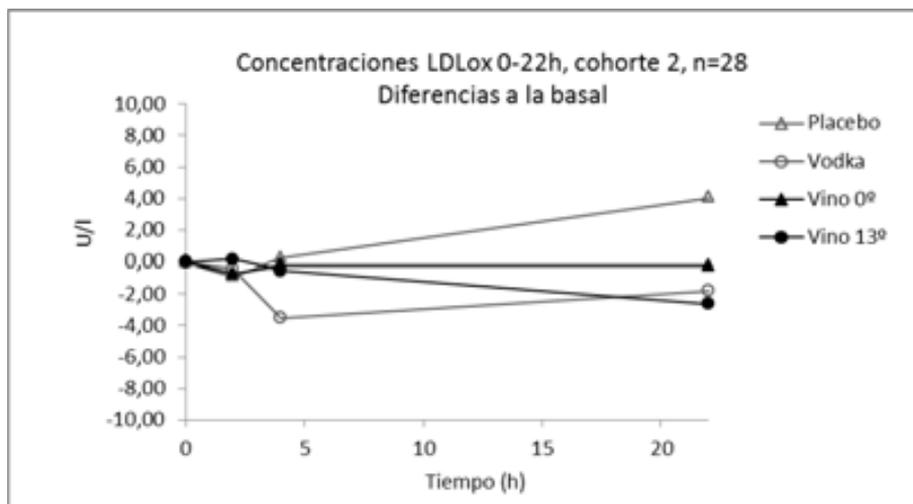
### 8.2.20.2. LDL oxidada

Figura 74. Concentraciones de LDL oxidada en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 1, 30 g.



No hubo diferencias entre tratamientos en la cohorte 1.

Figura 75. Concentraciones de LDL oxidada en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 2, 15 g



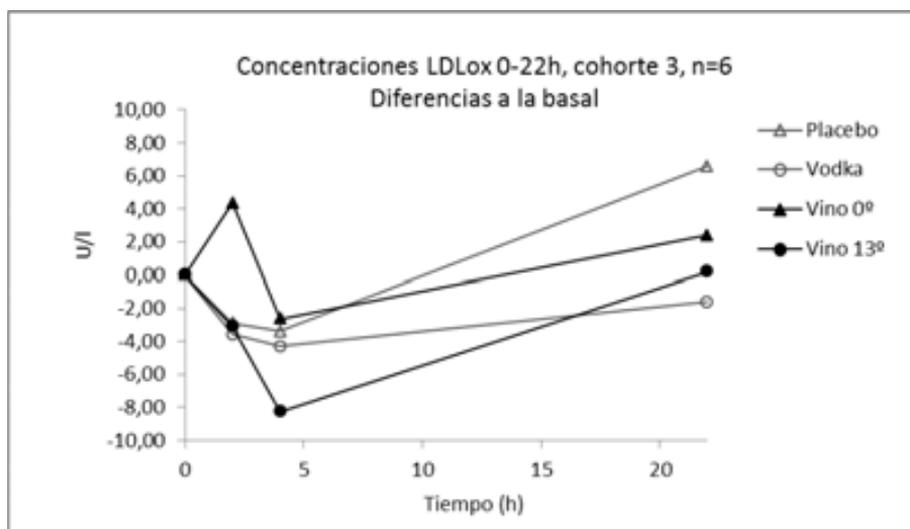
## Resultados

Tabla 65. Parámetros cinéticos de 0-22 h para LDLox en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$C_{max}$ (U/l)	2,1	14,8	-3,7	14,7	-1,3	14,3	-0,3	14,7
AUC (U x h/l)	37,0	166,0	-52,2	189,0	-6,0	203,0	-28,3	127,0
$T_{max}$ (h)	4 (2-22)		4 (2-22)		4 (2-22)		4 (2-22)	

A las 4 h se observó menor oxidación de las LDL con el vodka. A las 22 h hubo menos LDL oxidada en los grupos vino y vodka que en placebo. Sin embargo estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. Tampoco hubo diferencias en los parámetros cinéticos.

Figura 76. Concentraciones de LDL oxidada en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 3, 15 g.



La tendencia del vino a reducir la LDLox a las 4 h, y las diferencias entre placebo y resto de condiciones a las 22 h en esta cohorte tampoco llegaron a ser estadísticamente significativas.

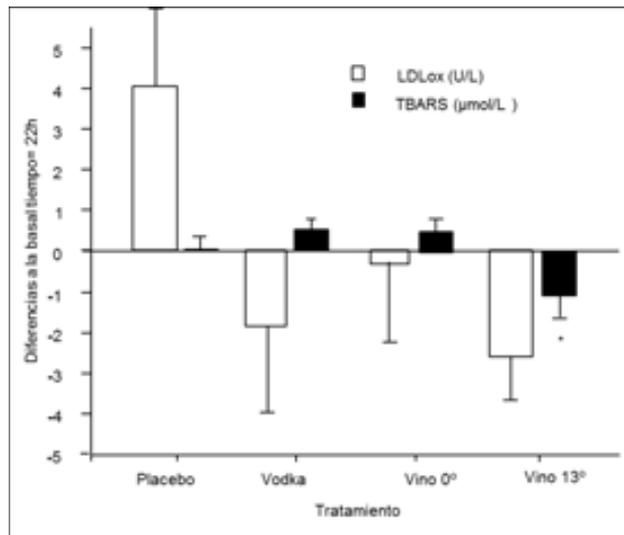
## Resultados

### 8.2.20.3 Resumen de biomarcadores de oxidación

En resumen, se detectaron una disminución de las TBARS y de la LDL oxidada con el vino a las 22 horas en la cohorte 2, que no se apreció a dosis superiores. Esta diferencia fue estadísticamente significativa respecto a los tratamientos comparadores sólo para la primera de las variables.

En la siguiente figura se pueden observar las TBARS y LDLox a las 22 h con los 4 tratamientos en la cohorte 2.

Figura 77. Biomarcadores de oxidación a las 22 h.



### **8.2.21 Correlación entre los parámetros de oxidación e hidroxitirosol**

Para la cohorte 2 se correlacionó el AUC de TBARS y LDLox con la excreción de hidroxitirosol de 0 a 6 h. En el vino de 13<sup>o</sup> se observó una correlación negativa baja entre la recuperación de hidroxitirosol de 0 a 6h (logaritmizada) y el AUC de TBARS ( $r=-0,386$   $p=0,042$ ).

A su vez se estudió si había correlación entre las LDLox y TBARS a las 22 h con la excreción urinaria de 0 a 6h de hidroxitirosol con el vino. Se observó correlación con la TBARS a las 22 h ( $r=-0,448$   $p=0,017$   $n=28$ ) pero no con la LDLox.

## 8.2.22 Biomarcadores de inflamación

### 8.2.22.1. Proteína C reactiva

Para esta variable, ya que apenas hubo cambios, se muestran sólo gráficamente los resultados de la cohorte 2.

Figura 78. Concentraciones de PCR en sangre de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.

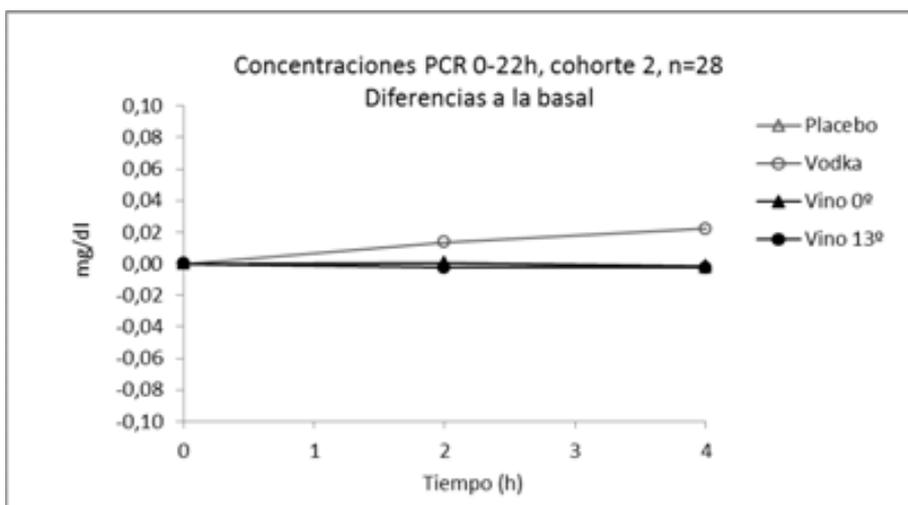


Tabla 66. Parámetros cinéticos de 0-22 h para PCR en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$C_{max}$ (mg/dl)	-0,01	0,05	-0,04	0,16	0,00	0,05	0,03	0,15
AUC (mg xh/dl)	-0,06	0,69	0,62	2,73	-0,01	0,50	0,24	1,49

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para esta variable en ninguna de las tres cohortes.

## Resultados

### 8.2.22.2. Interleucina-6

Para esta variable se muestran sólo gráficamente los resultados de la cohorte 2. En esta cohorte hasta 12 sujetos tuvieron valores indetectables en todas las determinaciones.

Figura 79. Concentraciones de IL-6 en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 2, 15 g.

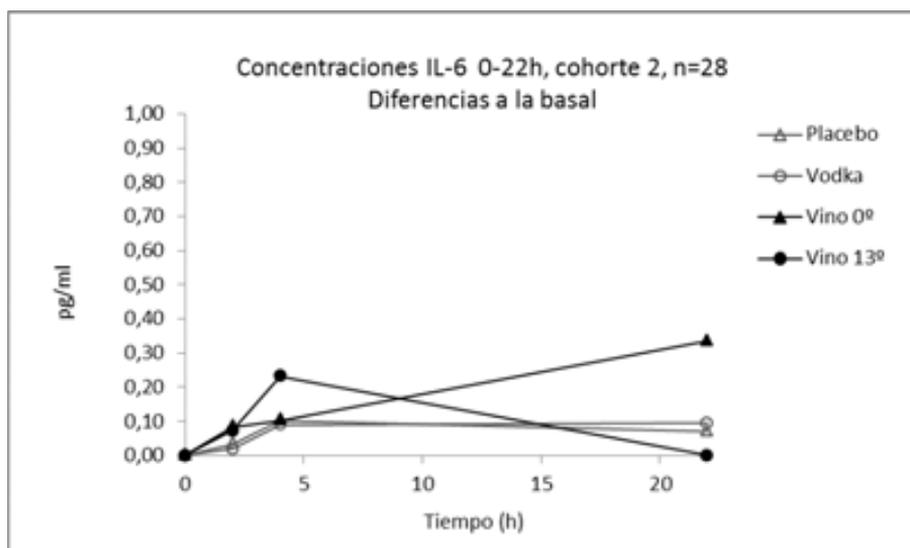


Tabla 67. Parámetros cinéticos de 0-22 h para la IL-6 en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$C_{max}$ (pg/ml)	0,2	0,4	0,2	0,5	0,2	0,6	0,2	1,1
AUC (pg x h/ml)	1,7	3,6	1,8	6,6	4,2	13,3	2,5	12,0
$t_{max}$ (h)	0 (0-22)		0 (0-22)		0 (0-22)		0 (0-4)	

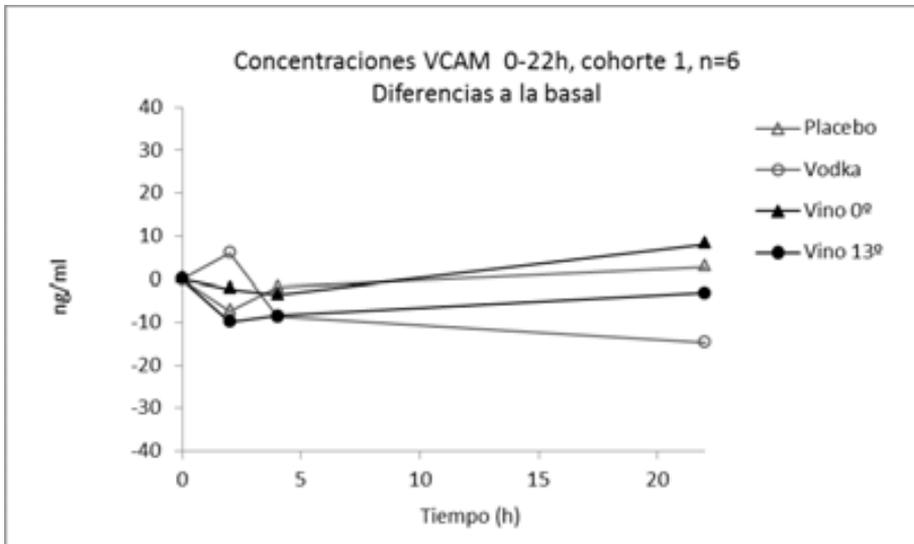
No hubo diferencias estadísticamente significativas para esta variable en ninguna de las tres cohortes. Al haber tantos valores indetectables se hizo un análisis adicional tratando la variable como categórica (detectable

## Resultados

vs. no detectable) mediante el test de  $\chi^2$ , sin hallarse tampoco diferencias entre tratamientos a los diferentes tiempos.

### 8.2.22.3. Molécula de adhesión vascular (VCAM)

Figura 80. Concentraciones de VCAM en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 1, 30 g.



No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en la cohorte 1.

## Resultados

Figura 81. Concentraciones de VCAM en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 2, 15 g.

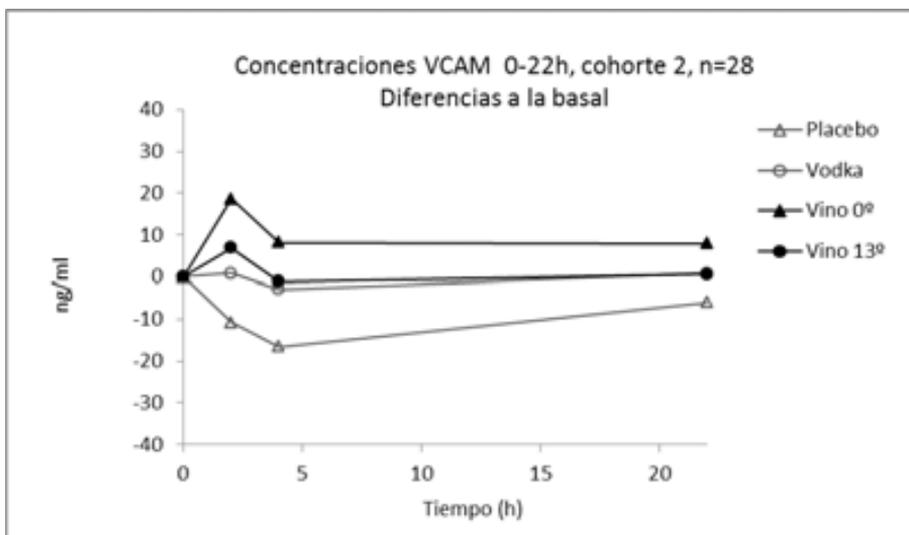


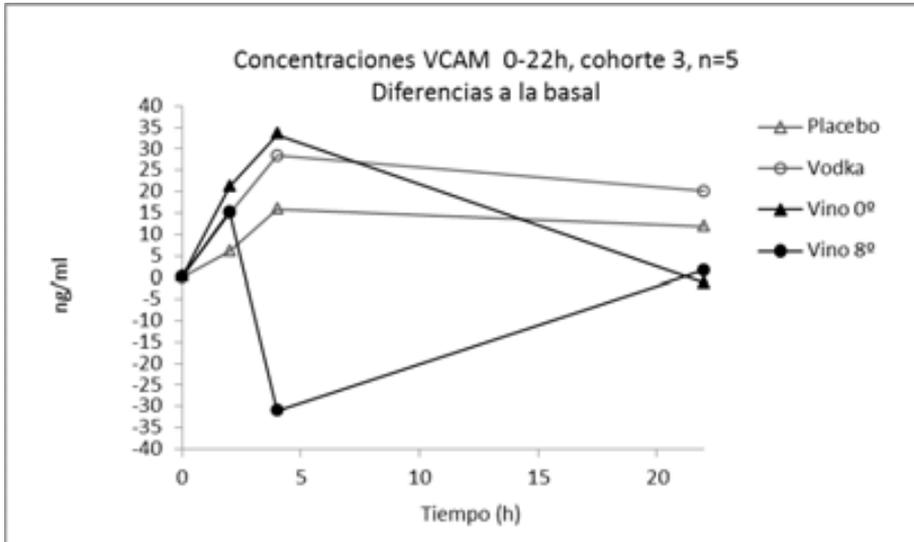
Tabla 68. Parámetros cinéticos de 0-22 h para VCAM en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$C_{max}$ (ng/ml)	-18	55	0,2	5	22	61	9	49
AUC (ng x h/ml)	-241	783	-19	696	189	892	8	589
$t_{max}$ (h)	4 (2-22)		4 (2-22)		4 (2-22)		4 (2-22)	

$C_{max}$  del vino sin alcohol fue superior al placebo (ANOVA global:  $gl$  3,81,  $p=0,013$ , para la comparación concreta:  $p<0,01$ ). No hubo otras diferencias en esta cohorte.

## Resultados

Figura 82. Concentraciones de VCAM en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 3, 15 g.

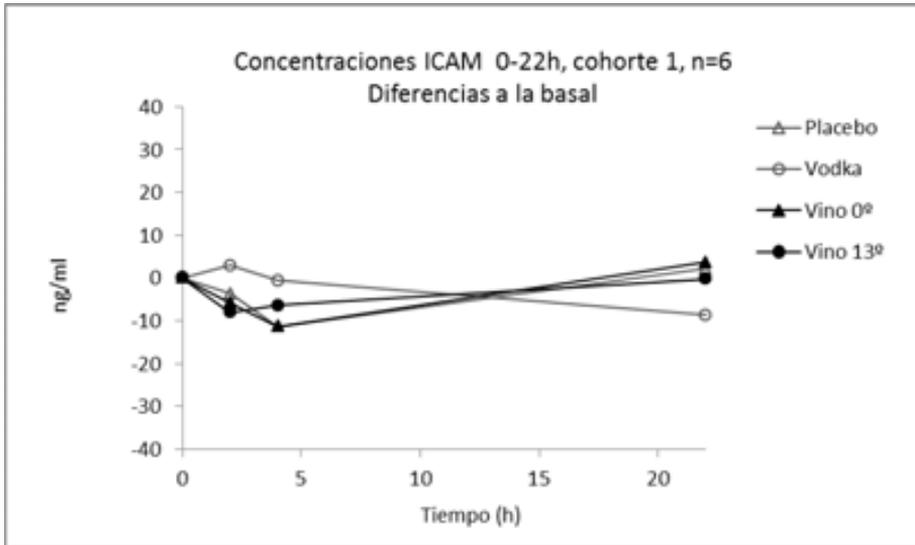


Hubo diferencias a las 4h entre el vino y los otros tres tratamientos ( $p$  de la interacción tiempo x tratamiento=0,002, gl 6, 24, 4 h: V-P, A, D).

## Resultados

### 8.2.22.4. Molécula de adhesión intercelular (ICAM)

Figura 83. Concentraciones de ICAM en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 1, 30 g.



No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en la cohorte 1.

## Resultados

Figura 84. Concentraciones de ICAM en sangre de 0 a 22h en la cohorte 2, 15 g.

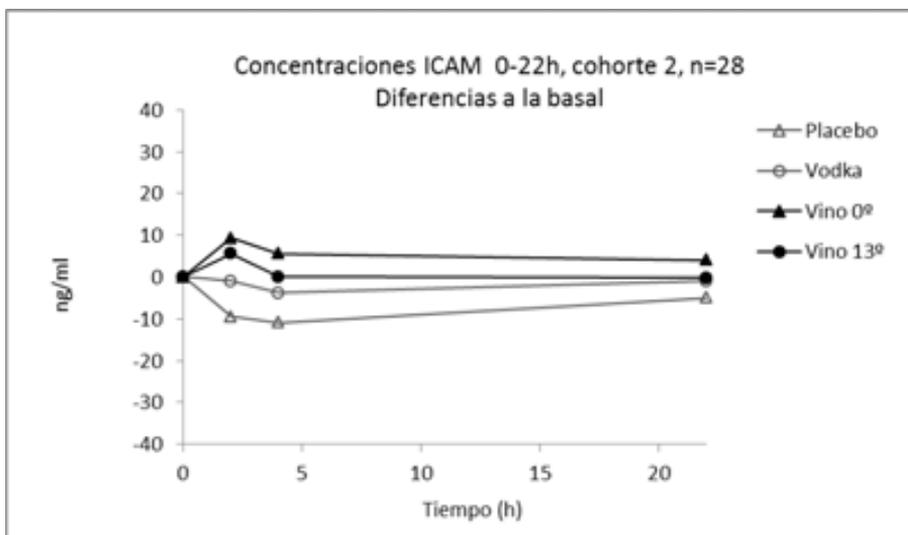


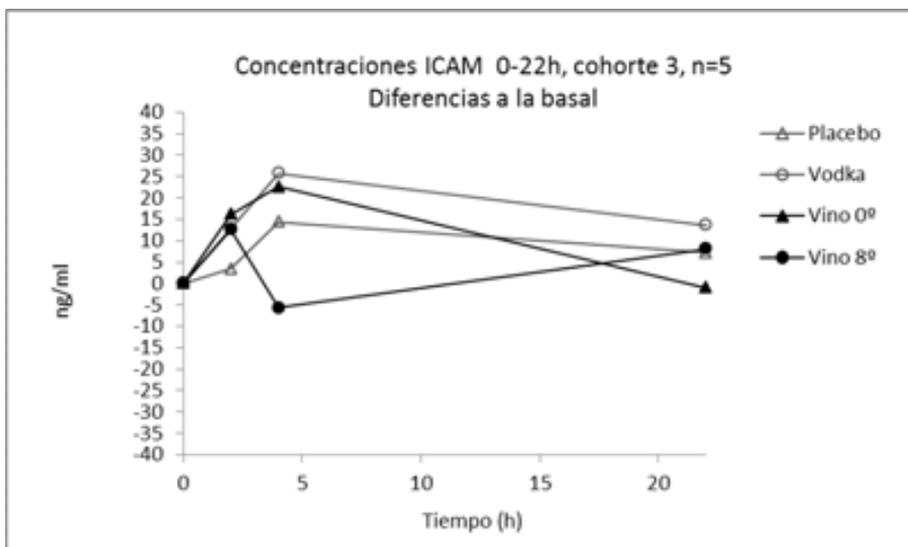
Tabla 69. Parámetros cinéticos de 0-22 h para ICAM en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$C_{max}$ (ng/ml)	-14	350	-1	34	9	36	5	27
AUC (ng x h/ml)	-173	522	-48	414	111	537	10	335
$t_{max}$ (h)	4 (2-22)		4 (2-22)		4 (2-22)		4 (2-22)	

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en la cohorte 2.

## Resultados

Figura 85. Concentraciones de ICAM en sangre de 0 a 22 h en la cohorte 3, 15 g



Hubo diferencias a las 4 h entre el vino y los otros tres tratamientos (p de la interacción tiempo x tratamiento=0,002, gl 3,36, 4h: V-P, A,D). Estas diferencias se debieron a un solo sujeto.

### 8.2.22.5. Resumen de biomarcadores de inflamación

No hubo ninguna diferencia detectable entre tratamientos para IL-6 y PCR. Las moléculas de adhesión endotelial (VCAM e ICAM) mostraron una tendencia a menores concentraciones con el vino en las cohortes 1 y 3, significativa en algún punto (4 h). En la cohorte 2 no hubo diferencias y la tendencia fue justo la contraria, un aumento de estas moléculas con el vino y el vino desalcoholizado.

## Resultados

### 8.2.23 Constantes vitales

#### 8.2.23.1. Presión arterial sistólica

Figura 86. PAS de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g.

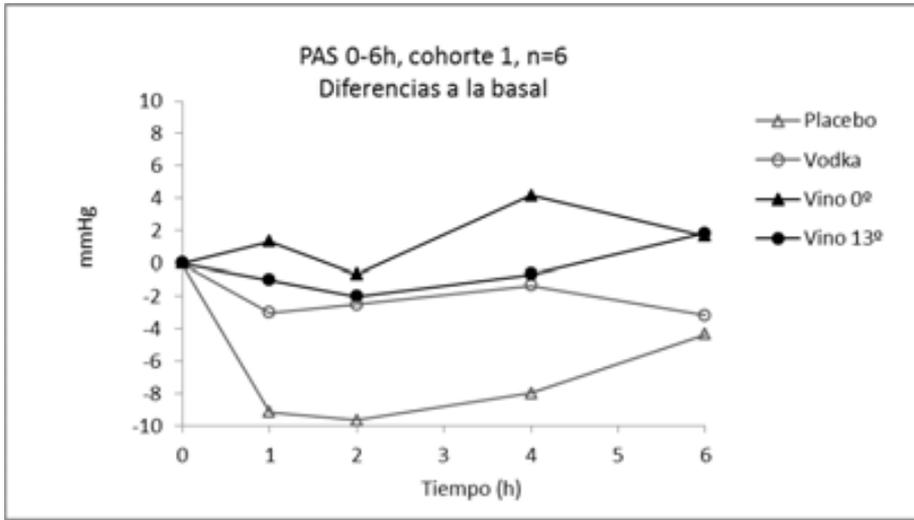
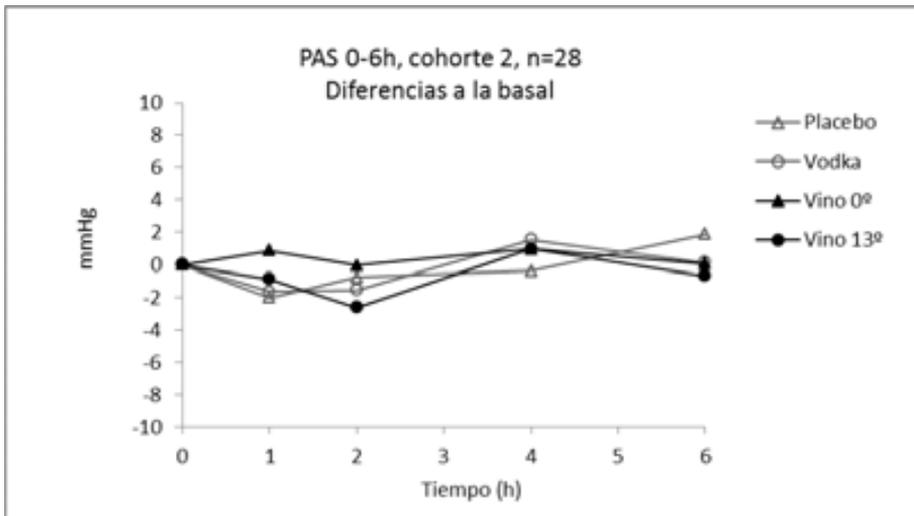


Figura 87. PAS de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.

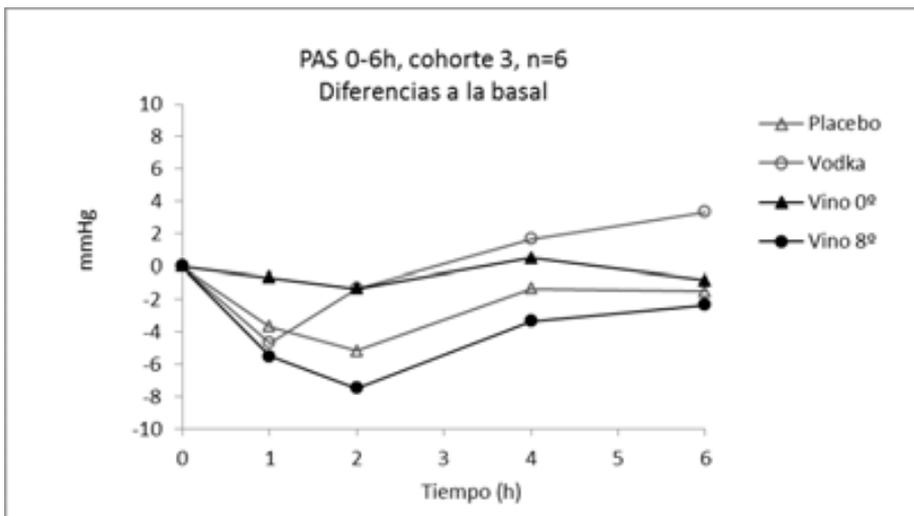


## Resultados

Tabla 70. Parámetros cinéticos de 0-6 h para PAS en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$E_{\max}$ (mmHg)	-1,6	8,6	-0,4	8,2	-0,2	9,1	-0,07	10,00
AUC (mmHg x h)	-2,0	22,2	-0,7	20,9	2,8	25,7	-3,5	31,1
$t_{\max}$ (h)	4 (1-6)		3 (1-6)		2 (1-6)		2 (1-6)	

Figura 88. PAS de 0 a 6 h en la cohorte 3, 15 g.



No se observaron diferencias en ninguna de las tres cohortes entre las diferentes condiciones de tratamiento para esta variable, ni en el curso temporal ni en los parámetros cinéticos.

## Resultados

### 8.2.23.2 Presión arterial diastólica

Figura 89. PAD de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g.

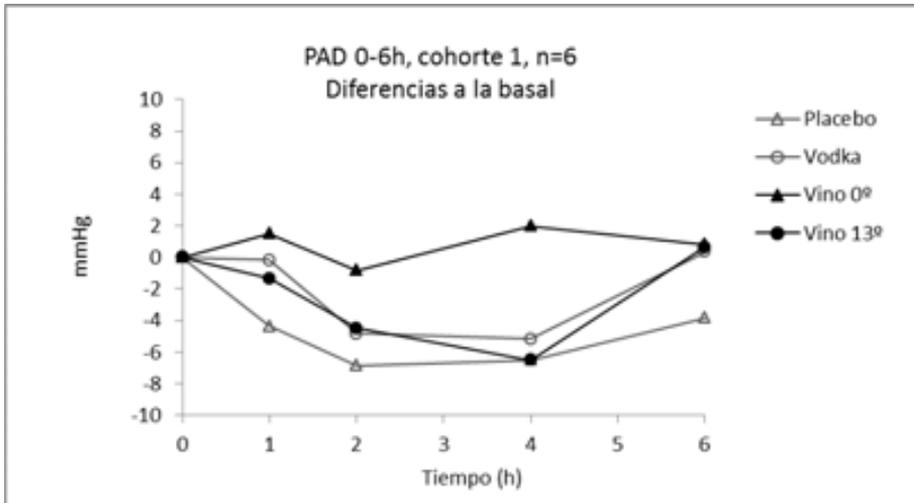
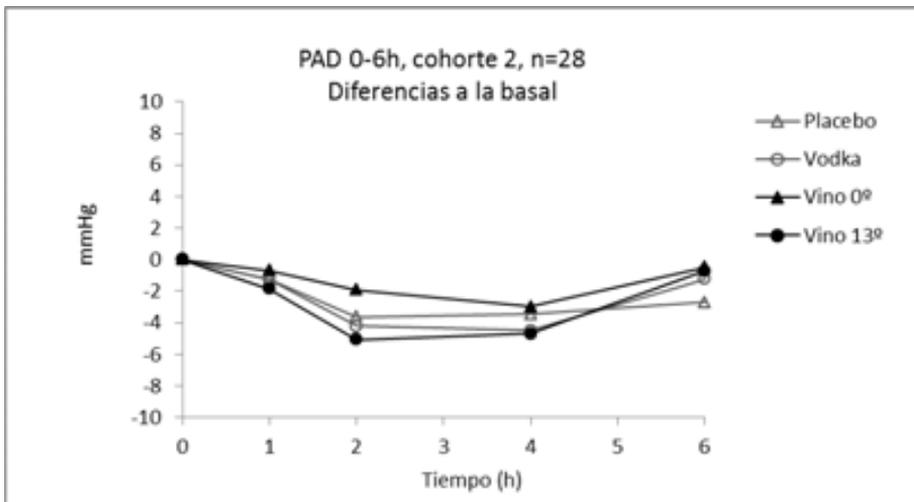


Figura 90. PAD de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.

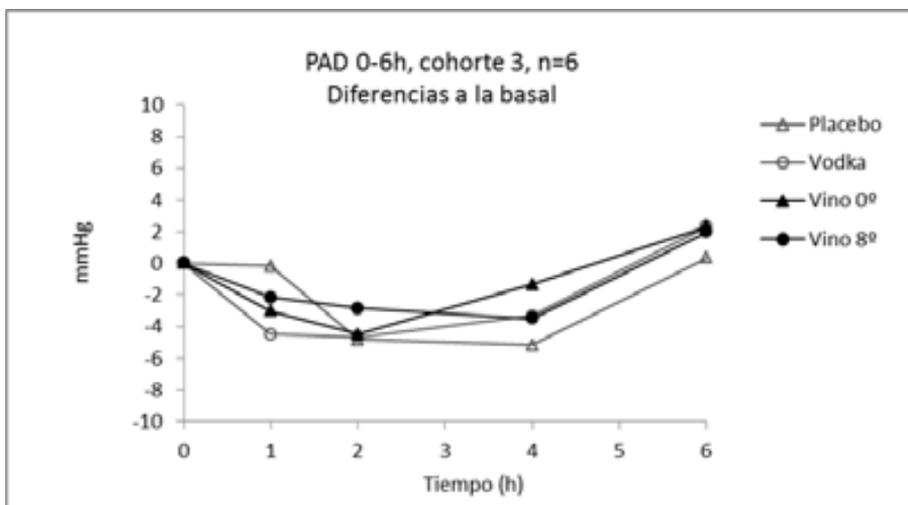


## Resultados

Tabla 71. Parámetros cinéticos de 0-6 h para PAD en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$E_{\max}$ (mmHg)	-4,6	7,8	-5,4	6,8	-3,2	7,8	-6,1	6,5
AUC (mmHg x h)	-16,3	25,7	-17,8	22,5	-10,0	25,2	-19,5	18,4
$t_{\max}$ (h)	4 (1-6)		2 (1-6)		2 (1-6)		2 (1-6)	

Figura 91. PAD de 0 a 6 h en la cohorte 3, 15 g.

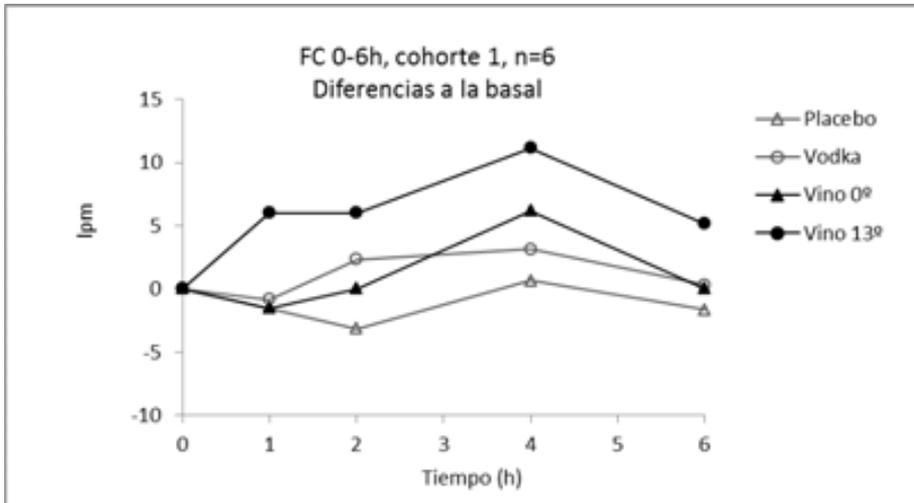


No se observaron diferencias en ninguna de las tres cohortes entre las diferentes condiciones de tratamiento para esta variable. Ni para los parámetros cinéticos ni para el curso temporal.

## Resultados

### 8.2.23.3 Frecuencia cardíaca

Figura 92. FC de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g.



Se observó un aumento de la FC con el vino respecto al resto de condiciones. Estas diferencias fueron significativas respecto al placebo para  $E_{\max}$  (ANOVA gl 3,15, p global=0,012, P-V), AUC (ANOVA gl 3,15, p global =0,016, p-v) y a las 4 h (ANOVA gl 3,81, p global=0,008 p-v).

## Resultados

Figura 93. Frecuencia cardíaca de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.

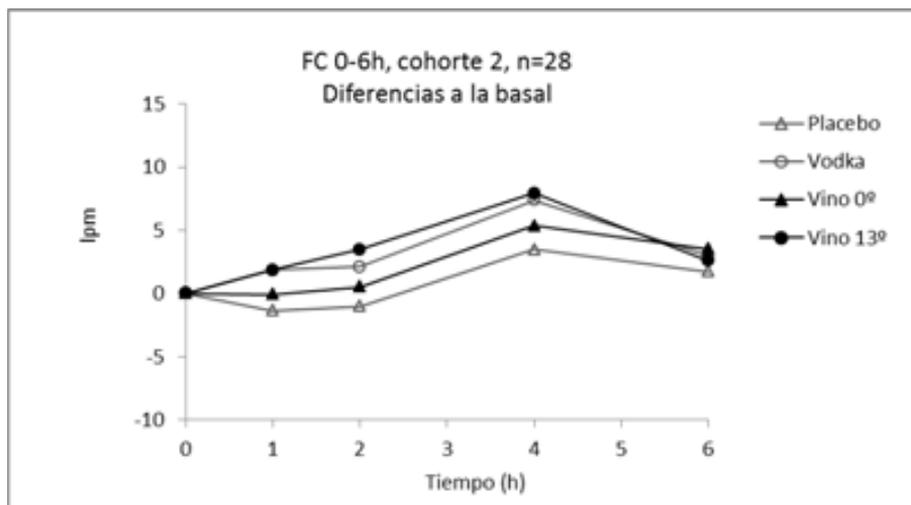


Tabla 72. Parámetros cinéticos de 0-6 h para FC en la cohorte 2.

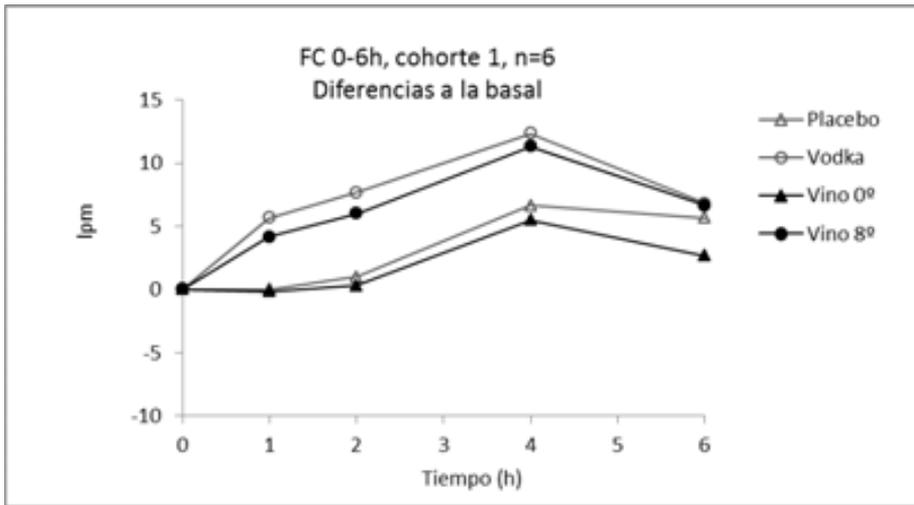
	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$E_{\max}$ (lpm)	2,9	6,9	7,7	7,0	5,5	7,9	8,0	9,1
AUC (lpm x h)	5,9	20,7	22,8	22,1	15,1	25,8	25,6	33,0
$t_{\max}$ (h)	4 (1-6)		4 (1-6)		4 (1-6)		4 (1-6)	

Se produjo un aumento de la frecuencia cardíaca superior en las dos bebidas alcohólicas que en las dos sin alcohol.

El AUC del vino fue superior al placebo (ANOVA gl: 3,81 p global=0,019,  $p < 0,05$  para la comparación concreta). Hubo diferencias también a 1 h, 2 h y 4 h entre el placebo y ambas bebidas alcohólicas, y a las 2 y 4 h entre los dos vinos (p de la interacción tiempo x tratamiento=0,009, gl 12,324, 1,2,4 h: P-E,V, 2,4 h: d-v).

## Resultados

Figura 94. FC de 0 a 6 h en la cohorte 3, 15 g.



Las dos condiciones con etanol obtuvieron cifras más altas de FC que las bebidas no alcohólicas a lo largo de las sesiones experimentales. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para distintas comparaciones en  $E_{max}$  (ANOVA gl 3,15,  $p_{global}=0,006$ , E-D, d-w) y AUC (ANOVA gl 3,15,  $p_{global}=0,004$ , E-D, d-w, p-e).

## Resultados

### 8.2.23.4 Temperatura oral

Figura 95. Temperatura oral de 0 a 6 h en la cohorte 1, 30 g.

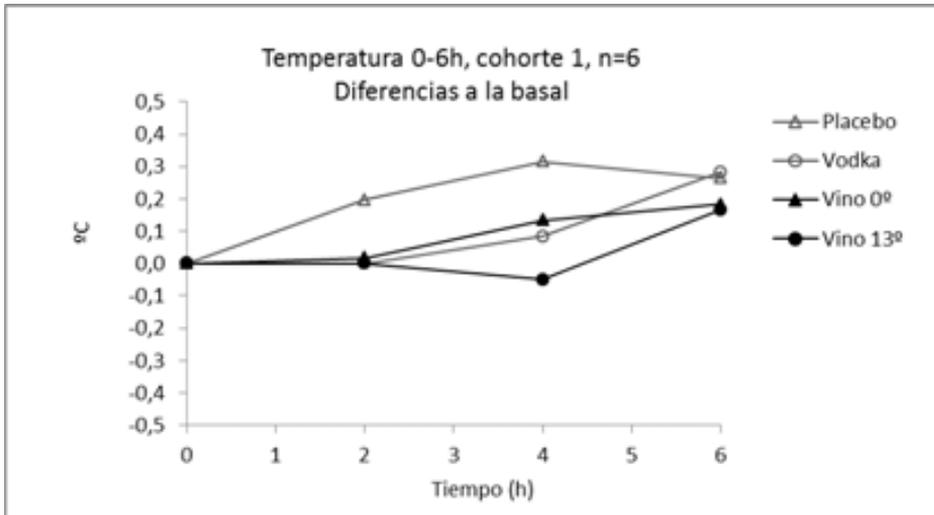
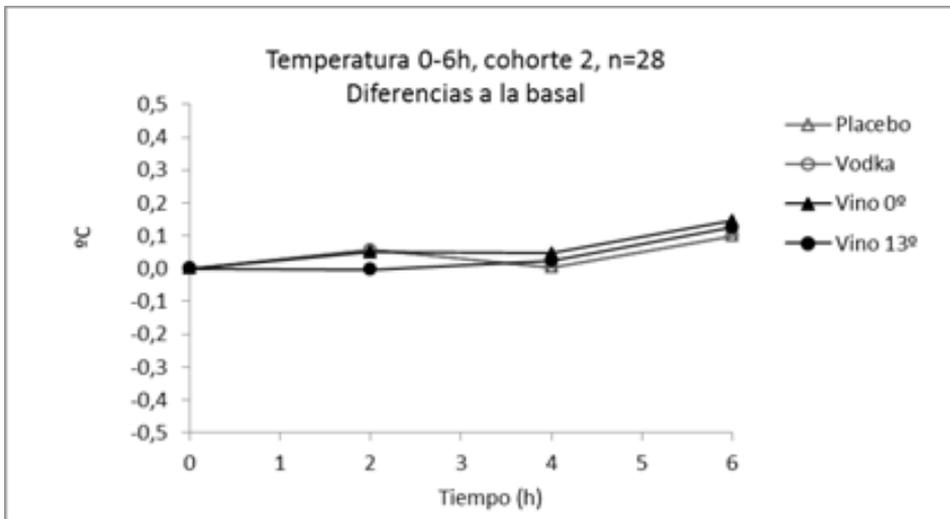


Figura 96. Temperatura oral de 0 a 6 h en la cohorte 2, 15 g.

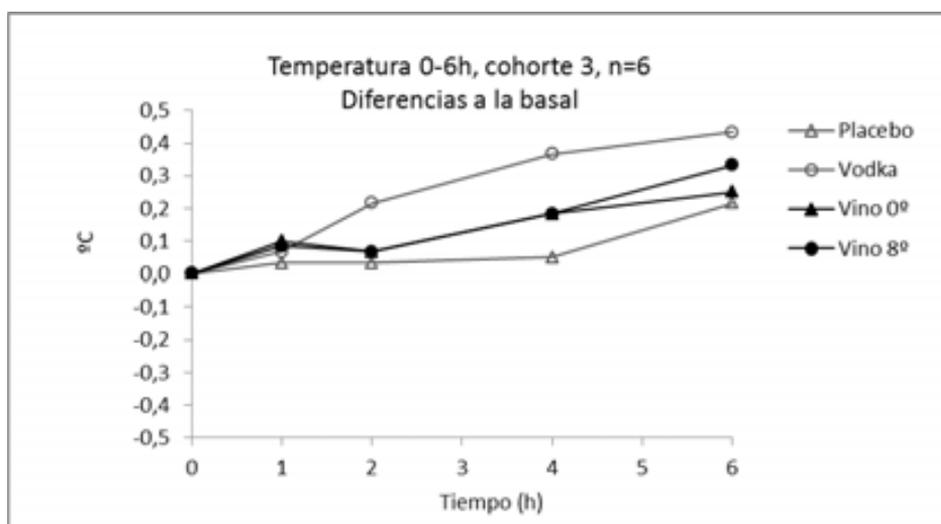


## Resultados

Tabla 73. Parámetros cinéticos de 0-6 h para la temperatura oral en la cohorte 2.

	Placebo		Vodka		Vino 0		Vino	
$E_{max}$ ( C)	0,1	0,4	0,1	0,4	0,2	0,3	0,7	0,3
AUC ( C x h)	0,5	1,1	0,5	1,1	0,5	0,6	0,5	1,2
$t_{max}$ (h)	4 (1-6)		4 (1-6)		4 (1-6)		4 (1-6)	

Figura 97. Temperatura oral de 0 a 6h en la cohorte 3, 15 g.



No hubo diferencias entre tratamientos para los parámetros cinéticos ni a lo largo del tiempo en las tres cohortes para la temperatura oral.

## *Resultados*

### *8.2.23.5 Resumen de constantes vitales*

A modo de resumen en las constantes vitales se apreció un aumento de la frecuencia cardíaca superior en las dos bebidas con alcohol. Este hecho se constató en las dos cohortes con 15 g mientras que para la de 30 g el vino fue la bebida que destacó frente al resto. En las otras constantes no hubo cambios estadísticamente significativos.

### **8.2.24 Acontecimientos adversos**

En este estudio (incluyendo las tres cohortes) se reportaron un total de 26 AA en 24 sujetos. De todos ellos 14 fueron considerados posiblemente relacionados con el tratamiento y 3 probablemente relacionados. Entre los 3 probables dos de ellos eran cefaleas por consumo de etanol y vino y un mareo en la condición vino (los tres aparecieron con 15 g de etanol). No apareció ningún acontecimiento grave y/o inesperado.

El acontecimiento adverso más frecuente fue la cefalea (11 de 26 AA).

Los distintos tratamientos fueron pues bien tolerados.



### **8.3. COMPARACIÓN EXCRECIÓN DE FENOLES ENTRE DOPET 1 Y DOPET 2**

En los dos estudios se administró una condición que solamente tenía alcohol diluido en agua (vodka o alcohol de grado farmacéutico). Se ha realizado una comparación de los resultados de ambos estudios para esta condición común.

Se indican además las similitudes y diferencias entre el diseño de los dos estudios y se comprueba si las estimaciones de la excreción de los fenoles hechas con el primer estudio son válidas para mismas dosis de alcohol del segundo.

En el primer estudio se administraron 6, 12, 18, 24, 30 y 42 g de etanol en forma de solución hidroalcohólica de alcohol etílico grado farmacéutico + agua (en total 150 ml). La dosis de 18 y 30 g se administraron a 12 sujetos y el resto a 6 sujetos.

En el segundo estudio se administraron 15 o 30 g de etanol en forma de solución hidroalcohólica de vodka + agua. Se administraron 293 ml de solución en la cohorte 1 (30 g), 147 ml en la cohorte 2 (15 g) y 235 ml en la cohorte 3 (15 g).

En el primer estudio los sujetos hicieron una dieta sin alcohol ni aceite de oliva mientras que en el segundo la dieta pautada fue una dieta pobre en fenoles, que incluye otras restricciones dietéticas además de las anteriores, y reduce la cantidad a consumir de algunos alimentos.

En el segundo estudio los sujetos recibieron el alcohol después de haber tomado 300 ml de agua dos horas antes, para asegurar que el hidroxitirosool remanente en la orina fruto de la cena del día anterior estuviera eliminado antes de empezar el estudio.

## Resultados

Tanto los procedimientos en la recogida de muestras como la técnica analítica fueron comunes en ambos estudios para el hidroxitirosol y el tirosol.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de la excreción de hidroxitirosol de 0 a 6 h en los dos estudios.

Tabla 74. Excreción de hidroxitirosol total en ambos estudios

Estudio, cohorte	Dosis alcohol (n)	OHTyr 0-6 h Media $\pm$ DE (nmoles)
DOPET 1	12 g (4)	513 $\pm$ 256
	18 g (9)	577 $\pm$ 288
	30 g (9)	844 $\pm$ 802
DOPET 2, 1	30 g (6)	429 $\pm$ 226
DOPET 2, 2	15 g (28)	841 $\pm$ 613
DOPET 2, 3	15 g (6)	546 $\pm$ 240

La excreción de hidroxitirosol con 15 g de alcohol fue superior en el segundo estudio (cohorte 2) en comparación con las dosis de 12 y 18 g del primero y para la dosis de 30 g sucedió justo al contrario. Pero ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa (t-Student de datos independientes, todas las  $p > 0,05$ ).

El primer factor que podría explicar estas ligeras variaciones entre los dos estudios y se debía descartar fueron las concentraciones de alcohol. A continuación se detallan las alcoholemias obtenidas para los sujetos que tenían determinados también los fenoles.

## Resultados

Tabla 75. Alcoholemias en ambos estudios.

Estudio, cohorte	Dosis alcohol (n)	C <sub>max</sub> (μmol/l)	AUC (μmol x h / l)
DOPET 1	12 g (4)	3,7 ± 3,1	7,2 ± 3,0
	18 g (9)	5,2 ± 3,7	10,1 ± 1,1
	30 g (9)	8,6 ± 5,7	23,0 ± 5,9
DOPET 2, 1	30 g (6)	7,8 ± 1,5	18,4 ± 3,3
DOPET 2, 2	15 g (28)	4,8 ± 1,2	7,7 ± 2,0
DOPET 2, 3	15 g (6)	4,6 ± 1,0	7,6 ± 1,4

A igualdad de dosis las alcoholemias obtenidas en los dos estudios fueron muy similares y por tanto no justificaron diferentes excreciones de hidroxitirosol.

Si se tenían en cuenta las estimaciones realizadas con los datos del DOPET 1 se podía comprobar que la excreción de OHTyr en las cohortes 1 y 2 de DOPET 2, estaba fuera de los intervalos de confianza del 95% calculados (ver en siguiente tabla IC 95% DOPET 1 en cursiva). Esto se debió probablemente a que en DOPET 1 las estimaciones se hicieron con una muestra pequeña por dosis y a la gran variabilidad interindividual.

Tabla 76. Congruencia con las estimaciones de DOPET 1

Estudio, cohorte	Dosis alcohol (n)	OHTyr 0-6 h Media ± DE (nmoles)
DOPET 2, 1	30 g (6)	429 ± 226 (509-942)
DOPET 2, 2	15 g (28)	841 ± 613 (361-618)
DOPET 2, 3	15 g (6)	546 ± 240 (361-618)

## Resultados

El otro fenol de interés a comparar entre estudios es el tirosol. Los datos de excreción de tirosol obtenidos con ambos estudios se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 77. Excreción de tirosol total en ambos estudios.

Estudio, cohorte	Dosis alcohol (n)	Tyr 0-6h Media $\pm$ DE (nmoles)
DOPET 1	12 g (4)	115,4 $\pm$ 113,3
	18 g (9)	335,4 $\pm$ 719,5
	30 g (9)	307,1 $\pm$ 279,7
DOPET 2, 1	30 g (6)	137,8 $\pm$ 67,9
DOPET 2, 2	15 g (28)	98,3 $\pm$ 80,2
DOPET 2, 3	15 g (6)	72,6 $\pm$ 49,4

En ambos estudios, en términos generales, se observó que a mayor dosis de alcohol se producía mayor excreción de tirosol (exceptuando para los 18 g y 30 g de DOPET 1 que tuvieron excreciones similares). De nuevo al comparar dosis entre estudios (12 g vs. 15 g, 18 g vs. 15 g) o idénticas (para los 30 g) no hubo diferencias estadísticamente significativas en la excreción de tirosol (t-Student datos independientes todas las  $p > 0,05$ )

Teniendo en cuenta las estimaciones realizadas con el DOPET 1 se observó que la excreción de Tyr en las cohortes 2 y 3 estaba dentro de los IC calculados (ver en siguiente tabla IC 95% DOPET1 en cursiva).

## Resultados

Tabla 78. Congruencia con las estimaciones de DOPET 1

Estudio, cohorte	Dosis alcohol (n)	Tyr 0-6h
		Media $\pm$ DE (nmoles)
DOPET 2, 1	30 g (6)	137,8 $\pm$ 67,9 (181-362)
DOPET 2, 2	15 g (28)	98,3 $\pm$ 80,2 (93-154)
DOPET 2, 3	15 g (6)	72,6 $\pm$ 49,4 (93-154)



## 9. DISCUSIÓN

En la introducción de esta memoria ya se ha comentado que el alcohol a dosis moderadas reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular. La cuestión es si parte de estos efectos beneficiosos pueden atribuirse a su capacidad de generar hidroxitirosol. Para poder responder a esta pregunta el primer paso ha sido demostrar en estudios experimentales en humanos que efectivamente tras el consumo de alcohol se genera hidroxitirosol (DOPET 1).

Existe mucha controversia en si atribuir los efectos beneficiosos sobre la salud al alcohol propiamente o al tipo de bebida alcohólica consumida. Por este motivo, y porque el vino tiene la particularidad de contener una pequeña cantidad de hidroxitirosol, se diseñó un segundo estudio en el que se comparaban distintas bebidas alcohólicas (vino y vodka) con sus respectivos placebos (vino sin alcohol y agua) en términos de excreción de hidroxitirosol. La idea era estudiar la contribución de cada uno de los componentes del vino (fenoles y alcohol) en la excreción de hidroxitirosol.

Teniendo en cuenta que el vino contiene hidroxitirosol *a priori* se esperaba que las cantidades de este fenol en orina serían algo superiores a las obtenidas con el alcohol solo (vodka). Sin embargo, en el estudio DOPET 2, el cambio obtenido con el vino en la excreción de hidroxitirosol no fue pequeño sino sustancial.

El hallazgo más importante del primer estudio fue pues la confirmación que tras la ingesta de alcohol se genera OHTyr, y a su vez, que la relación entre la excreción de hidroxitirosol y el alcohol es dosis dependiente. La excreción de hidroxitirosol en el segundo estudio siguió el orden: vino>vino sin alcohol>vodka>placebo. De los resultados del segundo estudio destacó que tras la ingesta de vino también se generaba hidroxitirosol, y que la cantidad recuperada del mismo en orina, teniendo en cuenta la cantidad administrada, era muy superior a la

## *Discusión*

esperada. Este hecho ya se había constatado previamente, aunque en un estudio diseñado con otra finalidad, evaluar la biodisponibilidad y efectos del resveratrol (de la Torre 2006).

De hecho la excreción de OHTyr en orina obtenida con el vino en el estudio DOPET 2 fue superior a la suma de la cantidad excretada por los fenoles sin alcohol (vino sin alcohol) y la generada por el alcohol solo (vodka). Este hecho sugiere que tiene que haber algún mecanismo adicional al ya sugerido para el alcohol (desvío del metabolismo oxidativo de la dopamina) para generar hidroxitirosol en el caso del vino.

Para poder resolver esta incógnita se diseñó un estudio en animales (ratas) cuyo principal hallazgo fue que parte del tirosol que se administraba a las ratas se recuperaba en forma de hidroxitirosol.

Finalmente, para poder contextualizar los resultados obtenidos del estudio DOPET 2 en cuanto a cantidad de hidroxitirosol recuperada, se compararon sus resultados con un estudio de aceite. La cantidad de hidroxitirosol recuperada en orina fue superior con una copa de vino que con 50 ml de aceite.

Si parte de los efectos benéficos para la salud del aceite se pueden atribuir a su contenido en fenoles, y concretamente al hidroxitirosol (Covas 2006a), es posible que en el caso del vino suceda lo mismo. Las cantidades de hidroxitirosol recuperadas tras consumir una sola copa serían suficientes.

La discusión de esta memoria de ha dividido en varios apartados, de acuerdo a las variables estudiadas en ambos estudios. Incluye aspectos relacionados con la farmacocinética y farmacodinamia del alcohol (efectos subjetivos, rendimiento psicomotor, constantes vitales), con la dosis de alcohol y los sujetos seleccionados para los estudios, con la excreción de hidroxitirosol y tirosol, y con los efectos de las distintas

## *Discusión*

bebidas sobre algunos biomarcadores (oxidación, inflamación, perfil lipídico y glucosa).

Para no interpretar de forma incorrecta los resultados de los estudios, desde un primer momento es importante recordar que en ningún caso los efectos observados pueden atribuirse directamente al hidroxitirosol, ya que éste no se administró de forma aislada. En todo caso, pueden atribuirse al tipo de bebida consumida y correlacionarse con su capacidad de generar hidroxitirosol. Es por ello que la pregunta sobre si los efectos benéficos del alcohol/vino se deben a su capacidad de generar hidroxitirosol, deberá ser contestada en futuros estudios. Con nuestros datos podemos proporcionar evidencia indirecta de que efectivamente es así.

### **9.1. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL ETANOL**

En los dos estudios se administraron dosis entre 6 y 42 g de alcohol. Las concentraciones de alcohol en sangre obtenidas, como era de esperar, aumentaron con la dosis de alcohol administrada. En el DOPET 1 la  $C_{max}$  siguió una relación lineal con la dosis mientras que el AUC la relación dejó de ser lineal a dosis elevadas. Este hecho ya se había constatado en estudios previos y se atribuye, entre otras cosas, a cambios en la razón de extracción hepática con la concentración de la bebida y a la capacidad limitada de eliminación del alcohol mediante la alcohol deshidrogenasa. En nuestros estudios también se ha observado que la  $t_{max}$  del alcohol se retrasa en las dosis más altas en comparación con las bajas. Se ha descrito también previamente que en las bebidas más concentradas el alcohol se absorbe más lentamente por una inhibición del vaciado gástrico (Wilkinson 1977, Holford 1987).

Por otro lado, en DOPET 2 se observó que la misma cantidad de alcohol administrada en forma de vodka o vino producía alcoholemias muy similares. Este hecho permitió una comparación no sesgada entre el vino y el vodka en cuanto a la generación de hidroxitirosol. Diferencias en las concentraciones de alcohol por sí mismas podrían haber ocasionado diferencias en la excreción de los fenoles.

Para la alcoholemia no hubo diferencias entre las dos bebidas en las tres cohortes para ninguno de los parámetros cinéticos. Esto sucedió porque ambas se administraron en las mismas condiciones (misma concentración de alcohol, mismo volumen y a lo largo de cinco minutos).

Por otro lado, las concentraciones de alcohol en la tercera cohorte (8°,15 g) fueron ligeramente inferiores a las obtenidas con la cohorte 2 (13°,15 g). Las diferencias en los volúmenes y concentraciones de alcohol en las bebidas entre una y otra cohorte podrían explicar este

## *Discusión*

hecho. De todos modos esas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En la cohorte 1 con 30 g, como era de esperar las alcoholemias fueron superiores que en las dos cohortes con 15 g.

Del mismo modo que con las concentraciones, en DOPET 1 también se observó que los efectos subjetivos del alcohol dependían de la dosis administrada (Gengo 1990).

Las distintas dosis produjeron síntomas leves de intoxicación. Los efectos máximos se obtuvieron con la dosis de 42 g ( $E_{\max}$  38,5 mm). Sin embargo, algunos sujetos con dosis inferiores puntuaron más de 50 mm. Esta gran variabilidad interindividual se debió probablemente a la diferente tolerancia al alcohol entre individuos, que en parte depende de sus experiencias previas. El carácter doble-ciego del estudio podría tener también un papel, ya que los sujetos no sabían las dosis que iban a recibir. El hecho de que con la dosis de 12 g se alcanzaran valores superiores que con 18 g en algunos puntos (ver curso temporal) se explica porque se trataba de distintos sujetos. La correlación entre los parámetros cinéticos de las concentraciones y los efectos subjetivos, por todo lo comentado previamente, aunque existente, no fue de gran magnitud.

En el DOPET 2 con las dosis de 15 y 30 g los sujetos reportaron también una leve sensación de borrachera ( $E_{\max} < 20\text{mm}$ ). Como las alcoholemias con el vino y el vodka fueron similares también lo fueron los efectos subjetivos. No hubo diferencias entre dosis (15 g vs 30 g), de nuevo por la diferente tolerancia al alcohol entre individuos y la dificultad para discriminar dosis bajas de alcohol. De hecho, 7 sujetos de los 40 que fueron incluidos en el estudio llegaron a puntuar habiendo recibido vino

desalcoholizado, hecho que confirma el posible papel del diseño a doble-ciego.

El rendimiento psicomotor, evaluado mediante el DSST, no se alteró con la administración de 15 g (0,2g/kg) de alcohol en DOPET 2. De hecho las alcoholemias obtenidas, tanto en sangre como en aire espirado estuvieron por debajo del límite legal de conducción de vehículos en todo momento con esa dosis. Otros estudios tampoco han demostrado cambios en el rendimiento psicomotor con 0,2 g/kg ni con 0,4g/kg, o con 0,7g/kg pero si con 0,8 g/kg de alcohol (Holdstock 1998, Brumback 2007, Hernandez-López, 2002, Abanades 2007).

En DOPET 1, con las distintas dosis de alcohol no se observaron cambios en las constantes vitales. Es importante tener en cuenta que en este estudio las constantes se midieron únicamente a la hora y a las seis horas y por razones de seguridad. Cambios sutiles con tan pocas determinaciones y sujetos podrían haber pasado desapercibidos.

En cambio, en DOPET 2, las constantes vitales constituyeron un parámetro farmacodinámico. Se pudo apreciar que tras la administración de las bebidas con alcohol, tanto con 15 como con 30 g, aumentaba la frecuencia cardíaca, sin cambios en la presión arterial. El alcohol es vasodilatador pero también activa el sistema simpático y por tanto, según la dosis puede reducir o aumentar la presión arterial, y a su vez aumentar la frecuencia cardíaca. Otros estudios en voluntarios sanos con el consumo de dos unidades de bebida estándar tampoco encontraron cambios en la presión arterial pero sí un aumento de la frecuencia cardíaca. No se apreciaron diferencias, como en nuestro caso, al comparar ambos tipos de bebidas alcohólicas (Spaak 2008, 2010).

## **9.2. DOSIS DE ALCOHOL SELECCIONADAS**

En el primer estudio se escogieron distintas dosis de alcohol para poder estudiar la relación entre la dosis de alcohol y la excreción de hidroxitirosol. Estas dosis llegaron hasta el límite diario de consumo de alcohol recomendado en hombres, que son 40 g. Dosis de hasta este límite de 40 g al día han demostrado reducir la mortalidad total (di Castelnuovo 2006) y la cardiovascular con un menor riesgo de infarto de miocardio (Ronksley 2011). En el caso de las mujeres serían dosis inferiores, de hecho en ellas no se recomienda sobrepasar los 20 g de consumo diario. En ambos estudios finalmente no se incluyeron mujeres por lo que todas las dosis estaban en el rango de las descritas como protectoras.

Para el segundo estudio se escogieron dosis inferiores, de 15 correspondientes a 1,5 unidades de bebida estándar de alcohol. Estas dosis se escogieron para corresponderse con la cantidad de alcohol que se sirve habitualmente con una copa de vino. Esta cantidad acostumbra a ser superior a una unidad de bebida estándar y es cercana a 1,5 UBE, como se observó en un estudio previo (Pérez-Mañá 2011). Además, en los estudios observacionales en los que se estudió el efecto del alcohol las dosis más protectoras fueron entre 10 y 20 g (Di Castelnuovo 2006).

En la cohorte 1 se administraron dosis correspondientes a dos copas de vino (3 UBE) con 6 sujetos para estudiar si había un efecto dosis-respuesta en la excreción del hidroxitirosol y en sus efectos con las distintas bebidas administradas.

Dado que los efectos subjetivos producidos por los 15 y 30 g de alcohol en DOPET 2 fueron leves, que no hubo alteración del rendimiento psicomotor y que las bebidas fueron bien toleradas (no se produjeron AA graves ni cambios importantes en las constantes vitales), estas dosis

## *Discusión*

podrían utilizarse en futuros estudios de intervención. En el caso de incluir mujeres la dosis debería limitarse a 20 g de alcohol.

### 9.3. SUJETOS SELECCIONADOS

En DOPET 1 y DOPET 2 se pretendía estudiar principalmente la excreción de hidroxitirosol tras la administración de diferentes bebidas y por eso participaron voluntarios sanos y jóvenes en ambos estudios. Futuros estudios de intervención deberían diseñarse con sujetos de mayor edad y con riesgo de padecer eventos cardiovasculares, que son los que más podrían beneficiarse del consumo leve-moderado de alcohol.

En los dos estudios de esta memoria se decidió no seleccionar mujeres, a pesar de que ambos protocolos contemplaban su inclusión, por varios motivos.

El principal es que dado que con los pilotos del primer estudio se observó gran variabilidad en la excreción de hidroxitirosol al incluir mujeres dicha variabilidad no habría hecho más que aumentar, dificultando estudiar la relación con la dosis en el primer estudio y las diferencias entre bebidas en el segundo.

Es de sobras conocido que existen diferencias en el metabolismo del etanol en función del género (Baraona 2001). Estas diferencias podrían conllevar cambios en la cantidad de hidroxitirosol excretada y dificultar las comparaciones entre dosis en el primero de los estudios. En el segundo estudio, en el que además se evaluó el efecto de las distintas bebidas sobre biomarcadores de oxidación, los estrógenos podrían interferir al ser *per se* antioxidantes (Badeau 2005).

En futuros estudios es necesario incluir mujeres para averiguar si los estrógenos y las diferencias en el metabolismo del alcohol pueden influir tanto en la biodisponibilidad del hidroxitirosol como en sus efectos. Es importante tener en cuenta que las mujeres que probablemente se beneficiarían más del tratamiento con hidroxitirosol serían las

## *Discusión*

menopáusicas, ya que presentan un mayor riesgo de padecer eventos cardiovasculares.

A su vez se decidió excluir de los estudios a sujetos fumadores de más de 10 cigarrillos/día porque no se podía descartar un discreto efecto del tabaco en la farmacocinética del alcohol (Johnson 1991) y porque además parece ser que los fumadores tienen menos cantidad de monoaminoxidasa, enzima responsable del metabolismo de la dopamina (Fowler 2003). Este hecho podría sugerir cambios (reducción) de la generación de hidroxitirosol en estos sujetos. En los futuros estudios de intervención deberán incluirse fumadores ya que en ellos, al tener mayor porcentaje de LDL oxidada (Yamaguchi et al, 2005), los efectos del hidroxitirosol podrían ser más aparentes.

#### **9.4. EXCRECIÓN Y RECUPERACIÓN URINARIA DE FENOLES**

El hidroxitirosol, tras la administración de vino o vodka, se excretó principalmente sulfatado. A diferencia de los estudios con aceite de oliva en los que se excretó sobretodo glucuronizado (Miró-Casas 2003). Este hecho complicó el análisis de las muestras de orina de forma importante, ya que con el primer método escogido para ello (GC/MS) no se detectaba parte de los sulfatos. Las muestras tuvieron que analizarse hasta tres veces, siendo definitivo el último análisis con LC/MS.

Llama la atención que la fracción libre de hidroxitirosol excretada en ambos estudios fue muy pequeña, en comparación con la parte conjugada.

En los estudios con aceite de oliva ya se había observado que la cantidad libre era muy pequeña, probablemente debido a un importante metabolismo de primer paso a nivel gastrointestinal/hepático (de la Torre 2008). Teóricamente la fracción libre es la que tendría que ser responsable de los efectos, de forma análoga a lo que sucede con los medicamentos. Por este motivo, se han propuesto varias teorías para explicar como el OHTyr del aceite puede llegar a producir efectos antioxidantes, a pesar de detectarse concentraciones libres tan bajas del mismo.

La primera explicación sería que el OHTyr conjugado fuera biológicamente activo (Tuck 2002). Sin embargo, al menos para el glucuronizado, ya se demostró que no tenía efectos antioxidantes (Khymentets 2010).

Otra explicación sería que los conjugados pudieran actuar de formas depot y que los fenoles se liberaran del glucurónido o sulfato de forma intracelular.

## *Discusión*

A su vez también se ha propuesto que los fenoles y sus metabolitos actúen como antioxidantes al incorporarse a las lipoproteínas, protegiéndolas de este modo de la oxidación (de la Torre 2008). La teoría más reciente, sustentada por los resultados de varios estudios, es que los fenoles actúen produciendo cambios en la expresión génica, concretamente disminuyendo la expresión de genes involucrados en la formación de la placa de ateroma. Para ello concentraciones bajas podrían ser suficientes (Konstantinidou 2010, Castañer 2012, Farràs 2013).

En los estudios DOPET 1 y DOPET 2 no se analizó el hidroxitirosol en las muestras de plasma debido al esfuerzo analítico que supuso llegar a analizar las de orina de ambos estudios. Por tanto, se desconoce la cantidad libre de este fenol que habría en sangre tras su formación debida a la ingesta de alcohol o de vino. Es probable de todos modos que las concentraciones también fueran bajas.

#### **9.4.1 Cambio en el metabolismo oxidativo de la dopamina a hidroxitirosol**

En DOPET 1 la excreción de hidroxitirosol aumentó de forma dosis-dependiente tras la administración de etanol. Por primera vez se demostró este hecho en un estudio experimental en humanos. Previamente se habían correlacionado las concentraciones de hidroxitirosol con el consumo de alcohol con los datos basales de una muestra del estudio PREDIMED (Schröder 2009). Los sujetos con consumos más altos tenían mayores concentraciones de hidroxitirosol en orina. Sin embargo, esos datos observacionales requerían una confirmación mediante ensayo clínico.

En nuestro estudio se observó una correlación entre AUC y  $E_{max}$  de la alcoholemia y la excreción de hidroxitirosol. El etanol no contiene hidroxitirosol de modo que se pudo deducir que el hidroxitirosol detectado se había producido de forma endógena. En este estudio se observó también un cambio en la razón DOPAC/OHTyr (a mayor dosis de alcohol menor era la razón). Estos datos eran congruentes con los estudios previos en animales de Davis, en los que observó que el etanol desviaba el metabolismo de la dopamina de DOPAC a DOPET (OHTyr), y de Tank, en los que la razón pasó de 10 a 0,25 al añadir etanol a muestras de hígado de ratas (Davis 1970, Davis 1967, Tank 1979).

Las concentraciones de HVAL, el metabolito del hidroxitirosol, también siguieron una relación dosis-dependiente con la cantidad de alcohol ingerida, corroborando que se había formado más hidroxitirosol con las dosis más altas de alcohol.

En nuestro estudio se observó una gran variabilidad interindividual en la excreción de hidroxitirosol ya que sujetos que habían recibido una misma dosis de alcohol tenían valores muy distintos. Esta variabilidad fue probablemente la responsable de que con la dosis de 24 g se obtuvieran

## *Discusión*

valores de hidroxitirosol superiores a los de la dosis de 30 g. Otros factores como la dieta de cada individuo el día previo (a pesar de las restricciones dietéticas pautadas), podrían estar contribuyendo a estas discrepancias.

La dosis de alcohol no se relacionó con la excreción urinaria de DOPAC ni de HVA. Como se ha comentado previamente ambos compuestos son intermediarios en el metabolismo de la dopamina y se encuentran en cantidades elevadas en el cuerpo de forma basal, a diferencia del hidroxitirosol. Por este motivo es posible que pequeños cambios en sus concentraciones por el desvío del metabolismo de la dopamina de DOPAC a OHTyr no fueran detectables. Esto también justificaría que no se correlacionaran negativamente las concentraciones de DOPAC y OHTyr y los cambios sólo fueran apreciables en la razón, a expensas de un aumento del hidroxitirosol.

Los resultados del segundo estudio con el vodka también apoyaron que la hipótesis del cambio en el metabolismo de la dopamina fuera cierta. De nuevo en las tres cohortes hubo una mayor excreción de hidroxitirosol con el vodka que con el placebo y una disminución de la razón DOPAC/OHTyr. La razón fue concretamente 2,4 veces y 12,7 veces inferior después del vodka y del vino en comparación con el placebo.

El AUC de la alcoholemia en la condición vodka (n=40) también se correlacionó positivamente con la excreción de hidroxitirosol. Aunque no hubo diferencias entre el DOPAC o el HVA entre placebo y vodka, sus concentraciones con el vino sí que fueron inferiores a las del vino sin alcohol. En este caso también se observó que las concentraciones del metabolito del hidroxitirosol (HVAL), eran superiores en las dos bebidas alcohólicas, respecto a las que no contenían alcohol.

#### **9.4.2 Cambio en el metabolismo oxidativo de la tiramina a tirosol**

Un hallazgo inesperado en DOPET 1 fue que las concentraciones de tirosol en orina también seguían una relación dosis-dependiente con la administración de alcohol. Posteriormente en el DOPET 2 se confirmaron estos resultados ya que en la cohorte de 30 g se obtuvieron excreciones algo superiores que con las dos de 15 g (137,8 nmoles vs 72,6 y 98,3 nmoles). En DOPET 2 la excreción de tirosol con el vodka fue similar a la obtenida en el primer estudio para dosis parecidas de alcohol, y superior a la del placebo (ver apartado de resultados de la comparación entre DOPET 1 y DOPET 2). Dado que el alcohol no contiene tirosol de nuevo se pudo deducir que éste se había formado endógenamente.

La explicación más plausible es análoga a la que se ha utilizado para el hidroxitirosol. En modelos animales se había descrito un cambio en el metabolismo de la tiramina con la presencia de alcohol, de modo que en lugar de transformarse preferiblemente en 4-HPAA se transformaría en tirosol (Tacker 1970). De acuerdo con estos datos experimentales, en DOPET 2 se encontraron menores concentraciones de 4-HPAA con el vino que con el vino desalcoholizado. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre vodka y placebo para el 4-HPAA. Sucedió lo mismo que al comparar el DOPAC del vodka y el del placebo para el hidroxitirosol. De nuevo como las concentraciones de tirosol eran muy pequeñas en relación con las de 4-HPAA, la disminución del 4-HPAA (a favor del tirosol) no llegó a ser detectable. Tampoco se correlacionaron ambas variables aunque sí se pudo observar que la razón 4-HPAA/Tyr era inferior en las dos bebidas con alcohol respecto a sus respectivos placebos.

### **9.4.3 Aumento de la biodisponibilidad del tirosol con el alcohol**

En el estudio DOPET 2 se pudo observar que el alcohol presente en el vino aumentaba la biodisponibilidad de este fenol. El vino y el vino desalcoholizado contenían similar cantidad de tirosol y la recuperación de este fenol en orina pasó de ser del 0,3% en el vino desalcoholizado al 16,1% en el vino con alcohol. Esta diferencia tan grande no se explicaba sólo por el efecto neto del alcohol del vino (que podía producir tirosol por desvío del metabolismo de la tiramina). De acuerdo con estos datos en humanos en el estudio que hicimos en ratas la administración de tirosol y etanol produjo mayor excreción de tirosol que cuando se administró con vehículo. Confirmándose de este modo que el tirosol es más biodisponible cuando hay alcohol.

#### 9.4.4 Transformación del tirosol en hidroxitirosol

En estudio en animales demostró que parte del tirosol administrado se recuperaba en forma de tirosol. En humanos podría estar sucediendo lo mismo, que el tirosol se estuviera transformando en hidroxitirosol.

De hecho en el estudio DOPET 2, en la cohorte con mayor tamaño muestral, existió una correlación negativa entre la excreción de tirosol y la de hidroxitirosol para los dos vinos. Cuando el tirosol disminuía aumentaba el hidroxitirosol. En el estudio DOPET 1 la correlación entre ambos fenoles fue en sentido contrario ya que los dos aumentaron con la dosis de alcohol administrada (cambio en el metabolismo de la dopamina y de la tiramina). No obstante no se puede descartar que una parte del hidroxitirosol detectado en DOPET 1 proviniera del tirosol generado.

La transformación en humanos podría hacerse de una de las siguientes maneras. Una posibilidad sería que la reacción la catalizara la tirosina hidroxilasa. Esta enzima se encarga de añadir el grupo hidroxilo de la tirosina para transformarla en L-DOPA, y podría actuar del mismo modo añadiendo el hidroxilo al tirosol para transformarlo en hidroxitirosol. Otra opción sería que la transformación se produjera debido a las bacterias intestinales ya que ha sido descrita para varios microorganismos como *Serratia*, *Pseudomonas* y *Halomonas* mediante el uso de tirosinasas o mono-oxigenasas (Brooks 2005, Allouche 2003, Liebgott 2009).

#### **9.4.5 Transformación de la tiramina o tirosina del vino**

La tirosina se metaboliza a dopamina en humanos. También se ha descrito, aunque en microsomas hepáticos, que la tiramina se puede transformar en dopamina a través del CYP2D6 (Hiroi 1998).

Por estos motivos en nuestros estudios se evaluó la posibilidad de que la tirosina que contenía el vino pudiera estarse transformando en tiramina o dopamina y que ambas acabaran produciendo hidroxitiroso por alguno de los mecanismos descritos previamente.

La propia tiramina del vino también podría estar contribuyendo a la excreción de ambos fenoles.

Sin embargo, las concentraciones de ambos precursores (tirosina y tiramina) eran muy parecidas en ambos vinos administrados (algo superiores en el vino con alcohol) y en cambio la excreción de hidroxitiroso era muy superior con el vino alcoholizado.

Además el estudio en ratas no demostró una mayor excreción de tiroso o hidroxitiroso tras la administración de tirosina o tiramina, con o sin la administración previa de alcohol.

La excreción de tirosina de 0 a 6 h en DOPET 2 tampoco fue distinta en las diferentes condiciones de tratamiento. La tiramina no llegó a analizarse pero se prevé que tampoco habría diferencias en su excreción.

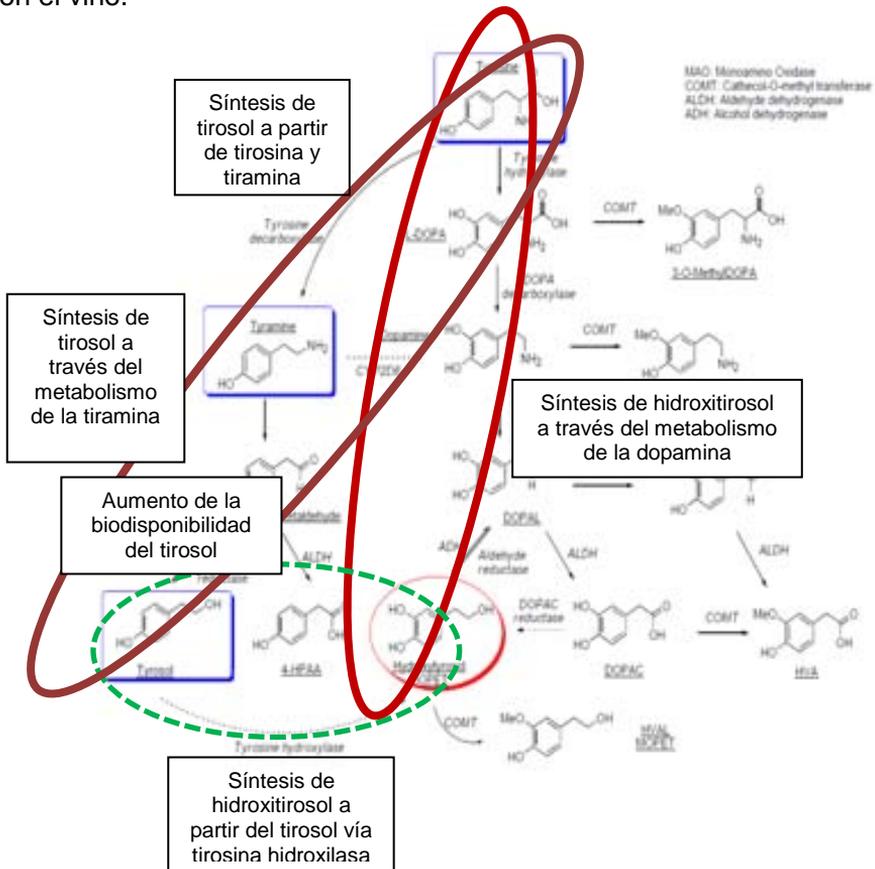
#### **9.4.6 Resumen mecanismos propuestos**

En el caso del vino por tanto los fenoles y el alcohol podrían actuar de forma sinérgica generando hidroxitirosol por 5 mecanismos:

- a) Cambio en el metabolismo oxidativo de la dopamina de DOPAC a hidroxitirosol por la presencia de alcohol.
- b) Cambio en el metabolismo oxidativo de la tiramina de 4-HPAA a tirosol por la presencia de alcohol.
- c) Aumento de la biodisponibilidad del tirosol por la presencia de alcohol.
- d) Síntesis de tirosol a través de la tirosina o tiramina del vino (no respaldado por los datos del estudio en ratas).
- e) Transformación del tirosol en hidroxitirosol. Ya sea el que contiene el vino como el generado por algunos de los mecanismos citados previamente (respaldado por el estudio en ratas).

El hidroxitirosol generado por los mecanismos propuestos se añadiría a la pequeña cantidad absorbida del que contiene el vino por sí mismo.

Figura 98. Mecanismos propuestos para la generación de hidroxitirosol con el vino.



#### 9.4.7. Comparación entre estudios y dosis

A continuación se intenta explicar el origen de la variabilidad observada en cuanto a excreción de OHTyr y Tyr en ambos estudios, así como la observada entre sujetos de un mismo estudio.

Lo primero que se descartó es que las diferencias pudieran explicarse por diferencias en las alcoholemias. Éstas fueron muy similares entre ambos estudios para mismas dosis de alcohol.

En los dos estudios se dejaron tres días entre sesiones experimentales. Se consideraron suficientes para descartar un fenómeno de *carry-over* teniendo en cuenta la semivida de eliminación del hidroxitirosol y el tirosol (2,5-3,5h) tras la administración de aceite (Miró-Casas 2003, Miró-Casas 2001a, Covas 2006b). El pico plasmático de ambos fenoles aparece hacia la hora en plasma y de 0 a 2 h en orina (Fitó 2007a).

La dieta de cada individuo también podría influir en los resultados obtenidos. Todos los sujetos refirieron buen cumplimiento de la misma y las alcoholemias en aire espirado fueron negativas antes de empezar todas las sesiones experimentales. Sin embargo, las dietas restringían el hidroxitirosol pero no contemplaron la posible influencia de otros precursores como el tirosol, la tiramina o la tirosina.

En el primer estudio, en el análisis inicial con cromatografía de gases, se analizaron las concentraciones de hidroxitirosol y tirosol en las muestras de orina basales. Estas concentraciones no fueron diferentes entre dosis. En el segundo estudio se analizó la excreción de hidroxitirosol y tirosol de -2 a 0 h de la primera sesión para la cohorte 2. En este caso, utilizando la misma técnica que para los análisis definitivos (cromatografía líquida) tampoco se observaron diferencias entre tratamientos. Con estos análisis, al no ser exhaustivos, no se puede descartar una pequeña influencia de la dieta pero si una influencia importante en los resultados.

## *Discusión*

Lo más probable es que la variabilidad encontrada se debiera a diferencias interindividuales en el metabolismo de las sustancias implicadas. En el primer estudio al comparar el hidroxitirosol con 18 y 30 g o 24 y 42 g (mismos sujetos) se observó una clara relación dosis-respuesta. En el segundo los sujetos que participaron en la dosis de 15 y 30 g eran distintos, y aunque con 15 g se detectó más hidroxitirosol que con 30, se trataba de una comparación indirecta.

No se puede descartar la influencia de polimorfismos genéticos en enzimas implicados en la generación del hidroxitirosol. Teniendo en cuenta los mecanismos descritos previamente podrían ser enzimas encargadas del metabolismo de la dopamina y tiramina (ADH, ALDH, CYP2D6) o del paso de tirosol a hidroxitirosol (tirosina hidroxilasa u otras posibles).

En el caso del tirosol la variabilidad podría deberse también a diferencias en el metabolismo, a la presencia de polimorfismos genéticos y a transgresiones de la dieta.

De cara a futuros estudios, los datos más representativos en cuanto a excreción de OHTyr y Tyr con 15 g de alcohol (equivalentes a una copa de vino) son los de la cohorte 2 (n=28), que es la que tenía mayor tamaño muestral.

#### **9.4.8 Comparación entre el vino y el aceite**

Con la administración de vino el hidroxitirosol se excretó principalmente sulfatado en lugar de glucuronizado.

Como se ha mencionado previamente la recuperación de OHTyr en orina con un vaso de vino fue superior (>33%) a la que proporciona una dosis en el límite alto del consumo diario de aceite de 50 ml (Helsing 1995).

El OHTyr es el compuesto fenólico con mayor actividad biológica en el aceite de oliva virgen (Gimeno 2002) y ha demostrado ser un potente antioxidante en modelos experimentales (Granados-Principal 2010).

Con el aceite se han realizado diversos estudios que avalan sus efectos beneficiosos sobre la salud y que además correlacionan estos efectos con su contenido en fenoles.

El consumo de aceite de oliva virgen, incluso a dosis inferiores a 50 ml/día, ha demostrado ser eficaz contra factores de riesgo para la enfermedad coronaria como la oxidación de las LDL, la inflamación, la disfunción endotelial y otros factores trombóticos (Covas 2006a, López Miranda 2010). Además, como se ha comentado previamente los compuestos fenólicos del aceite de oliva, principalmente el OHTyr y el Tyr (Gimeno 2002), pueden modular la expresión de genes relacionados con la arteriosclerosis hacia un modo protector (Konstantinidou 2010, Castañer 2012, Farràs 2013).

En el estudio EUROLIVE, un ensayo clínico aleatorizado cruzado y controlado en 200 hombres sanos, se administraron tres aceites de oliva similares excepto por su contenido fenólico (25ml/día) durante tres semanas (Covas 2006a). Se observaron un aumento del colesterol HDL y una reducción del colesterol LDL y de la oxidación lipídica directamente

## *Discusión*

asociados con el contenido fenólico de los aceites (principalmente OHTyr y Tyr).

Posteriormente en el estudio PREDIMED la combinación de una dieta Mediterránea con el aceite de oliva virgen demostró reducir la tasa de eventos cardiovasculares (Estruch 2013).

Teniendo en cuenta estos datos obtenidos con el aceite y que la recuperación de OHTyr fue superior con el vino que con el aceite, es posible que el vino produzca efectos similares en relación con su capacidad de generar hidroxitirosol.

## **9.5 EFECTOS SOBRE DIVERSOS BIOMARCADORES**

En todas las condiciones de DOPET 2 aumentaron los triglicéridos respecto a la basal. Para interpretar este dato es importante tener en cuenta que a las dos horas de las bebidas los sujetos recibieron un desayuno a base de pan y queso, y que el queso contiene triglicéridos. De todo modos el resultado interesante fue que su aumento era más pronunciado en las dos bebidas con alcohol respecto a las que no lo tenían. El aumento de TG además fue dosis-dependiente.

En un metanálisis de estudios de intervención que comparaban el consumo de bebidas alcohólicas vs. no consumo sobre distintos biomarcadores se observó que el alcohol no producía cambios en el colesterol total, el colesterol LDL o los triglicéridos, pero sí aumentaba las HDL de forma dosis dependiente (Brien 2011). Parece ser que mientras que un consumo diario de alcohol moderado (1-3 vasos) no tiene apenas efectos sobre los triglicéridos, dosis más altas producen hipertrigliceridemia no sólo postprandial sino también en ayunas (Van de Wiel 2012).

De hecho algunos estudios a dosis únicas en voluntarios sanos ya habían demostrado un aumento de los triglicéridos en ayunas. Estos cambios podrían explicarse por un aumento de la formación de VLDL en el hígado con el alcohol (Pownall 1999, Mudrakova 2011).

Respecto a la glucosa se observó una reducción dosis-dependiente de la misma en DOPET 2. La glucosa se determinó en dos ocasiones antes del desayuno. Estos resultados también eran esperables ya que se ha descrito previamente que el alcohol disminuye la glucosa en ayunas y además inhibe la gluconeogénesis, reduce la glicemia postprandial y el riesgo de diabetes tipo II (Koppes 2005, Brand Miller 2007).

## Discusión

Como se acaba de comentar, el consumo de alcohol se ha relacionado desde hace mucho tiempo con un aumento de las HDL (Gaziano 1993). Este mecanismo es el que mejor explica sus efectos cardioprotectores hasta la fecha.

Con el consumo de vino también se ha descrito un aumento de las HDL, ya sea un aumento postprandial cuando se administra con las comidas (Chung 2003) como un aumento en ayunas cuando se administra fuera de ellas (Covas 2003).

Cada vez hay más evidencia a favor de que los compuestos fenólicos, además del alcohol, tengan un papel en este aumento de las HDL. Sin embargo el mecanismo por el que lo harían no está claro (Covas 2003).

En el estudio EUROLIVE se observó un aumento de las HDL, que a su vez se relacionó con el contenido fenólico de los aceites (Covas 2006a). En otros estudios se observó un aumento de las HDL al tomar extractos de plantas ricos en polifenoles o zumos (Kurowska 2000, Ebrahim 1998).

En DOPET 2 el aumento de las HDL a las dos horas se produjo en los dos vinos (aunque sin alcanzar la significación estadística). No fueron las dos bebidas alcohólicas las que produjeron concentraciones más altas de HDL, sino las dos con mayor excreción de hidroxitirosol. Es posible pues que el aumento de las HDL en el caso del vino esté más relacionado con un efecto del hidroxitirosol que con un efecto del alcohol.

Se conoce que los compuestos fenólicos del vino tienen efectos antioxidantes y protegen de la oxidación de las LDL *in vitro* (Kerry 1997). Sus efectos *in vivo* no están tan claros. Como se ha descrito para el aceite los fenoles podrían unirse a las LDL y evitar así su oxidación. Actuarían como captadores de radicales peroxilo en la íntima de los vasos (donde se produce la oxidación de las LDL), en microdominios fuera del alcance de los antioxidantes del plasma (Aviram 2002).

## Discusión

Sin embargo, en el caso del vino los efectos antioxidantes de los fenoles podrían verse contrarestandos por la influencia prooxidante del etanol (Van Golde 1999). De hecho, en un estudio transversal, se correlacionaron positivamente las concentraciones circulantes de LDLox con el consumo de bebidas alcohólicas (Schröder 2006).

En DOPET 2 la administración de 15 g de alcohol en forma de vino o vodka no aumentó el estrés oxidativo. No obstante, los biomarcadores de oxidación (LDLox y TBARS) fueron similares entre los distintos tratamientos. Sólo TBARS con el vino fue inferior al resto de tratamientos a las 22 h. Estos resultados son congruentes con estudios anteriores en los que dosis únicas de vino tampoco produjeron cambios en la oxidación de las LDL ni en TBARS, o bien produjeron cambios mínimos (Covas 2010).

Con el aceite se ha observado que la oxidación de las LDL se reduce a medida que aumenta el contenido fenólico del mismo (Covas 2006a). Este hecho no se ha reproducido en nuestro estudio, en relación con la capacidad de generar hidroxitirosol de cada bebida. Es posible que sean necesarias dosis múltiples de vino para detectar estos efectos (Covas 2010).

La arteriosclerosis, causa subyacente de enfermedad coronaria e ictus isquémico, es un proceso crónico, que consiste en un proceso inflamatorio de la pared endotelial. *In vitro* se ha observado que los fenoles del aceite y del vino, entre ellos el hidroxitirodol, inhiben la expresión de moléculas de adhesión endotelial (Carluccio 2003).

Por estos motivos en nuestro estudio también se analizaron los efectos de las distintas bebidas en reactantes de fase aguda como la PCR, citocinas como la IL-6 y moléculas de adhesión endotelial como VCAM e ICAM (Martin-Ventura 2009). No se observaron cambios en estos

## *Discusión*

parámetros probablemente porque se administraron dosis únicas en voluntarios sanos. En otro estudio tampoco se encontraron diferencias en PCR e IL-6 al administrar 30 g en dosis únicas de distintas bebidas alcohólicas (vino, cerveza, destilados) (Tousoulis 2008).

Contrariamente dosis de 30 g de alcohol mantenidas (4 semanas) sí demostraron tener efectos en estas variables y también en las moléculas de adhesión endotelial. Además los efectos fueron más pronunciados en las bebidas que contenían fenoles vs. las que no tenían (vino o cava frente a ginebra) (Estruch 2004, Vazquez-Agell 2007).

## **9.6. FORTALEZAS Y LIMITACIONES**

Ambos estudios tenían una serie de fortalezas y limitaciones que se enumeran a continuación.

La primera fortaleza de ambos estudios fue el diseño cruzado, que permitió que los mismos sujetos tomaran los distintos tratamientos. De este modo se minimizó la posible interferencia por parte de variables confusoras.

En el primer estudio fue posible estudiar la relación entre la dosis de alcohol y la excreción de hidroxitirosol con el modelo lineal mixto. Sin embargo, los reducidos tamaños muestrales y la gran variabilidad encontrada en la excreción de hidroxitirosol hicieron que los intervalos de confianza de las estimaciones fueran muy amplios.

En el segundo estudio como se tuvieron en cuenta los datos del primero en el cálculo del tamaño muestral se reclutaron hasta 28 voluntarios para el estudio definitivo (6 eran los del piloto 2). De este modo fue posible encontrar diferencias en la excreción de hidroxitirosol entre los 4 tratamientos a pesar de la gran variabilidad interindividual.

Otra fortaleza del segundo estudio fue que se utilizaran vinos con y sin alcohol con contenido muy similar de hidroxitirosol. Para ello fue necesaria la colaboración con el INRA, experto en procedimientos para extraer el alcohol del vino sin alterar nada más de la bebida.

Los efectos subjetivos del alcohol pudieron evaluarse de forma óptima ya que ambos estudios fueron a doble ciego, aunque en el segundo el sabor de las condiciones vino era imposible de enmascarar. Aún así los resultados demuestran que hubo puntuaciones de borrachera tanto en presencia como en algunos casos en ausencia de alcohol en la bebida o

vino. Claramente algunos de los sujetos no sabían lo que estaban tomando en algunas sesiones.

Ambos fueron estudios comparados con placebo de modo que se pudo evaluar el efecto neto de las intervenciones.

En cuanto a las limitaciones, la primera es que en ambos estudios no se pudo descartar la interacción entre las bebidas y algún componente de la dieta de los sujetos en los cambios observados. De todos modos, los alimentos que *a priori* podían influenciar más en los resultados fueron prohibidos o su consumo fue restringido. En el primer estudio no se restringieron todas las fuentes de hidroxitirosol sino aquellas más abundantes.

Aunque se puso un gran esfuerzo en evaluar todas las posibles rutas metabólicas de los compuestos estudiados, es posible que la aparición de nuevos estándares analíticos de referencia pudiera añadir más información. Por ejemplo, podrían analizarse otros componentes del tirosol total, además del Tyr-4-O-glucurónido.

Otra limitación es que los distintos fenoles se analizaron en orina y no en plasma, impidiendo un estudio completo de la farmacocinética del hidroxitirosol generado por el consumo de alcohol. Su determinación en plasma habría permitido cuantificar la cantidad libre, que es la que se supone biológicamente activa, y correlacionarla con los efectos en los distintos biomarcadores a cada tiempo. Sin embargo, dadas las dificultades encontradas en el análisis de los fenoles en orina se descartó finalmente la posibilidad de determinarlos también en plasma.

Ambos estudios utilizaron dosis únicas de alcohol en voluntarios sanos. Se desconoce qué resultados se habrían obtenido a dosis múltiples y en sujetos con un riesgo aumentado de padecer eventos cardiovasculares, por lo que los resultados no son extrapolables a esas situaciones.

### *Fortalezas y limitaciones*

Anteriormente se han comentado las razones para no incluir finalmente a las mujeres en los estudios. Los resultados obtenidos no son aplicables a las mujeres hasta que se hagan los estudios pertinentes.

Además los voluntarios incluidos fueron muy jóvenes, por lo que parece necesario replicar los datos en sujetos de mediana edad, que son los que más podrían beneficiarse de los tratamientos.

En el segundo estudio se estudió solo una variedad de vino aunque con distintas graduaciones alcohólicas (13° y 8°). Se escogió el vino Merlot por su alto contenido en fenoles. Sin embargo es probable que si se hubiera utilizado un vino con menor contenido fenólico, como el vino blanco, la excreción de hidroxitirosol hubiera seguido el mismo orden entre tratamientos.

A pesar de que el peso es un factor que afecta a las concentraciones de alcohol, ya que éste se distribuye por el agua corporal, las dosis de alcohol administradas en los estudios no se ajustaron al peso de los individuos. Sin embargo, los resultados de DOPET 1 no cambiaron sustancialmente al replicar los análisis con la dosis ajustada

El principal motivo para no ajustar las dosis al peso fue que cuando los resultados del estudio se trasladaran a la práctica clínica lo más probable es que las recomendaciones se hicieran en unidades o vasos de alcohol, y no en g/kg de peso.

## **9.7. FUTUROS ESTUDIOS**

Hasta el momento los cambios producidos por el vino en los distintos biomarcadores no se pueden atribuir directamente al hidroxitirosol ya que éste no se ha administrado de forma aislada.

La principal dificultad para futuros estudios es que si el hidroxitirosol se administra fuera de su matriz natural es muy poco biodisponible.

De hecho en un estudio cuando se administró hidroxitirosol puro en una solución acuosa la biodisponibilidad fue del 6,2% (Gonzalez-Santiago 2010). En otro estudio se observó que la biodisponibilidad al darlo con aceite era mucho más alta que con yogur (Visioli 2003).

En cualquier caso se puede continuar investigando con dosis múltiples de vino, la bebida que hasta ahora ha demostrado generar una mayor cantidad de este fenol, y correlacionar los efectos sobre distintos biomarcadores de riesgo cardiovascular con las concentraciones de hidroxitirosol.

Otra opción sería dar un paso más allá y administrar tirosol, con o sin alcohol, con la finalidad de estudiar tanto las concentraciones de hidroxitirosol obtenidas como sus posibles efectos en humanos.

Otro aspecto que queda abierto para investigar es el mecanismo (enzima) por el cual el tirosol podría convertirse en hidroxitirosol, tanto en humanos como en animales.

## **10. CONCLUSIONES**

Los objetivos del proyecto fueron el establecer el papel del etanol en la generación de hidroxitirosol y la influencia de la dosis en esa generación, así como conocer la contribución de los distintos componentes del vino en las concentraciones de hidroxitirosol en el organismo y sus efectos biológicos.

Las principales conclusiones que se pueden extraer de los resultados de los dos estudios clínicos, apoyados con los resultados del estudio en animales, son las siguientes:

1. La ingesta de alcohol genera hidroxitirosol (DOPET) de forma endógena, probablemente debido a un cambio en el metabolismo oxidativo de la dopamina (disminución de la razón DOPAC/OHTyr en presencia de alcohol). Este hidroxitirosol se excreta principalmente en forma de sulfato.
2. Un hallazgo relevante e inesperado es que además de hidroxitirosol, la administración de alcohol genera concentraciones relevantes de tirosol.
3. La generación de hidroxitirosol y de tirosol tras el consumo de alcohol es dosis-dependiente. En el caso del hidroxitirosol aumenta la concentración total, la de su metabolito sulfatado y la del homovanil alcohol (HVAL).
4. La relación entre la dosis de alcohol administrada y sus concentraciones en sangre deja de ser lineal a dosis elevadas. Esta no linealidad se confirma en las concentraciones de sus metabolitos no oxidativos (datos incluidos en anexo 1).
5. El consumo de vino promueve la generación endógena de hidroxitirosol.

## *Conclusiones*

6. Los distintos componentes del vino contribuyen de distinta forma en las concentraciones de hidroxitirosol. Su excreción es mayor con el vino en comparación con el vino desalcoholizado y la del vino desalcoholizado es superior a la del alcohol.

7. La generación endógena se demuestra por el hecho de que se recuperan cantidades mayores de hidroxitirosol en la orina que las administradas tanto con vino o vino desalcoholizado. Esta generación es superior al aumentar la dosis de alcohol (30 g vs.15 g de alcohol) y el volumen de vino (235 ml vs. 147 ml de vino de 13°).

8. La excreción de tirosol tras la administración de vino es muy superior a la obtenida con el vino desalcoholizado, siendo probable un aumento de la biodisponibilidad del tirosol por la presencia de alcohol.

9. Los mecanismos que explican la contribución de los diferentes componentes del vino (fenoles y alcohol) en la generación de hidroxitirosol son probablemente la suma de varios de los siguientes:

9.1. Un cambio en el metabolismo oxidativo de la dopamina endógena de DOPAC a DOPET (hidroxitirosol) por la presencia de alcohol.

9.2. Un cambio en el metabolismo oxidativo de la tiramina del vino de 4-HPAA a tirosol por la presencia de alcohol.

9.3. Un aumento de la biodisponibilidad del tirosol del vino que se añade al que se genera en presencia de alcohol.

9.4. La síntesis de tirosol a través de la tirosina o tiramina del vino.

9.5. La biotransformación del tirosol en hidroxitirosol.

## *Conclusiones*

10. Las bebidas alcohólicas producen un aumento de los triglicéridos, una disminución de la glucosa y un aumento de la frecuencia cardíaca en comparación con las que no contienen alcohol.
11. La administración de vino produce una menor oxidación de las LDL y una reducción de los peróxidos lípidicos.
12. Los resultados de esta memoria apoyan la hipótesis de que los efectos beneficiosos descritos tras el consumo de dosis bajas repetidas de vino podrían explicarse en parte por la producción endógena de hidroxitirosol, un antioxidante de origen natural.



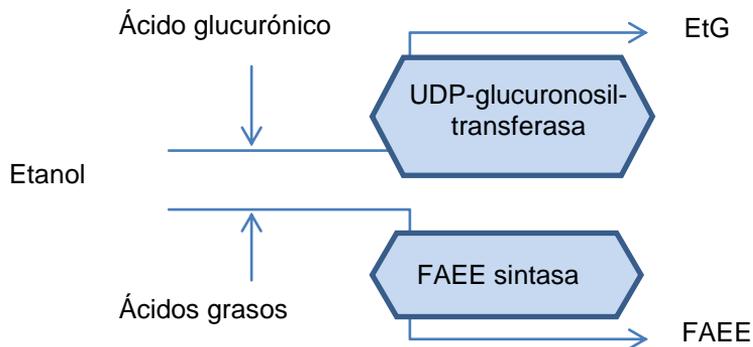
## 11. ANEXOS

### 11.1 ANEXO 1. METABOLITOS NO OXIDATIVOS DEL ALCOHOL

En este apartado se muestran los resultados de la determinación de los metabolitos no oxidativos del alcohol realizadas en DOPET 1.

Como se ha comentado previamente en la introducción un pequeño porcentaje del alcohol administrado se transforma en estos metabolitos (<2%). En la siguiente figura se puede observar como se forman estos metabolitos no oxidativos.

Figura 99. Formación de EtG y FAEE a partir del etanol.



Son múltiples los ensayos clínicos que han determinado estos metabolitos tras el consumo de alcohol, sin embargo hay muy pocos de ellos en los que se hayan administrado las distintas dosis a los mismos voluntarios.

El análisis en orina del etilglucurónido estaba previsto en el diseño del estudio mientras que para los FAEE se aprovecharon las muestras de plasma que se habían recogido con la finalidad de determinar el hidroxitirosol.

Las concentraciones urinarias de etilglucurónido de 0 a 24 h se determinaron mediante enzimoimmunoensayo (Böttcher 2007) mientras que las concentraciones plasmáticas de FAEE de 0 a 6 h se determinaron mediante cromatografía de gases (Kulig 2006).

Para el EtG se calculó la excreción urinaria de 0 a 24 h mediante la suma de las cantidades excretadas en cada uno de los intervalos en que se recogió orina (0-2 h, 2-4 h, 4-6 h, 6-12 h, 12-24 h). Las concentraciones de FAEE se determinaron basalmente y a los 15, 30, 45 minutos, 1, 1,5, 2, 3, 4 y 6 h postadministración del alcohol. Se calcularon los parámetros cinéticos AUC,  $C_{max}$  y  $t_{max}$  de 0 a 6 h.

El análisis estadístico de los datos se hizo como para el resto de variables del DOPET 1. Se utilizó un modelo lineal mixto teniendo en cuenta la dosis de alcohol como factor para poder estudiar la relación entre ésta y cada una de las variables. Como no se cumplían las condiciones de aplicación ya que a dosis altas de alcohol la relación entre ambas variables dejaba de ser lineal se procedió a logaritmizar los datos.

A continuación se muestran los resultados para cada una de estas variables.

**11.1.1 Excreción urinaria de etilglucurónico.**

Tabla 79. Análisis descriptivo del etilglucurónico en orina de 0 a 24 h.

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
6 g	6	0	4,18	1,20	3,96	3,11	6,45
12 g	6	0	15,50	5,38	16,14	7,46	21,59
18 g	12	0	34,66	7,68	36,27	25,54	47,32
24 g	6	0	54,99	11,10	52,36	45,75	75,91
30 g	12	0	75,69	22,75	73,73	38,39	110,01
42 g	16	0	159,47	38,53	166,59	111,70	211,12

Figura 100. Etilglucurónico en orina de 0 a 24 h en función de la dosis de alcohol

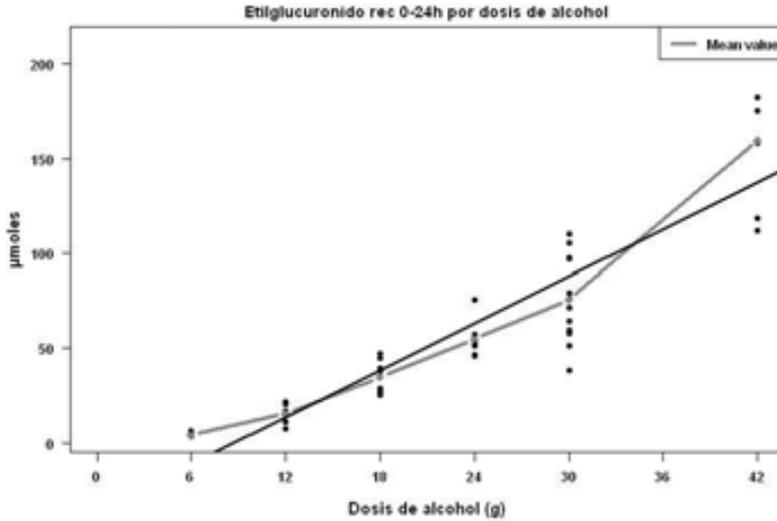
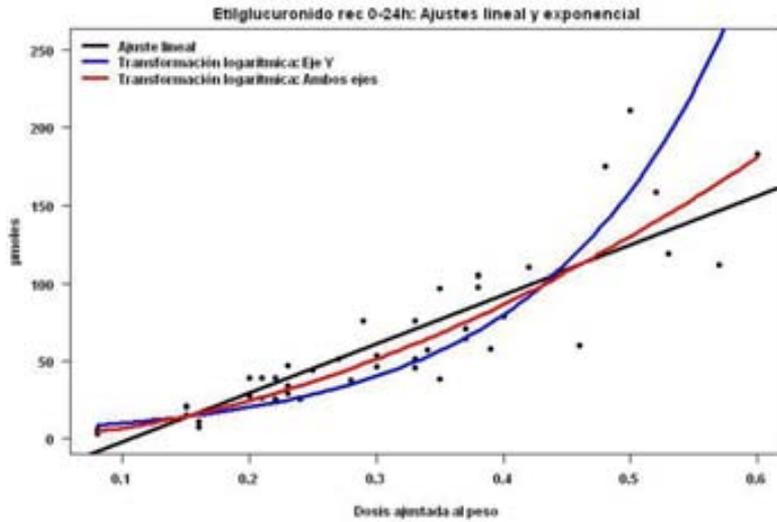


Figura 101. Ajustes lineal y exponencial de los datos con la dosis/kg.



Para poder aplicar el modelo de regresión lineal se decidió usar las dos variables logaritmizadas (EtG y dosis/kg), ya que de este modo los datos ajustaban mejor a una recta.

Tabla 80. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros ( en escala logarítmica ambas variables)

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	6,126	0,125	23	48,901	<0,001
Log dosis [g/kg]	1,817	0,082	23	22,155	<0,001

Para cada g/kg de alcohol aumentó el logaritmo de la excreción de EtG en 1,817.

Tabla 81. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis ajustada (en escala original)

	Estimación	2,5%	97,5%
0,1 g/kg	6,98	4,72	10,31
0,2 g/kg	24,57	18,70	32,29
0,3 g/kg	51,33	41,85	62,96
0,4 g/kg	86,56	74,10	101,12
0,5 g/kg	129,84	115,43	146,04
0,6 g/kg	180,82	165,81	197,19

**11.1.2 Concentraciones de ésteres etílicos de ácidos grasos en plasma.**

Se presentan los datos completos para el éster etílico de ácidos grasos (FAEE) más abundante de los distintos analizados, el éster etílico de ácido palmítico. Para el resto (oleico, linoleico, esteárico) se muestran solamente los gráficos del curso temporal de las concentraciones plasmáticas.

*11.1.2.1 Concentraciones máximas ( $C_{max}$ )*

Tabla 82. Análisis descriptivo de la  $C_{max}$  del éster etílico de ácido palmítico en sangre de 0 a 6 h

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
6 g	6	0	25,1	10,4	28,1	7,9	35,7
12 g	6	0	46,8	11,4	43,4	38,8	69,9
18 g	12	0	78,6	12,1	78,5	57,7	101,8
24 g	6	0	114,8	47,7	95,6	82,2	206,3
30 g	12	0	130,6	48,7	149,6	61,0	184,9
42 g	16	0	192,1	43,2	197,9	126,7	246,8

Figura 102.  $C_{max}$  del éster etílico de ácido palmítico en función de la dosis de alcohol.

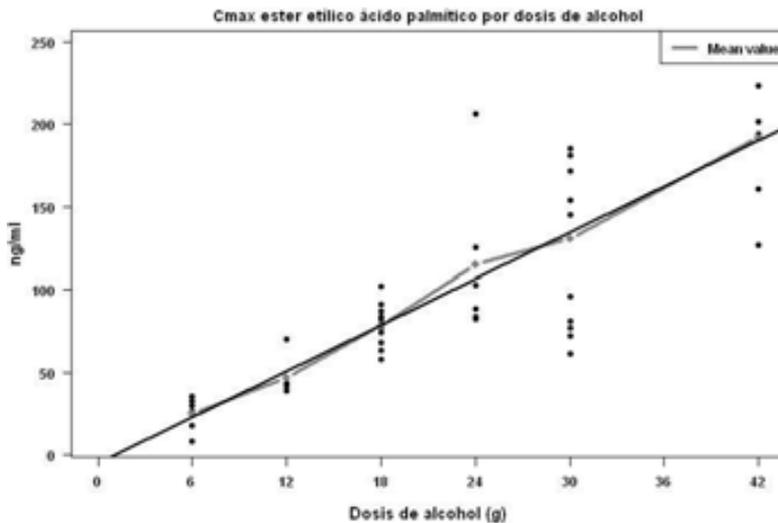


Tabla 83. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros.

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	-2,833	11,427	23	-0,248	0,806
Dosis alcohol [g]	4,555	0,445	23	10,229	<0,001

Por cada g de alcohol aumentó la  $C_{max}$  en 4,555 ng/ml.

Tabla 84. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis de alcohol

	Estimación	2,5%	97,5%
0 g	-2,83	-26,47	20,81
6 g	24,50	5,52	43,48
12 g	51,83	36,90	66,75
18 g	79,16	67,06	91,26
24 g	106,49	95,04	117,94
30 g	133,82	120,52	147,12
42 g	188,48	167,22	209,74

### 11.1.2.2 Área bajo la curva (AUC)

Tabla 85. Análisis descriptivo del AUC del ester etílico de ácido palmítico en sangre de 0 a 6 h

Dosis	N	Perdidos	Media	DE	Mediana	Min	Max
6 g	6	0	22,5	7,25	22,2	13,5	35,2
12 g	6	0	75,2	13,43	72,9	64,8	101,2
18 g	12	0	123,1	30,52	118,3	75,1	177,6
24 g	6	0	250,3	93,94	218,7	183,7	435,8
30 g	12	0	319,4	71,58	321,8	177,5	415,9
42 g	16	0	595,0	136,0	630,6	420,4	737,0

Figura 103. AUC del ester etílico de ácido palmítico en función de la dosis de alcohol

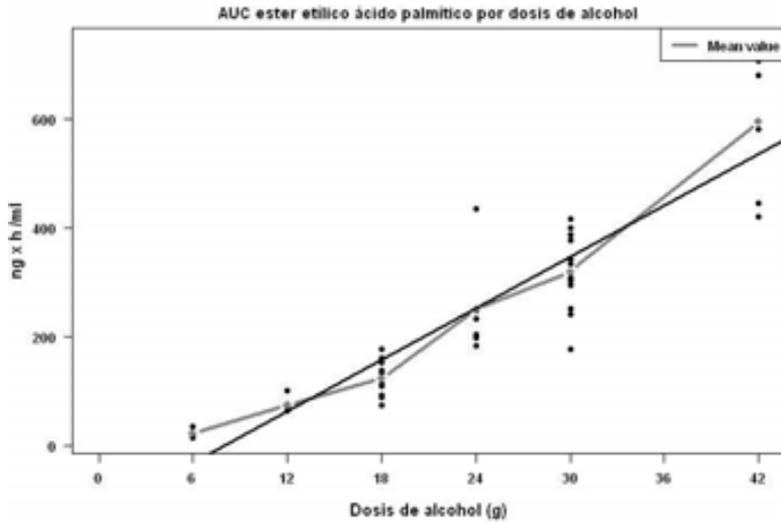
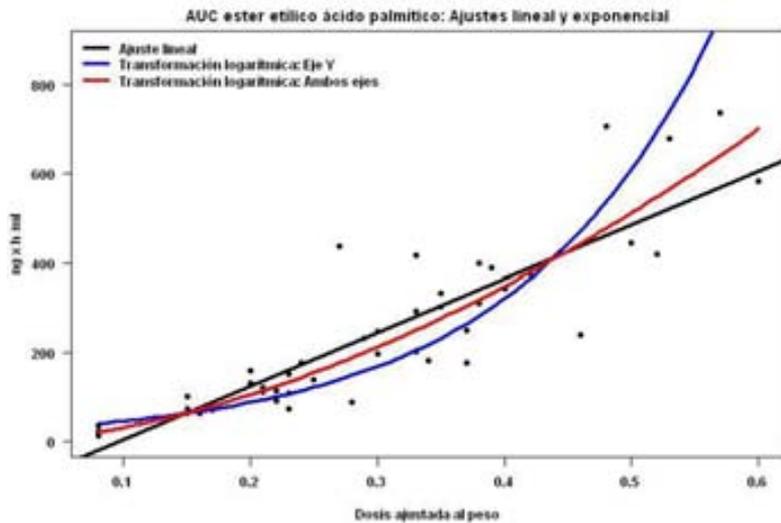


Figura 104. Ajustes lineal y exponencial de los datos con la dosis/kg.



Para poder aplicar el modelo de regresión lineal se decidió utilizar los datos con las dos variables logaritmizadas (EtG y dosis/kg), ya que de este modo ajustaban mejor a una recta.

Anexos

Tabla 86. Modelo lineal mixto. Estimación de los parámetros (escala logarítmica en ambas variables).

	Valor	EE	g.l	t-valor	p-valor
(Intersección)	7,431	0,125	23	59,217	<0,001
Log dosis [g/kg]	1,721	0,081	23	21,331	<0,001

Por cada g/kg de alcohol aumento el logaritmo en 1,721.

Tabla 87. Estimación basada en el modelo de los valores promedio e IC del 95% por dosis ajustada (escala original)

	Estimación	2,5%	97,5%
0,1 g/kg	32,06	21,83	47,09
0,2 g/kg	105,71	80,81	138,29
0,3 g/kg	212,42	173,75	259,71
0,4 g/kg	348,54	299,11	406,14
0,5 g/kg	511,74	455,83	574,52
0,6 g/kg	700,39	643,14	762,73

11.1.2.3 Curso temporal

En las siguientes figuras se muestra el curso temporal de los distintos FAEE.

Figura 105. Curso temporal ester etílico ácido palmítico.

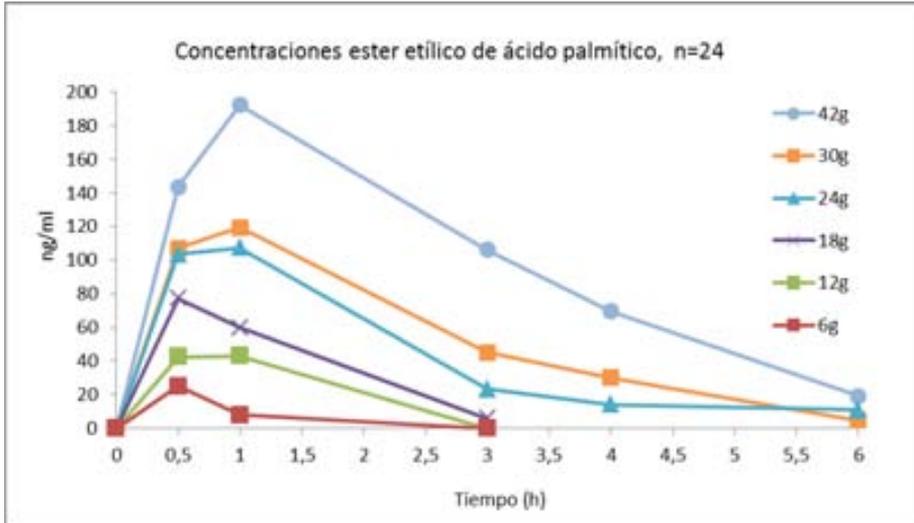


Figura 106. Curso temporal ester etílico ácido oleico.

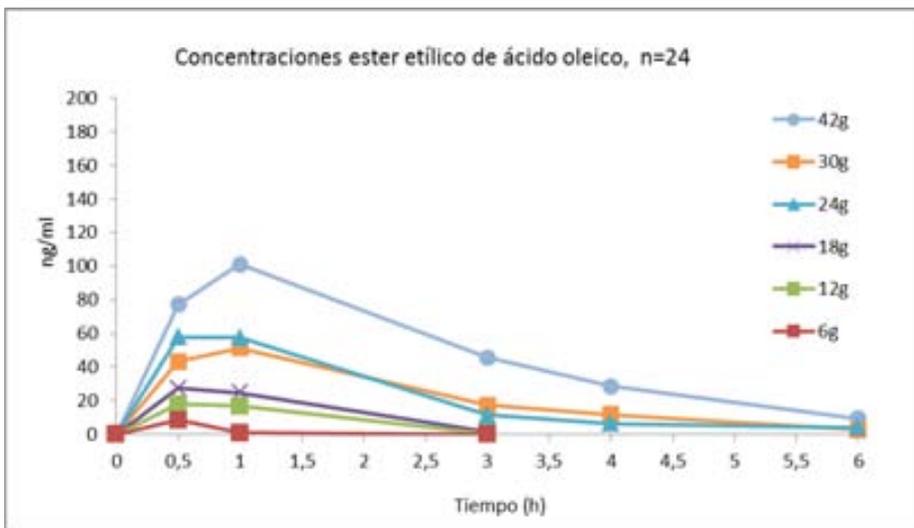


Figura 107. Curso temporal ester etílico ácido esteárico.

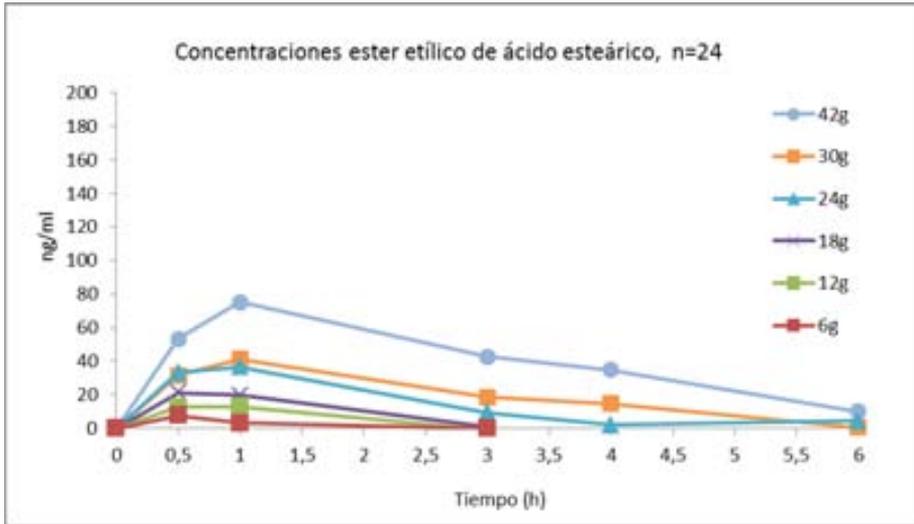
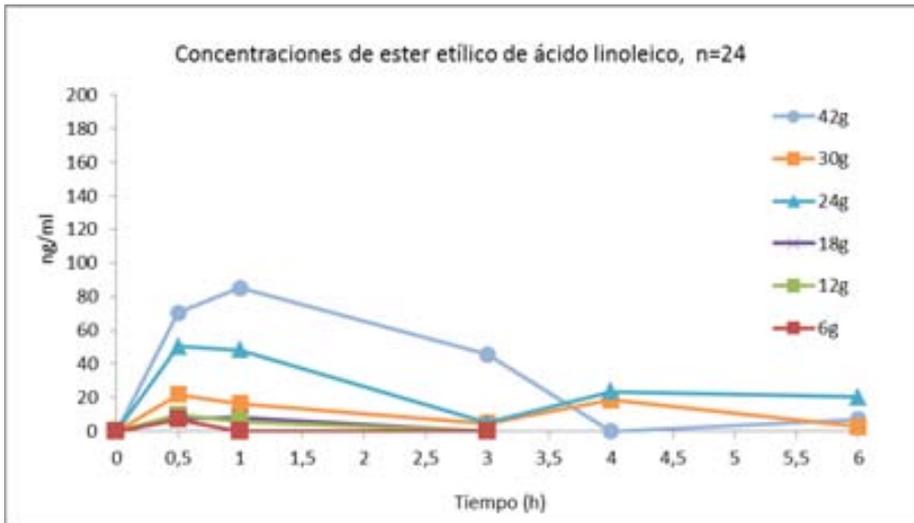


Figura 108. Cursos temporal ester etílico ácido linoleico.

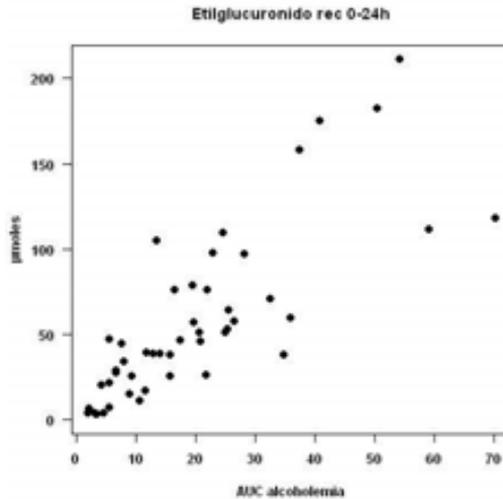


### 11.1.3 Correlación entre alcohol y metabolitos no oxidativos

Se observó una correlación positiva alta y estadísticamente significativa, entre el AUC de las concentraciones de alcohol de 0 a 6 h y las tres variables siguientes: el AUC y  $C_{max}$  de los distintos FAEE y la cantidad de etilglucurónido excretada en orina.

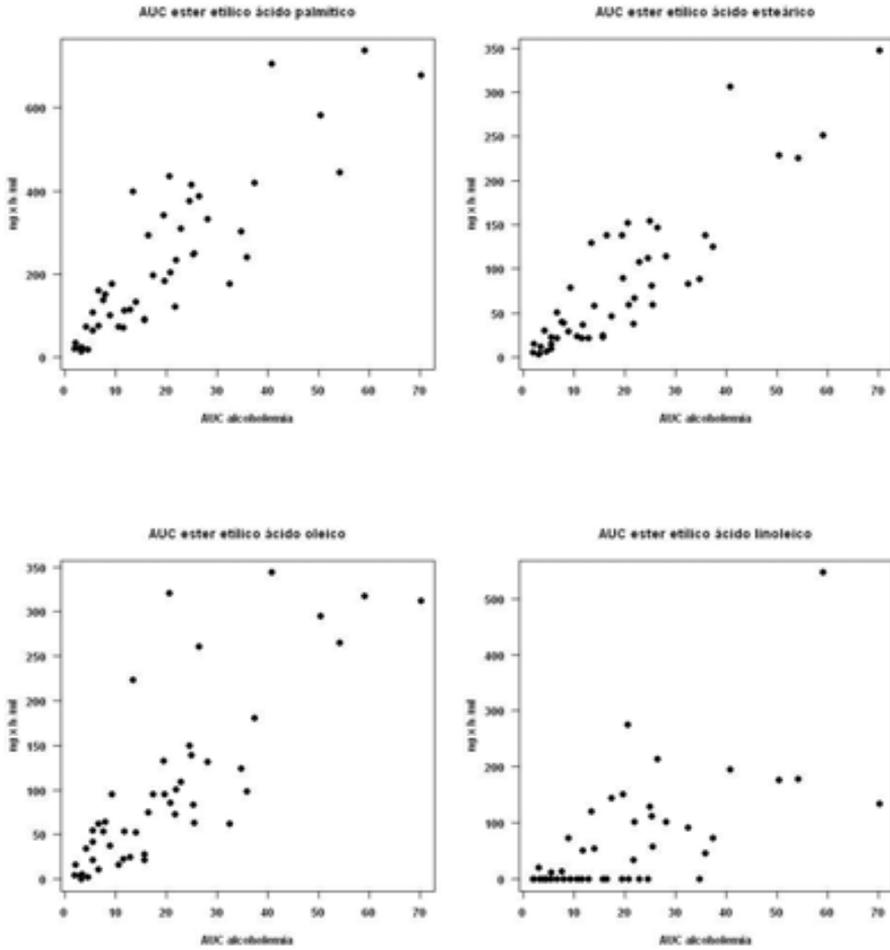
A continuación se muestran los gráficos de dichas correlaciones y los valores de  $r$  y significación para cada una de ellas.

Figura 109. Correlación entre AUC alcoholemia y EtG en orina ( $r=0,805$   $p<0,001$ )



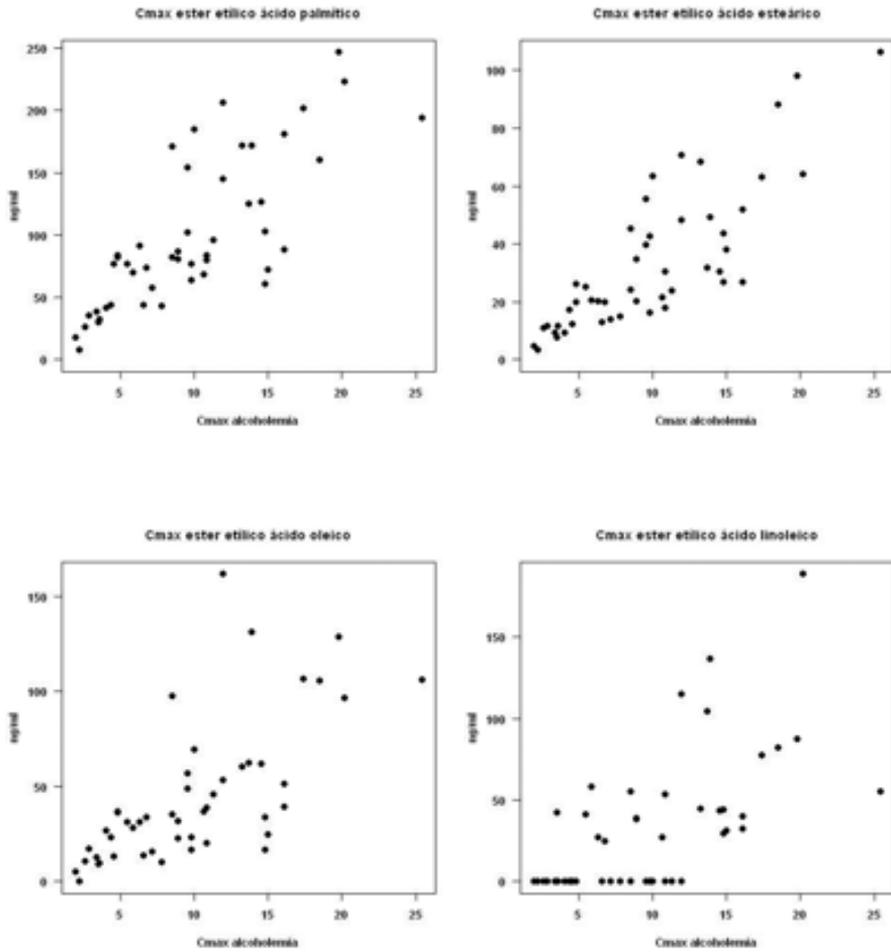
Anexos

Figura 110. Correlación entre AUC alcoholemia y AUC de los distintos FAEE (palmítico:  $r=0,870$   $p<0,001$ , esteárico:  $r=0,887$   $p<0,001$ , oleico:  $r=0,804$   $p<0,001$  y linoleico  $r=0,652$   $p<0,001$ ).



Anexos

Figura 111. Correlación entre Cmax alcoholemia y Cmax de los distintos FAEE (palmítico:  $r=0,774$   $p<0,001$ , esteárico:  $r=0,823$   $p<0,001$ , oleico:  $r=0,679$   $p<0,001$  y linoleico  $r=0,617$   $p<0,001$ ).



#### **11.1.4 Resumen metabolitos no oxidativos del alcohol**

-En general, tanto para la excreción de etilglucurónido 0-24 h como para el AUC de las concentraciones de los FAEE en plasma de 0-6 h, se observó que la relación con la dosis de alcohol dejaba de ser lineal a partir de 42 g. Este hecho ya se había constatado previamente con el AUC de la alcoholemia.

-La  $C_{max}$  de los distintos FAEE siguió una relación lineal con la dosis de alcohol, de forma similar a lo ya observado con la  $C_{max}$  de la alcoholemia.

-Con las dosis de 24 y 30 g se obtuvieron concentraciones bastante parecidas para algunos de los FAEE, de forma similar a lo que había sucedido con las alcoholemias. De nuevo se debe tener en cuenta que los sujetos que tomaron las dos dosis eran distintos y por tanto se trata de comparaciones indirectas.

-Las concentraciones de los FAEE desaparecieron a las 6 h con todas las dosis de alcohol administradas. En el caso del ácido linoleico se observó un repunte de las concentraciones a las 4 h cuando a las 3h prácticamente eran indetectables.

Existe un aumento dosis-dependiente de las concentraciones de los metabolitos no oxidativos de alcohol. La acumulación de las concentraciones de alcohol a partir de determinada dosis (42 g) explica el aumento de los metabolitos no oxidativos de forma exponencial.

El ácido linoleico es el único entre los diferentes analizados que es un ácido graso esencial. El organismo no lo puede sintetizar y por tanto tiene adquirirse de la dieta. Se encuentra especialmente en el aceite de girasol. Este hecho podría explicar sus concentraciones ascendentes para algunas dosis después del desayuno (bocadillo de queso con aceite de girasol).



## **11.2 ANEXO 2: ESTUDIO PRECURSORES EN RATAS**

### **11.2.1 Métodos**

En este apartado se describe la metodología y el análisis estadístico del estudio en animales.

Se trataba de un estudio de diseño paralelo en el que las ratas recibieron una inyección intraperitoneal de tirosina (10 o 20 mg/kg), tirosol (10 o 20 mg/kg), tiramina (10 o 20 mg/kg) o vehículo (suero), precedida de una primera inyección de etanol (1g/kg) o vehículo. Entre una y otra administración pasaron 30 minutos.

En el estudio participaron 96 ratas (6-7 por grupo experimental).

Se recogió orina por un periodo de 4 h tras la administración. Las ratas permanecieron en unas cajas durante el experimento, a las que fueron habituadas el día previo por un período de 2 h.

El objetivo del estudio fue determinar la excreción de tirosol e hidroxitirosol tras la administración de los distintos precursores.

Las variables principales fueron las excreciones urinarias de hidroxitirosol y tirosol de 0 a 4 h. Las concentraciones de los fenoles en orina se determinaron mediante cromatografía líquida.

Anexos

Tabla 88. En la siguiente tabla se muestra el diseño experimental del estudio.

Grupo	Administración	
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
1	Etanol 1 g/kg	Vehículo
2	Etanol 1 g/kg	Tirosina 10 mg/kg
3	Etanol 1 g/kg	Tirosina 20 mg/kg
4	Etanol 1 g/kg	Tyr 10 mg/kg
5	Etanol 1 g/kg	Tyr 20 mg/kg
6	Etanol 1 g/kg	Tiramina 10 mg/kg
7	Etanol 1 g/kg	Tiramina 20 mg/kg
8	Vehículo	Vehículo
9	Vehículo	Tirosina 10 mg/kg
10	Vehículo	Tirosina 20 mg/kg
11	Vehículo	Tyr 10 mg/kg
12	Vehículo	Tyr 20 mg/kg
13	Vehículo	Tiramina 10 mg/kg
14	Vehículo	Tiramina 20 mg/kg

Los datos de la excreción urinaria de los distintos fenoles y sus metabolitos en orina fueron analizados mediante modelos de ANOVA con

los factores alcohol, tirosol, tirosina y tiramina así como con las interacciones entre alcohol y cada uno de los tres compuestos. Todos los contrastes lineales de interés fueron analizados en el marco de estos modelos. Para ello se utilizó el programa R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), versión 3.0.2. En particular, para las comparaciones múltiples se utilizó el paquete de R contribuido multcomp (Hothorn 2008). En todos los casos se consideró estadísticamente significativa un valor p inferior a 0,05.



## **12. BIBLIOGRAFÍA Y PUBLICACIONES**

### **12.1 BIBLIOGRAFÍA**

Abanades S, Farré M, Barral D, Torrens M, Closas N, Langohr K, de la Torre R. Relative abuse liability of gamma-hydroxybutyric acid (GHB), flunitrazepam and ethanol in “Club Drugs” users. *J Clin Psychopharmacology* 2007;27:625-38.

Aguera E, Athès-Dutour V, Bes M, Caillé S, Cottureau P, Escudier JL, Mikolajczak M, Roy A, Sablayrolles JM, Samson A, Souchon I, Vidal JP. Reduction of wine alcohol content: A comparative study of different technologies. *Bulletin OIV*, Mars 2010; 83-N° 947-948-9.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. DSM-V. Fifth ed.* American Psychiatric Association; Arlington VA, 2013.

Allouche N, Damak M, Ellouz R, Sayadi S. Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(4):2105-9.

Álvarez, coordinador. *Cuaderno Didáctico sobre Educación Vial y Salud. Módulo 2. Alcohol, conducción y accidentes de tráfico.* Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2004. Disponible en: <https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/accidentes/accidentesTrafico/medioEscolar.htm>. Consultado el 14/07/2014.

Arredondo Bruce A, del Risco Morales O. La acción cardioprotectora del uso moderado de alcohol. *Revista Médica Electrónica.* Disponible en: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202014/vol2%202014/tema07.htm>. Consultado el 14/07/2014.

Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:146-61.

Badeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P, Tikkanen MJ. Estrogen A-ring structure and antioxidative effect on lipoproteins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;96(3-4):271-8.

Baraona E, Abittan CS, Dohmen K, Moretti M, Pozzato G, Chayes ZW, Schaefer C, Lieber CS. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(4):502-7.

Boileau I, Assaad JM, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, Tremblay RE, Dagher A. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse* 2003;15;49(4):226-31.

Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol* 2008;43(1):46-8.

Booyse FM, Pan W, Grenett HE, Parks DA, Darley-USmar VM, Bradley KM, Tabengwa EM. Mechanism by which alcohol and wine polyphenols affect coronary heart disease risk. *Ann Epidemiol* 2007;17(5 Suppl):S24-31

Bourzeix M, Escudier JL, Mourgues J. Produits de diversification, les boissons à base de vin désalcoolisé. *Enologie, fondements scientifiques et technologiques*. 1998, Chapitre 23, 1157-8. C Flanzly coordinateur. Tec et Doc Lavoisier.

Brand-Miller JC, Fatema K, Middlemiss C, Bare M, Liu V, Atkinson F, Petocz P. Effect of alcoholic beverages on postprandial glycemia and insulinemia in lean, young, healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2007;85(6):1545-51.

Brien SE, Ronksley PE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *BMJ* 2011;342:d636.

Brooks SJ, Doyle EM, O'Connor KE. Tyrosol to hydroxytyrsol biotransformation by immobilized cell extracts of *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology* 2006;39(2):191-6.

Brumbach T, Cao D, King A. Effects of alcohol on psychomotor performance and perceived impairment in heavy binge social drinkers. *Drug Alcohol Depend* 2007;91(1):10-7.

Buckland G, Travier N, Barricarte A, Ardanaz E, Moreno-Iribas C, Sánchez MJ, Molina-Montes E, Chirlaque MD, Huerta JM, Navarro C, Redondo ML, Amiano P, Dorronsoro M, Larrañaga N, Gonzalez CA. Olive oil intake and CHD in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Spanish cohort. *Br J Nutr* 2012;108: 2075-2082.

Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(4):622-9.

Castañer O, Covas MI, Kymenets O, Nyyssonen K, Konstantinidou V, Zunft HF, de la Torre R, Muñoz-Aguayo D, Vila J, Fitó M. Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1238-1244.

Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Ros E, Valderas-Martinez P, Casas R, Arranz S, Guillén M, Lamuela-Raventós RM, Llorach R, Andres-Lacueva

C, Estruch R. Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial. *Clin Nutr* 2013;32(2):200-6 (a).

Chiva-Blanch G, Arranz S, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol Alcohol* 2013;48(3):270-7 (b).

Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Llorach R, Rotches-Ribalta M, Guillén M, Casas R, Arranz S, Valderas-Martinez P, Portoles O, Corella D, Tinahones F, Lamuela-Raventos RM, Andres-Lacueva C, Estruch R. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2012;95(2):326-34 (a)

Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Ros E, Arranz S, Valderas-Martínez P, Casas R, Sacanella E, Llorach R, Lamuela-Raventos RM, Andres-Lacueva C, Estruch R. Dealcoholized red wine decreases systolic and diastolic blood pressure and increases plasma nitric oxide: short communication. *Circ Res* 2012;111(8):1065-8 (b).

Chung BH1, Doran S, Liang P, Osterlund L, Cho BH, Oster RA, Darnell B, Franklin F. Alcohol-mediated enhancement of postprandial lipemia: a contributing factor to an increase in plasma HDL and a decrease in risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3):391-9.

Comisión clínica se la delegación del gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas (PNSD). Informe sobre alcohol. Febrero de 2007. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/publica/pdf/InformeAlcohol.pdf>. Consultado el 14/07/2014.

Costanzo S, Di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Cardiovascular and overall mortality risk in relation to alcohol consumption in patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2010;121(17):1951-9.

Covas MI, Konstantinidou V, Mysytaki E, Fitó M, Weinbrenner T, De La Torre R, Farré-Albadalejo M, Lamuela-Raventós R. Postprandial effects of wine consumption on lipids and oxidative stress biomarkers. *Drugs Exp Clin Res* 2003;29(5-6):217-23.

Covas MI, Nyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Bäuml H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J, Marrugat J; EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;145:333-41 (a).

Covas MI, de la Torre K, Farré-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitó M, López-Sabater C, Pujadas-Bastardes MA, Joglar J, Weinbrenner T, Lamuela-Raventós RM, de la Torre R. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic Biol Med* 2006;40(4):608-16 (b).

Covas MI, Gambert P, Fitó M, de la Torre R. Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Atherosclerosis* 2010;208(2):297-304

Davis VE, Brown H, Huff JA, Cashaw JL The alteration of serotonin metabolism to 5-hydroxytryptophol by ethanol ingestion in man. *J Lab Clin Med* 1967;69:132-140.

Davis VE, Walsh MJ. Alcohol, amines, and alkaloids: a possible biochemical basis for alcohol addiction. *Science* 1970;167:1005-1007.

## *Bibliografía y publicaciones*

de la Torre R, Covas MI, Pujadas MA, Fitó M, Farré M. Is dopamine behind the health benefits of red wine? *Eur J Nutr* 2006 Aug;45(5):307-10.

de la Torre R, Covas MI. Polifenoles del aceite de oliva y homologías con el vino en aspectos de salud. *Revista ACE de enología*. Nº 82. Junio 2007. Disponible en: [http://www.acenologia.com/ciencia82\\_2.htm](http://www.acenologia.com/ciencia82_2.htm). Consultado el 14/07/2014.

de la Torre R. Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology* 2008;16(5):245-7.

Dettling A, Preiss A, Skopp G, Haffner H-T. The influence of the luteal and follicular phases on major pharmacokinetic parameters of blood and breath alcohol kinetics in women.

Di Castelnuovo A, Costanzo S, Bagnardi V, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. *Arch Intern Med* 2006;166:2437-2445.

Ebrahim Sajjadi S, Movahedian Atar AM, Yektaian A. Antihyperlipidemic effect of hydroalcoholic extract, and polyphenolic fraction from *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Pharm Acta Helv* 1998;73(3):167-70.

Eckardt MJ1, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998 (5):998-1040.

EFSA Panel on Dietetic Products. Nutrition and allergies (NDA). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive oil and protection of LDL particles from oxidative damage. *EFSA Journal* 2011;9:2033. Available from:

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2033.htm>. Accedido el 14/07/2014.

Escudier JL. Evaluation de quelques techniques adaptées à la désalcoolisation des vins. *Rev des œnologues* 1990, 90:57-60.

Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antúnez E, Nicolás JM, Fernández-Solá J, Rotilio D, de Gaetano G, Rubin E, Urbano-Márquez A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. *Effects of wine on inflammatory markers. Atherosclerosis* 2004;175(1):117-23.

Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó 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.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279-1290.

Farràs M, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Giralt M, Solà R, Subirana I, Motilva MJ, Konstantinidou V, Covas MI, Fitó M. Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans. A randomized controlled trial. *J Nutr Biochem* 2013;24:1334-9.

Fitó M, de la Torre R, Farré-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43(4):375-81 8 (a).

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; for the PREDIMED Study Investigators. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2007;167:1195-203 (b).

Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología Humana*. 6ª edición. Elsevier, España, 2014.

Fowler JS, Logan J, Wang G-J, Volkow ND, Teland F, Zhu W, et al. Low monoamine oxidase B in peripheral organs in smokers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1600-5.

Gaziano JM1, Buring JE, Breslow JL, Goldhaber SZ, Rosner B, VanDenburgh M, Willett W, Hennekens CH. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993;329(25):1829-34.

Gea A, Bes-Rastrollo M, Toledo E, Garcia-Lopez M, Beunza JJ, Estruch R, Martinez-Gonzalez MA. Mediterranean alcohol-drinking pattern and mortality in the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) Project: a prospective cohort study. *Br J Nutr* 2014;111(10):1871-80.

Gea A, Beunza JJ, Estruch R, Sánchez-Villegas A, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Gómez-Gracia E, Covas MI, Corella D, Fiol M, Arós F, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Wärnberg J, Pintó X, Serra-Majem L, Martínez-González MA; PREDIMED GROUP. Alcohol intake, wine consumption and the development of depression: the PREDIMED study. *BMC Med* 2013;11:192.

Gengo FM, Gabos C, Straley C, Manning C. The pharmacodynamics of ethanol: effects on performance and judgment. *J Clin Pharmacol.* 1990 Aug;30(8):748-54.

German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr* 2000;20:561-93.

Gimeno E, Castellote AI, Lamuela R, de la Torre MC, López-Sabater MC. The effect of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil. *Food Chem* 2002;78: 207-211.

Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev* 2010;68:191-206.

Hansen AS, Marckmann P, Dragsted LO, Finné Nielsen IL, Nielsen SE, Grønbaek M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(3):449-55.

Hashimoto T, Ibi M, Matsuno K, Nakashima S, Tanigawa T, Yoshikawa T, Yabe-Nishimura C. An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36:555-564.

Helsing E. Traditional diets and disease patterns of the Mediterranean, circa 1960. *Am J Clin Nutr* 1995;61(6 suppl):1329S-1337S.

Hernández-López C, Farré M, Roset PN, Menoyo E, Pizarro N, Ortuño J, Torrens M, Camí J, de la Torre R. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) and alcohol interactions in humans: Psychomotor

performance, subjective effects, and pharmacokinetics. *J Pharmacology Exp Ther* 2002;300:236-44.

Hiroi T1, Imaoka S, Funae Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249(3):838-43.

Holdstock L, de Wit H. Individual differences in the biphasic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22(9):1903-11.

Holford NH. Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clin Pharmacokinet* 1987;13(5):273-92.

Hothorn T, Bretz F, Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* 2008;50(3):346-63.

Husek P. Amino acid derivatization and analysis in five minutes. *FEBS Lett* 1991;280:354-56.

Johnson RD, Horowitz M, Maddox AF, Wishart JM, Shearman DJ. Cigarette smoking and rate of gastric emptying: effect on alcohol absorption. *BMJ* 1991;302(6767):20-3.

Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1997;135(1):93-102.

Khymenets O, Fitó M, Touriño S, Muñoz-Aguayo D, Pujadas M, Torres JL, Joglar J, Farré M, Covas MI, de la Torre R. Antioxidant activities of hydroxytyrosol main metabolites do not contribute to beneficial health effects after olive oil ingestion. *Drug Metab Dispos* 2010;38(9):1417-21.

King AR, Hunter PJ. Alcohol elimination at low blood concentrations among women taking combined oral contraceptives. *J Stud Alcohol* 2005;66(6):738-44.

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

Koppes LL, Dekker JM, Hendriks HF, Bouter LM, Heine RJ. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care* 2005;28(3):719-25.

Kopun M, Propping P. The kinetics of ethanol absorption and elimination in twins and supplementary repetitive experiments in singleton subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1977;11(5):337-44.

Kulig CC, Beresford TP, Everson GT. Rapid, accurate, and sensitive fatty acid ethyl ester determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J Lab Clin Med* 2006;147(3):133-8.

Kurowska EM1, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piché LA, Serratore P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 2000;72(5):1095-100.

Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006;114(1):82-96

Lieb Gott PP, Amouric A, Comte A, Tholozan JL, Lorquin J. Hydroxytyrosol from tyrosol using hydroxyphenylacetic acid-induced bacterial cultures and evidence of the role of 4-HPA 3-hydroxylase. *Res Microbiol* 2009; 160(10):757-66.

Maenhout TM, De Buyzere ML, Delanghe JR. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clin Chim Acta* 2013;415:322-9

Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tuñón J, Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Vega de Céniga M, Egido J. Biomarkers in cardiovascular medicine. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(6):677-88.

Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J* 2007 Sep 24;6:27.

Miró-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuno J, Weinbrenner T, Roset P, de la Torre R. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem* 2003; 49: 945–52.

Miró-Casas E, Farre Albaladejo M, Covas MI, Rodriguez JO, Menoyo Colomer E, Lamuela Raventos RM, de la Torre R. Capillary gas chromatography–mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem* 2001;294:63–72 (a).

Miró-Casas E, Farré Albadalejo M, Covas Planells MI, Fitó Colomer M, Lamuela Raventós RM, de la Torre Fornell R. Tyrosol bioavailability in humans after ingestion of virgin olive oil (b).

Mudráková E1, Poledne R, Kovář J. Postprandial triglyceridemia after single dose of alcohol in healthy young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23(3):183-8.

Mukamal KJ. Understanding the mechanisms that link alcohol and lower risk of coronary heart disease. *Clin Chem* 2012; 58: 664–6.

Mumenthaler MS, Taylor JL, O'Hara R, Yesavage JA. Gender differences in moderate drinking effects. *Alcohol Res Health* 1999;23(1):55-64.

Namera A, Yashiki M, Nishida M, Kojima T. Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;776:49-55.

O'Keefe JH, Bhatti SK, Bajwa A, DiNicolantonio JJ, Lavie CJ. Alcohol and cardiovascular health: the dose makes the poison...or the remedy. *Mayo Clin Proc* 2014;89(3):382-93.

Pascual F, Guardia J. ed. Monografía sobre alcoholismo. Barcelona: Socidrogalcohol, 2012.

Pérez-Mañá C, Papaseit E, Mustata C, Orellana C, Farré M. Do people know the volume of wine or the amount of ethanol in it that corresponds to official definitions of one standard drink?. XXIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica. Málaga (05-07/09/2011). *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;109 (Suppl 3):68.

Piñeiro Z, Cantos-Villar E, Palma M, Puertas B. Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *J Agric Food Chem* 2011;59:11683-89.

Plan Nacional Sobre Drogas. Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias (ESTUDES 2010). Disponible en: [http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/ESTUDES\\_2010.pdf](http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/ESTUDES_2010.pdf). Consultado el 02/10/2013.

Plan Nacional Sobre Drogas. Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES 2011). Disponible en:

<http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES2011.pdf>.

Consultado el 14/07/2014.

Pownall HJ, Ballantyne CM, Kimball KT, Simpson SL, Yeshurun D, Gotto AM Jr. Effect of moderate alcohol consumption on hypertriglyceridemia: a study in the fasting state. *Arch Intern Med* 1999;159(9):981-7.

Qiu Y, Su M, Liu Y, Chen M, Gu J, Zhang J, Jia W. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography-mass spectrometry based metabonomic profiling. *Anal Chim Acta* 2007;583:277-283.

Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.

Ronksley PE, Brien SE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2011;342:d671.

Sarkola T, Iles MR, Kohlenberg-Mueller K, Eriksson CJ. Ethanol, acetaldehyde, acetate, and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4-methylpyrazole. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26(2):239-45.

Schroder H, Marrugat J, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI. Alcohol consumption is directly associated with circulating oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 2006;40(8):1474-81.

Schröder H, de la Torre R, Estruch R, Corella D, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Ros E, Arós F, Flores G, Civit E, Farré M, Fiol M, Vila J, Fernandez-Crehuet J, Ruiz-Gutiérrez V, Lapetra J, Sáez G, Covas MI; PREDIMED Study Investigators. Alcohol consumption is associated with

high concentrations of urinary hydroxytyrosol. *Am J Clin Nutr* 2009;90(5):1329-35.

Spaak J, Tomlinson G, McGowan CL, Soleas GJ, Morris BL, Picton P, Notarius CF, Floras JS. Dose-related effects of red wine and alcohol on heart rate variability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298(6):H2226-31.

Spaak J, Merlocco AC, Soleas GJ, Tomlinson G, Morris BL, Picton P, Notarius CF, Chan CT, Floras JS. Dose-related effects of red wine and alcohol on hemodynamics, sympathetic nerve activity, and arterial diameter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294: H605-12.

Standridge JB, Zylstra RG, Adams SM. Alcohol consumption: an overview of benefits and risks. *South Med J*. 2004;97:664-72.

Tacker M, Creaven PJ, Mclsaac WM. Alteration in tyramine metabolism by ethanol. *Biochem Pharmacol* 1970;19:604-7.

Tank AW, Weiner H. Ethanol-induced alteration of dopamine metabolism in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1979;28:3139-47.

Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, García-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Resveratrol in primary and secondary prevention of cardiovascular disease: a dietary and clinical perspective. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1290:37-51 (a).

Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des* 2013;19(34):6064-93 (b).

Tousoulis D1, Ntarladimas I, Antoniadis C, Vasiliadou C, Tentolouris C, Papageorgiou N, Latsios G, Stefanadis C. Acute effects of different alcoholic beverages on vascular endothelium, inflammatory markers and thrombolysis fibrinolysis system. *Clin Nutr* 2008;27(4):594-600.

Trichopoulou 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.

Tsang C, Higgins S, Duthie GG, Duthie SJ, Howie M, Mullen W, Lean ME, Crozier A. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *Br J Nutr* 2005;93(2):233-40.

Tuck KL, Hayball PJ, Stupans I. Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *J Agric Food Chem* 2002;50(8):2404-9.

Valenzuela 1997. Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol health & research world*. Vol 21, nº2. Disponible en: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh21-2/144.pdf>. Consultado el 14/07/2014.

Van de Wiel A. The effect of alcohol on postprandial and fasting triglycerides. *Int J Vasc Med* 2012;2012:862504.

Van Golde PH, Sloots LM, Vermeulen WP, Wielders JP, Hart HC, Bouma BN, van de Wiel A. The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis* 1999;147(2):365-70.

Vázquez-Agell M1, Sacanella E, Tobias E, Monagas M, Antúnez E, Zamora-Ros R, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Fernández-Solá J, Nicolás JM, Estruch R. Inflammatory markers of atherosclerosis

are decreased after moderate consumption of cava (sparkling wine) in men with low cardiovascular risk. *J Nutr* 2007;137(10):2279-84.

Vasanthi HR<sup>1</sup>, Parameswari RP, DeLeiris J, Das DK. Health benefits of wine and alcohol from neuroprotection to heart health. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:1505-12.

Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, Caruso D. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J Nutr* 2003;133(8):2612-5.

Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett* 2000;468(2-3):159-60

Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:21-36.

Weinbrenner T, Fitó M, Farré Albaladejo M, Saez GT, Rijken P, Tormos C, Coolen S, De La Torre R, Covas MI. Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans. *Drugs Exp Clin Res* 2004;30(5-6):207-12.

Wilkinson PK, Sedman AJ, Sakmar E, Kay DR, Wagner JG. J Pharmacokinetics of ethanol after oral administration in the fasting state. *Pharmacokinet Biopharm* 1977;5(3):207-24

World Health Organization. Management of Substance Abuse Team. Global Status Report on Alcohol and Health. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf). Consultado el 14/07/2014.

## *Bibliografía y publicaciones*

Wurst FM1, Skipper GE, Weinmann W. Ethyl glucuronide--the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* 2003;98 Suppl 2:51-61.

Yamaguchi Y, Haginaka S, Morimoto S, Fujioka Y, Kunitomo M. Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur J Clin Invest* 2005;35:186-93.

## **12.2 PUBLICACIONES**

Está previsto realizar varias publicaciones sobre los estudios presentados en esta memoria.

Para el estudio DOPET 1 se redactará un artículo describiendo que tras la administración de alcohol se genera hidroxitirosol de forma dosis-dependiente y otro artículo sobre la relación no lineal entre las dosis altas de alcohol y sus metabolitos no oxidativos.

Para el estudio DOPET 2 y el estudio en ratas se dispone de un artículo conjunto que, en el momento de depositar esta memoria, está siendo evaluado por una revista.

Además, hasta la fecha se han presentado diversas comunicaciones a congresos nacionales e internacionales en las que se han descrito resultados preliminares de los estudios.

Estas comunicaciones se citan a continuación:

- Pérez-Mañá C, Papaseit E, Menoyo E, Pujadas M, de la Torre R, Farré M. Contribution of Wine Components on Hydroxytyrosol Body Concentrations. XXVI Congreso Sociedad Española de Farmacología Clínica, Cádiz, España, 17-18 Octubre, 2013.
- Pérez-Mañá C, Pastor A, Pujadas M, Papaseit E, Frias S, de la Torre, Farré M. Non-linear dose-dependent formation of ethanol exposure biomarkers. 2nd European Conference on FASD. Fetal alcohol spectrum disorders: clinical and biochemical diagnosis screening and follow-up. Barcelona, España, 21-24 Octubre, 2012. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 2012;19:e446-e447.

## *Bibliografía y publicaciones*

- Pérez-Mañá C, Papaseit E, Menoyo E, Pujadas M, Mesones R, de la Torre R, Farré M. Ethanol pharmacokinetics, subjective effects and psychomotor performance after drinking different alcoholic beverages. XXV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica. Alicante, 27-29 Octubre, 2012. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2012;111(Suppl 1):12-40.
- Pérez-Mañá C, Papaseit E, Pastor A, Menoyo E, Pérez M, Martín S, Orellana C, Pardo-Lozano R, Ortiz J, Pujadas M, Civit E, de la Torre R, Farré M. Biomarkers of recent alcohol consumption after controlled administration of different doses of ethanol. XXIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica. Málaga, 5-7 Octubre, 2011. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011;109(Suppl 3):44.
- Pérez-Mañá C, Papaseit E, Mustata C, Orellana C, Farré M. Do people know the volume of wine or the amount of ethanol in it that corresponds to official definitions of one standard drink?. XXIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica. Málaga, España, 5-7 Octubre, 2011. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011;109 (Suppl 3):68
- Farré M, Pérez-Mañá C, Pardo R, Mustata C, Pastor A, Ortiz E, de La Torre R. Dose of ethanol and generation of endogenous hydroxytyrosol-DOPET. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica, Madrid, España, 20-22 Octubre, 2010.
- Perez-Mañá C, Farre M, Pardo R, Mustata C, Papaseit E, Pastor A, Ortiz E, Menoyo E, Perez M, Martin S, de la Torre R. Role of the dose of ethanol on the generation of endogenous hydroxytyrosol-DOPET. 16th World Congress on Basic and

*Bibliografía y publicaciones*

Clinical Pharmacology. Copenhagen, Dinamarca, 17-23 Julio,  
2010. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2010;107 (Suppl. 1):521

