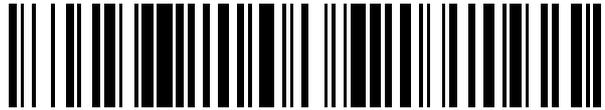


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 782**

21 Número de solicitud: 202030625

51 Int. Cl.:

**A61K 36/63** (2006.01)

**A61K 47/44** (2007.01)

**A61P 9/12** (2006.01)

**A61P 27/06** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**23.06.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.12.2021**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**11.03.2022**

Fecha de concesión:

**12.12.2022**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**19.12.2022**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)**  
**Paseo de las Delicias s/n Pabellón de Brasil**  
**41013 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**SANTANA GARRIDO, Álvaro;**  
**REYES GOYA, Claudia;**  
**MATE BARRERO, Alfonso;**  
**VÁZQUEZ CUETO, Carmen María y**  
**MARTINS BARATA ANDRE, Helder Alexandre**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **USO DEL ACEITE DE ACEBUCHINA EN EL DAÑO RETINIANO ASOCIADO A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y PATOLOGÍAS RETINIANAS ASOCIADAS A LA MISMA**

57 Resumen:

Uso del aceite de acebuchina en el daño retiniano asociado a la hipertensión arterial y patologías retinianas asociadas a la misma.

La presente invención pertenece al sector de la medicina y la nutrición, y busca paliar los problemas del daño retiniano asociado a la hipertensión arterial mediante la utilización del aceite de acebuchina, en la preparación de un medicamento, diferentes fórmulas farmacéuticas, sola o asociada a otros agentes antihipertensivos, o como un suplemento alimenticio que prevenga los efectos adversos asociados a la hipertensión arterial en la retina, así como reducir la aparición de patologías retinianas asociadas a dicha hipertensión arterial.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 887 782 B2

## DESCRIPCIÓN

### Uso del aceite de acebuchina en el daño retiniano asociado a la hipertensión arterial y patologías retinianas asociadas a la misma

5

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Medicina y la Nutrición, y se refiere al uso beneficioso del aceite de acebuchina (fruto del acebuche u olivo salvaje (*Olea europea* L. var. *sylvestris* u *oleaster*)), como un agente antioxidante para combatir el desbalance oxidativo retiniano que acompaña a la hipertensión arterial basado en la  
10 disminución de los niveles de anión superóxido. Del mismo modo, esta invención también podría ser aplicada para el diseño de nuevas composiciones farmacéuticas utilizadas en el tratamiento de la citada alteración, que comprendan una cantidad terapéuticamente efectiva del aceite de acebuchina.

### 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Según las guías de práctica clínica más recientes, la hipertensión arterial (HTA) se define como un aumento sostenido en los valores de presión arterial sistólica y diastólica igual o superior a 140 y 90 mm Hg, respectivamente (Williams et al, *Journal of*  
20 *Hypertension*, **2018**, 36, 1953-2041). La prevalencia mundial de la HTA se sitúa en torno a un 30-45% para la población general, aunque existe un notable aumento en edades más avanzadas. Esto supone un gran problema para la sanidad global, dada la importancia de la hipertensión como factor de riesgo en enfermedades cardiovasculares, renales, cerebrales y oftalmológicas. En particular, la HTA constituye  
25 un importante factor de riesgo para el desarrollo de la retinopatía hipertensiva y de otras enfermedades vasculares retinianas, entre ellas la obstrucción arterial y venosa retinianas. Se ha podido comprobar que la retinopatía hipertensiva de grados III-IV cursa con alteración retiniana grave, con un alto valor predictivo de mortalidad cardiovascular y asociada a un mayor número de eventos cerebrovasculares (Patton et al, *Journal of*  
30 *Anatomy*, **2005**, 206, 319-348).

Numerosos trabajos han demostrado el papel del estrés oxidativo y, por ende, de la enzima NADPH oxidasa (Appukuttan et al.), en el desarrollo de alteraciones vasculares retinianas bajo un contexto de retinopatía diabética, retinopatía isquémica, o en aquellas  
35 asociadas a la HTA (Sicard et al, *British Journal of Pharmacology*, **2007**, 151, 979-986).

En estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, hemos observado como el sistema NADPH oxidasa produce un aumento del estrés oxidativo a nivel retiniano en la HTA debido a un aumento de la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) vinculado a la sobreexpresión de diferentes isoformas de la NADPH oxidasa (NOXs), a la alteración del metabolismo del óxido nítrico y la alteración de los principales sistemas antioxidantes. Por tanto, se vislumbra un mecanismo por el cual la HTA produce un daño a nivel retiniano que puede conducir a la generación de otras patologías oculares como cataratas, glaucoma o degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (Chakravarthy et al, *BMC Ophthalmology*, **2010**, 10,31),

10

La HTA se considera el factor de riesgo cardiovascular más importante actualmente. Según las últimas directrices de las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología, la HTA se establece cuando la presión arterial sistólica es mayor o igual a 140 mmHg y/o el valor de la presión arterial diastólica es mayor o igual de 90 mmHg. El estrés oxidativo y los procesos inflamatorios han ganado protagonismo como uno de los mecanismos principales responsables en el desarrollo de la HTA, ya que las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen un importante papel en la homeostasis de la pared vascular, pudiendo contribuir en el mecanismo de la hipertensión (Fraser-Bell et al, *Clinical and Experimental Ophthalmology*, **2017**, 45, 45-53). A consecuencia de estas modificaciones en la pared vascular, se desencadenan una serie de cambios en la organización de los vasos que conducen a multitud de patologías vasculares. El sistema visual, dada su alta vascularización a nivel de la coroides y de la circulación retiniana, podría ser uno de los sistemas del organismo más expuesto a las consecuencias de las alteraciones vasculares producidas por la hipertensión sistémica.

25

A nivel ocular, la HTA es la causante de desencadenar una serie de alteraciones que afectan especialmente a la retina, a la coroides y al nervio óptico, por ser las zonas de mayor irrigación vascular. Aunque la retinopatía hipertensiva es la manifestación más común a nivel del sistema ocular en una situación de HTA, debido a que la retina es la zona más irrigada del globo ocular, la elevada presión arterial también puede provocar fibrosis y necrosis de la propia coroides. Esta afectación en la coroides impide la perfusión por los capilares coroides, desencadenando una isquemia en los lugares que irriga la coroides, entre ellos, el nervio óptico. Además, pueden aparecer otros problemas relacionados con la hipertensión, como son las oclusiones venosas y/o

30

arteriales, y los macroaneurismas arteriales a nivel de la retina (Fraser-Bell et al, *Clinical and Experimental Ophthalmology*, **2017**, 45, 45-53); así como otras patologías oculares como el glaucoma o la DMAE, que pueden ocasionar pérdida de visión. Otros estudios epidemiológicos sugieren también la responsabilidad de la HTA en el desarrollo de cataratas (Chakravarthy et al, *BMC Ophthalmology*, **2010**, 10,31).

Trabajos previos muestran el papel nocivo de la HTA sobre la retina y sus diferentes capas celulares, pudiendo favorecer el desarrollo de las patologías asociadas a la HTA anteriormente citadas. Dado a esto, es importante orientar el objetivo terapéutico antihipertensivo no solo a disminuir las cifras de presión arterial, sino a buscar la existencia de lesión en el órgano y, si la hubiese, iniciar el tratamiento más adecuado para evitar su progresión o incluso, lograr la reversión del daño. Es más, en la era de la medicina preventiva en la que nos encontramos, debe de ser objetivo de la investigación el estudio de nuevas terapias antihipertensivas que hayan demostrado su eficacia como hipotensora y como protectora frente al desarrollo de las complicaciones, entre ellas la aparición de enfermedades asociadas a la HTA.

Por otro lado, son conocidas las propiedades beneficiosas del aceite de oliva dentro de la llamada “dieta mediterránea” (Rosato et al, *European Journal of Nutrition*, **2019**, 58, 173–191) destacando sus efectos protectores de la función cardiovascular como consecuencia de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y de la mejora de la función endotelial entre otros aspectos. El acebuche u olivo silvestre (*Olea europaea* L. var. *sylvestris* u *oleaster*) constituye una variedad de olivo adaptada en alto grado a los contrastes climáticos propios del clima mediterráneo (Mercado-Blanco et al, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **2003**, 63, 91-105.). De menor tamaño que el olivo cultivado, su distribución natural abarca los territorios más térmicos de la cuenca del mar Mediterráneo y del litoral meridional portugués, hallándose también en las Islas Canarias y Madeira. De los casi nueve millones de hectáreas que abarca el territorio de la Comunidad Autónoma de Andalucía, prácticamente la mitad corresponde a terrenos rústicos, donde el acebuche representa una variedad de considerable extensión y muy superior en comparación con otros territorios de la geografía española. Nuestras masas de acebuchales, por consiguiente, constituyen por sí mismas un importante foco de estudios de viabilidad económica que eventualmente puedan avalar la puesta en producción y explotación de dichas masas. Las mayores extensiones de acebuche se

localizan en las provincias de Cádiz y Huelva, encontrándose también en menor proporción en la Sierra Norte sevillana.

5 En claro contraste con las numerosas publicaciones existentes sobre la composición química y efectos farmacológicos de las hojas y aceite del olivo, no existen apenas datos sobre los posibles constituyentes químicos del acebuche ni sobre su potencial terapéutico. Es sabido que distintas variedades de una misma especie vegetal pueden tener composición química y actividades farmacológicas diferentes, por lo que no es de extrañar que la variedad salvaje de olivo (acebuche) tenga una composición química  
10 distinta a la del olivo cultivado. De hecho, estudios previos han puesto de manifiesto la presencia de un elevado contenido de tocoferoles (vitamina E), con demostrada capacidad antioxidante, en el aceite de acebuchina, duplicando la cantidad encontrada en el aceite de oliva (Espejo-Maqueda, Tesis Doctoral, **2005**, Universidad de Sevilla, <https://idus.us.es/handle/11441/16008>).

15

#### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

En estudios preliminares los inventores encontraron una mayor proporción de compuestos triterpénicos ( $340,3 \pm 8,6$  mg/Kg), esteroides ( $1735 \pm 18,99$  mg/Kg) y  
20 tocoferoles ( $343,8 \pm 7,3$  mg/Kg) en el aceite de acebuchina con respecto a los estándares observados normalmente en los aceites de oliva virgen ( $153,12 \pm 1,25$  mg/Kg para triterpenos,  $1531 \pm 15,86$  mg/Kg para esteroides y  $221,76 \pm 1,79$  mg/Kg para tocoferoles), compuestos a los que se atribuye propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas (Potí et al, *International Journal of Molecular Science*, **2019**, 20, 1-26).

25

Por lo anteriormente citado, en la presente invención se ha profundizado en los mecanismos de acción implicados en la producción de un desbalance oxidativo retiniano, haciendo principal hincapié en la enzima NADPH oxidasa, y valorando el posible efecto beneficioso en la hipertensión arterial que produce la suplementación  
30 dietética con un 12% p/p de aceite de acebuchina a este nivel en un modelo de hipertensión arterial inducida mediante la administración de L-NAME (Nw-nitro-L-arginina metil éster) en ratones C57/J.

De esta manera, la presente invención pone de manifiesto el uso beneficioso del aceite

de acebuchina en la disminución del estrés oxidativo retiniano que acompaña a la hipertensión arterial (HTA), pudiendo constituir este aceite un suplemento nutricional que proteja al sistema visual, concretamente a la retina, frente a la mencionada patología, así como usarse sola, o junto a otros agentes terapéuticos, como adyuvante  
5 para una mayor protección del daño retiniano asociado a la hipertensión arterial. Este efecto protector del aceite de acebuchina se produce por una disminución en la actividad retiniana de la enzima NADPH oxidasa, disminuyendo los niveles de anión superóxido.

Por lo tanto, la presente invención ofrece un nuevo uso para el aceite de acebuchina  
10 como óculo protector retiniano en la hipertensión arterial. De este modo, el aceite de acebuchina podría emplearse como un producto funcional, como suplemento en la dieta o bien mediante la utilización de formas farmacéuticas, para ayudar a prevenir o controlar el daño retiniano asociado a la hipertensión arterial. El uso concomitante de  
15 aceite de acebuchina con los medicamentos antihipertensivos dirigidos a descender los valores de presión arterial podría tener un efecto coadyuvante como protector retiniano en la hipertensión arterial, dada su actividad antioxidante, así como la hipotensora. Además, el aceite de acebuchina presenta baja toxicidad, así como falta de efectos secundarios, que lo hacen un perfecto candidato como suplemento a aplicar en las  
20 personas hipertensivas.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al aceite de  
20 acebuchina para su uso como medicamento.

Y en un segundo aspecto, la presente invención se refiere al aceite de acebuchina para  
25 su uso para la prevención y/o tratamiento del daño retiniano asociado a la hipertensión arterial y las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial, como el glaucoma, la DMAE, la retinopatía hipertensiva o la retinopatía diabética, entre otras.

En una realización preferida, el aceite de acebuchina se administra a través de una dieta  
30 enriquecida con un porcentaje de entre el 10 y 15% p/p de aceite de acebuchina, y más preferiblemente del 12% p/p del aceite, lo que se corresponde a una dosis diaria comprendida entre 1,3 y 1,9 ml/ Kg peso corporal, y más preferiblemente 1,5 ml/Kg peso corporal/día de aceite de acebuchina.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un complemento alimenticio que comprende aceite de acebuchina para su uso en la prevención de la hipertensión arterial y/o las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial seleccionadas de entre glaucoma, la DMAE, la retinopatía hipertensiva o la retinopatía diabética, entre otras.

En una realización preferida, el complemento alimenticio comprende entre 1,3 y 1,9 ml/Kg peso corporal/día, y más preferiblemente 1,5 ml/Kg peso corporal/día de aceite de acebuchina.

En otro aspecto, dicho complemento alimenticio se suministra a sujetos hipertensos para reducir la presión arterial.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende aceite de acebuchina, de forma que dicha composición farmacéutica permita la liberación del aceite de acebuchina y/o de sus componentes farmacológicamente activos, reduciendo los daños retinianos asociados a la hipertensión arterial, así como de otras patologías oculares (glaucoma o diferentes retinopatías, como la DMAE, la retinopatía hipertensiva o la retinopatía diabética, entre otras) que se ven favorecidas con la hipertensión arterial.

En una realización más preferida, la composición farmacéutica comprende una cantidad de aceite de acebuchina comprendida entre 1,3 y 1,9 ml/ Kg peso corporal/día, y más preferiblemente 1,5 ml/Kg peso corporal/día.

En una realización más preferida, el aceite de acebuchina se emplea como coadyuvante en dicha composición farmacéutica.

En una realización más preferida, dicha composición farmacéutica comprende además otros agentes (incluyendo, pero no limitado a IECAS, ARA-II, diuréticos tiazídicos, bloqueadores de canales de calcio, antagonistas beta-adrenérgicos) para el tratamiento de la hipertensión arterial y/o las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial (glaucoma o diferentes retinopatías, como la DMAE, la retinopatía hipertensiva o la retinopatía diabética, entre otras).

En otra realización preferida dicha composición farmacéutica se emplea para la prevención y/o tratamiento del daño retiniano asociado a la hipertensión arterial y las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial, como el glaucoma, la DMAE, la retinopatía hipertensiva o la retinopatía diabética, entre otras.

En otra realización más preferida dicha composición farmacéutica se suministra a pacientes hipertensos.

Un último aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención del daño retiniano asociado a la hipertensión arterial y las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial (glaucoma y diferentes retinopatías como la DMAE, la retinopatía hipertensiva o la retinopatía diabética, entre otras) que comprende el uso de aceite de acebuchina en una cantidad terapéuticamente efectiva. En relación a ese aspecto de la invención, la composición farmacéutica además podrá comprender otros agentes para el tratamiento de la hipertensión arterial.

En la presente invención el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de aceite de acebuchina que administrada a un paciente es suficiente para tratar los estados patológicos, condiciones o trastornos contra los que tienen utilidad dicho aceite. Dicha cantidad debería ser suficiente para obtener la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o paciente explorado por un investigador o un facultativo. La cantidad terapéuticamente efectiva puede ser determinada rutinariamente por un especialista en la materia, teniendo en cuenta sus propios conocimientos, el estado técnico previo y esta invención.

En la presente invención el término "dieta" se refiere a una composición básica de nutrientes que debe ser ingerida diariamente. Particularmente, el término "dieta enriquecida" se refiere al conjunto de sustancias que se ingiere regularmente a la cual se le añade, en el caso de la presente invención, a su total un 12% p/p de aceite de acebuchina.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para

los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** Medida semanal de la presión arterial sistólica en los diferentes grupos experimentales. <sup>a</sup>p<0.05 vs CONTROL; <sup>b</sup>p<0.05 vs L-NAME; <sup>d</sup>p<0.05 vs LN+OLIVA; <sup>e</sup>p<0.05 vs ACEBUCHE.

10

**Fig. 2.** Medida de la actividad NADPH oxidasa en homogeneizados de retina. <sup>a</sup>p<0.05 vs CONTROL; <sup>b</sup>p<0.05 vs L-NAME; <sup>d</sup>p<0.05 vs LN+OLIVA.

15

**Fig. 3.** Caracterización de la fuente de producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ). Utilización de diferentes inhibidores para analizar la fuente de producción de anión superóxido: Difenilefonio (DPI) inhibidor de flavoproteínas, Oxipurinol (OXI) inhibidor de la xantina oxidasa, Rotenona (ROT) inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones, GSKT136901 inhibidor dual de la NOX1/NOX4 y VAS2870 pan-inhibidor de las NOXs. <sup>a</sup>p<0.05 vs CONTROL; <sup>b</sup>p<0.05 vs L-NAME.

20

25

**Fig. 4.** Medida de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en las diferentes capas retinianas. La medida de los niveles de anión superóxido fueron llevadas a cabo mediante la tinción de dihidroetidio (DHE). En rojo, la tinción con DHE y en azul la marcación de los núcleos de las diferentes capas de la retina por DAPI, entre la que encontramos, la capa de células ganglionares (GCL), la capa nuclear interna (INL), la capa nuclear externa (ONL) y los segmentos externos (OS) conocidos como fotorreceptores. Además, se indican la capa plexiforme interna (IPL) y externa (OPL). Por otro lado, se muestran las imágenes al preincubar los cortes con PEG-SOD para corroborar la especificidad del DHE. <sup>a</sup>p<0.05 vs CONTROL; <sup>b</sup>p<0.05 vs L-NAME; <sup>c</sup>p<0.05 vs OLIVA; <sup>d</sup>p<0.05 vs LN+OLIVA; <sup>e</sup>p<0.05 vs ACEBUCHE.

30

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1

Se emplearon ratones machos de la cepa C57/J de edades comprendidas entre 10-12 semanas, estableciéndose seis grupos experimentales de animales:

- 5       • Grupo A: ratones normotensos con una dieta no enriquecida (CONTROL).
- Grupo B: ratones normotensos con dieta rica en 12% p/p de aceite de acebuchina (ACEBUCHE).
- Grupo C: ratones normotensos con dieta rica en 12% p/p de aceite de oliva virgen extra (OLIVA).
- 10       • Grupo D: ratones con HTA inducida por 45 mg de L-NAME/kg de peso/día con una dieta no enriquecida (L-NAME).
- Grupo E: ratones con HTA inducida por 45 mg de L-NAME/kg de peso/día con dieta rica en 12% p/p de aceite de acebuchina (LN+ACEBUCHE).
- Grupo F: ratones con HTA inducida por 45 mg de L-NAME/kg de peso/día con  
15       dieta rica en 12% p/p de aceite de oliva virgen extra (LN+OLIVA).

El grupo de dieta enriquecida con aceite de acebuchina fue comparado con un grupo suplementado con aceite de oliva virgen extra. Tanto el aceite de acebuchina como el aceite de oliva virgen extra son suministrados por la almazara “Molino de Monda”, que  
20       se encuentra en el entorno de la malagueña Sierra de las Nieves, y que realiza la producción de ambos aceites siguiendo las mismas condiciones de extracción y producción. El tratamiento con los aceites se llevó a cabo utilizando un pienso comercial enriquecido con un 12% p/p de los aceites: con aceite de acebuchina (los grupos ACEBUCHE y LN+ACEBUCHE), y con aceite de oliva virgen extra (en los grupos OLIVA  
25       y LN+OLIVA).

Por el contrario, las ratas del grupo CT y grupo L-NAME, se alimentaron con el pienso comercial sin enriquecer. Tanto el tratamiento con de L-NAME como el de los aceites se mantuvieron durante 6 semanas. Durante este periodo, los animales en condiciones  
30       estándar (23+/-1°C, ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad). Todos los ratones se alimentaron de forma *ad libitum* con acceso libre a su bebida.

Durante el tiempo de tratamiento se midió semanalmente la presión arterial sistólica mediante el método indirecto de oclusión en la cola. Para ello, se utiliza un medidor de

presión NIPREM 645 (CIBERTEC, España) acoplado a un sistema de recogida de datos con soporte informático (Fig. 1).

5 Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se sacrifican los animales y se enuclean los globos oculares, utilizándose algunos para la preparación de cortes histológicos de parafina y otros para el aislamiento de las retinas (Cammalleri et al., *Nutrients*, **2017**, 9: 1079).

10 Para la obtención de los homogeneizados de retinas, estas se depositan en un homogeneizador de vidrio junto con 150 µL del tampón de homogenización formado por la mezcla de PBS (P4417-100TAB, Sigma) con un inhibidor de proteasas (Protease inhibitor Cocktail Complete™, Roche). Inmediatamente después, se realiza una homogenización vidrio-teflón en un homogeneizador Heidolph RZR 2102, aplicando al émbolo de teflón acoplado al motor una velocidad de rotación de 2000 rpm. Para evitar  
15 un sobrecalentamiento que eventualmente pudiera desnaturalizar las proteínas, la homogeneización se realiza en frío y secuencialmente, en intervalos de 15 segundos intercalados con periodos de reposo de 5-10 segundos, hasta observar un homogeneizado uniforme. Posteriormente, el homogeneizado se centrifuga a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar restos de orgánulos celulares, y el  
20 sobrenadante se utiliza para la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford 1976; 72: 248-254) y la actividad NADPH oxidasa, enzima principal productor del agente prooxidante anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Blanca et al., *Food Chemistry*, **2017**, 228, 356-366).

25 La medida de la actividad de la enzima NADPH oxidasa se lleva a cabo mediante quimioluminiscencia, usando un protocolo frecuentemente utilizado en nuestro grupo (Blanca et al., *Food Chemistry*, **2017**, 228: 356-366. La reacción se lleva a cabo en tubos de poliestireno para luminómetro en un luminómetro estándar (BERTHOLD junior LB 9509). Se deposita en la parte inferior del tubo un volumen de muestra a analizar  
30 equivalente a 100 µg de proteínas, y seguidamente se añaden 10 µL de NADPH 3 mM, y 280 µL de lucigenina 5,35 µM (incubada previamente a 37°C en un baño en condiciones de oscuridad). El tubo se introduce en el luminómetro, programado para un tiempo de registro de 4 minutos. Los resultados se expresan en unidades relativas de luz (URL) por cada 100 µg de proteínas. Para eliminar la contribución inespecífica de

los reactivos a las lecturas de URL, se realiza también un blanco de muestra, procesado de la misma forma, pero con la salvedad de que no añadimos NADPH (sustrato de la enzima NADPH oxidasa) (Fig. 2).

5 Con el fin de caracterizar la fuente de  $O_2^-$ , tratamos la muestra con diferentes inhibidores de las fuentes de ROS, como DPI (inhibidor de flavoproteínas), oxipurinol (OXI, inhibidor de la xantina oxidasa) y rotenona (ROT, inhibidor de la cadena mitocondrial de transporte de electrones; los cuales se incuban junto a la muestra durante 5 minutos a 37°C con concentraciones de 1 mM. De igual forma, se utilizaron inhibidores específicos  
10 de las isoformas NOX como son el inhibidor parcial de la NOX1 y la NOX4, GKT136901 (CAS 955272-06-7, Sigma) y el pan-inhibidor de las NOXs, VAS2870 (SML0273, Sigma) (Fig. 3).

Con el objetivo de localizar los niveles de  $O_2^-$  en las diferentes capas de la retina,  
15 realizamos la tinción con dihidroetidio (DHE) en cortes histológicos (Sasaki M et al., Diabetologia 2010;53:971–9). Los cortes de parafina se incuban con DHE 10 mM diluido en PBS durante 10 min a 37°C en condiciones de oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se seca el exceso del reactivo, y se procede al montaje usando como adhesivo la solución de montaje DAPI Fluoromount-G®, que contiene 4',6-  
20 diamidino-2-fenilindol (DAPI) un marcador nuclear de adenina y timina, sellando la preparación con un cubreobjetos. Para confirmar la especificidad de la tinción del DHE, se preincuban cortes histológicos con 100 U/mL de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) conjugada con polietilenglicol (PEG-SOD) durante 10 min a 37°C, siguiendo el protocolo experimental anteriormente citado. Esta enzima está encargada  
25 de secuestrar el anión superóxido de nuestra muestra y, por tanto, nos dirá si la fluorescencia realmente es anión superóxido. Por último, las secciones se examinan en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61) y se fotografían con una cámara digital de color (Olympus DP73) a iguales tiempos de exposición (Fig. 4).

30 Los resultados muestran que una dieta enriquecida en 12% p/p de aceite de acebuchina, administrada en animales hipertensos durante 6 semanas, disminuye la presión arterial sistólica (Fig. 1) y actúa como elemento óculo protector en el proceso oxidativo retiniano asociado a la hipertensión arterial. Este efecto antioxidante de la dieta se confirma por una disminución en la actividad de la enzima NADPH oxidasa, y en consecuencia en los

niveles de  $O_2^-$  observado en las diferentes capas celulares de la retina (concretamente, en la capa de células ganglionares, la capa nuclear interna, la capa nuclear externa, los segmentos externos o fotorreceptores) (Fig. 2, 3 y 4).

- 5 Además, nuestros resultados avalan un mayor efecto hipotensor y antioxidante del aceite de acebuchina comparado con un aceite de oliva virgen extra que fue obtenido y procesado en las mismas condiciones que el aceite de acebuchina utilizado (Fig. 1, 2, 3 y 4).

## REIVINDICACIONES

1. Aceite de acebuchina para su uso en el tratamiento y/o prevención de las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial seleccionadas de entre glaucoma, la retinopatía hipertensiva y la retinopatía diabética.  
5
2. Aceite para su uso según la reivindicación 1 donde el aceite de acebuchina se administra a través de una dieta enriquecida con un porcentaje de entre el 10 y 15% p/p de dicho aceite.  
10
3. Aceite para su uso según la reivindicación 2 donde el aceite de acebuchina se administra a través de una dieta enriquecida con un porcentaje del 12% p/p de dicho aceite.
- 15 4. Aceite para su uso según la reivindicación 1 donde el aceite de acebuchina se administra a través de una dosis diaria comprendida entre 1,3 y 1,9 ml/ Kg peso corporal.
- 20 5. Aceite para su uso según la reivindicación 4 donde el aceite de acebuchina se administra a través de una dosis diaria de 1,5 ml/Kg peso corporal.
- 25 6. Complemento alimenticio que comprende aceite de acebuchina para su uso en la prevención de las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial, donde las patologías retinianas se seleccionan de entre glaucoma, la retinopatía hipertensiva y la retinopatía diabética.
7. Complemento alimenticio para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 que comprende entre 1,3 y 1,9 ml/ Kg peso corporal/día, de aceite de acebuchina.
- 30 8. Complemento alimenticio para su uso según la reivindicación 7 que comprende 1,5 ml/Kg peso corporal/día de aceite de acebuchina.
- 35 9. Composición farmacéutica que comprende aceite de acebuchina para su uso en el tratamiento y/o prevención de las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial seleccionadas de entre glaucoma, la retinopatía hipertensiva y la retinopatía diabética.

10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9 donde la cantidad de aceite de acebuchina está comprendida entre 1,3 y 1,9 ml/ Kg peso corporal/día.
- 5 11. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10 donde la cantidad de aceite de acebuchina es de 1,5 ml/Kg peso corporal/día.
12. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 donde el aceite de acebuchina es el coadyuvante en dicha composición farmacéutica.
- 10
13. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 que además comprende otros agentes para el tratamiento de la hipertensión arterial y/o las patologías retinianas favorecidas por la hipertensión arterial.
- 15

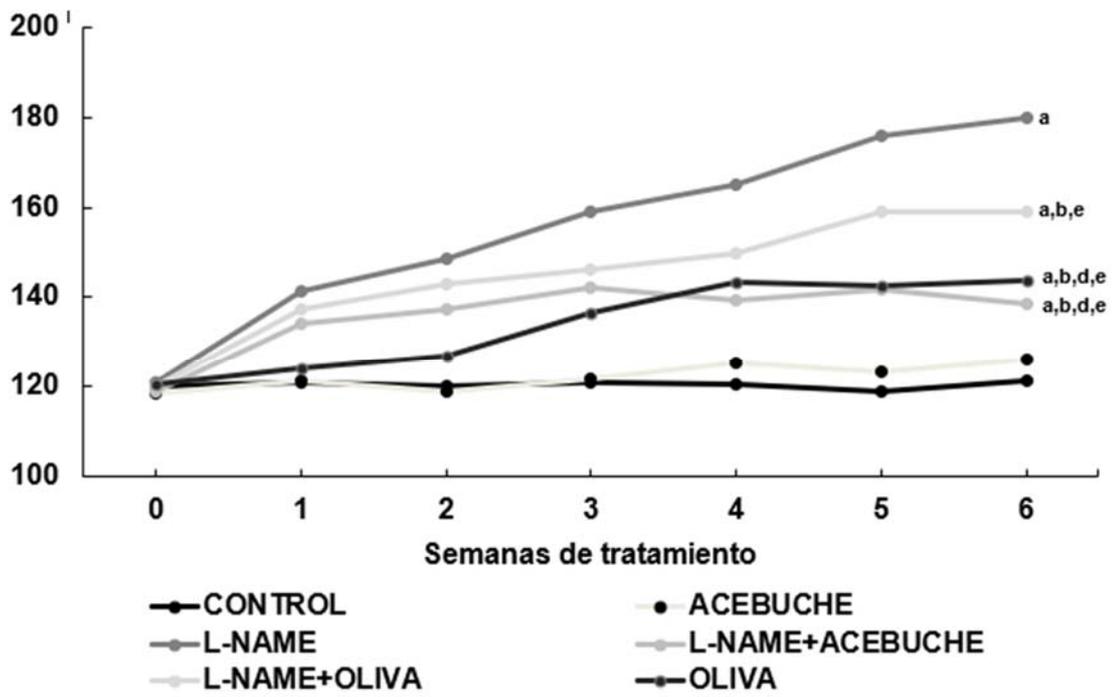


Fig. 1

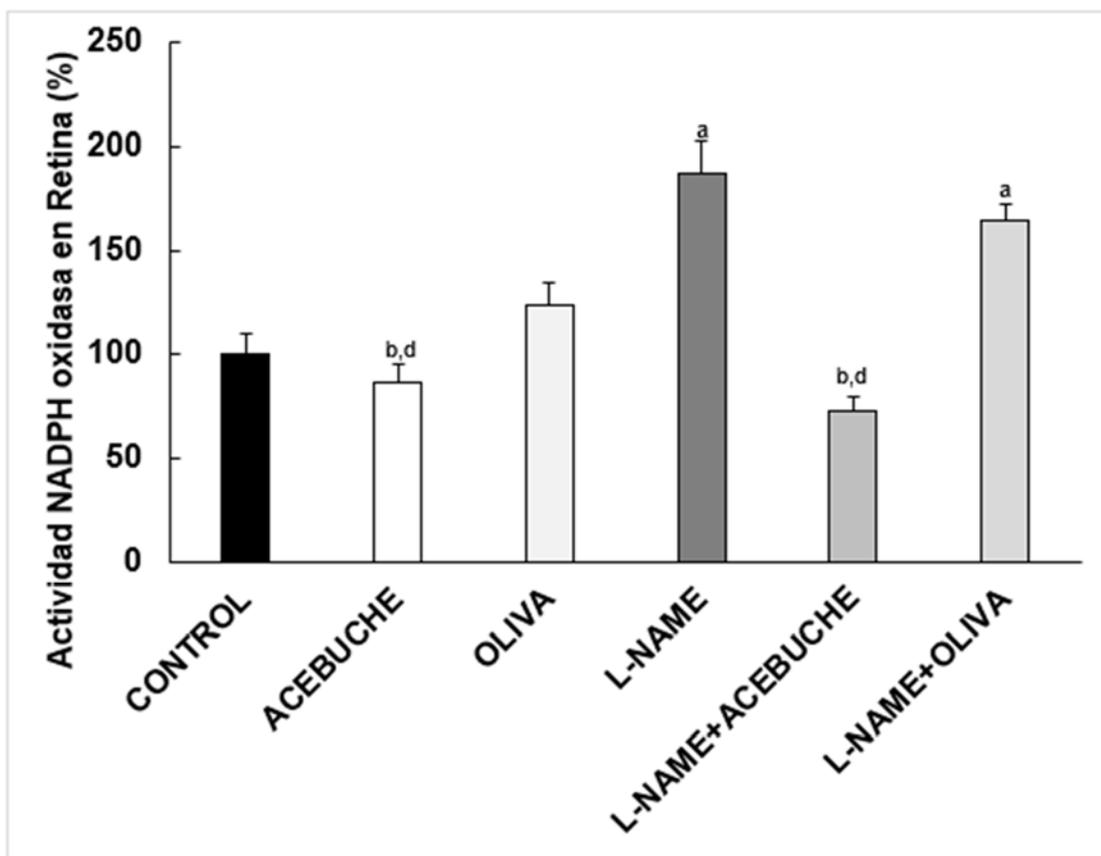


Fig. 2

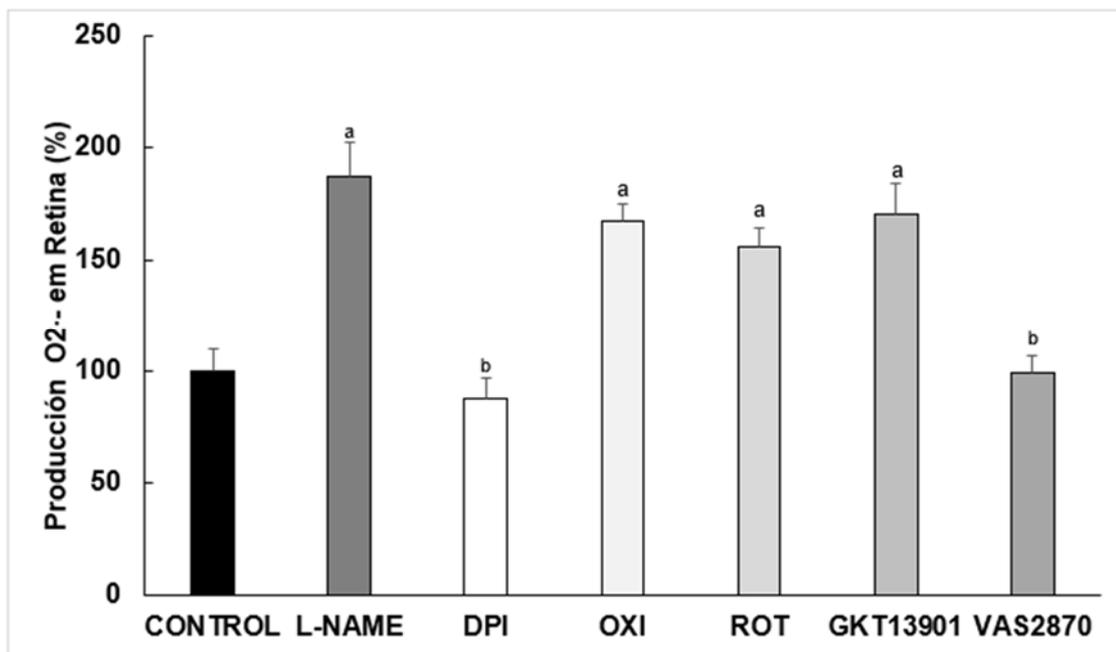


Fig. 3

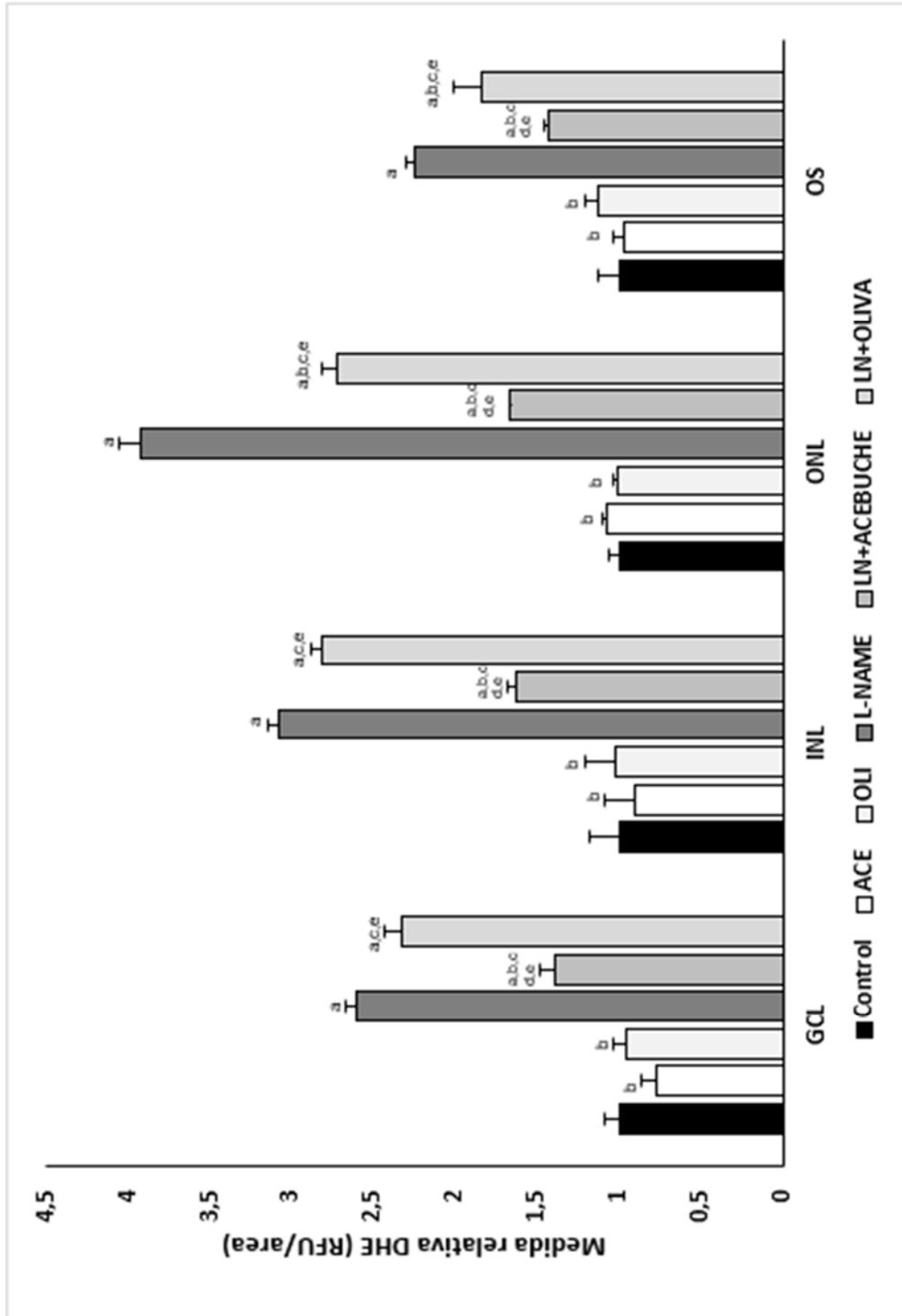


Fig. 4

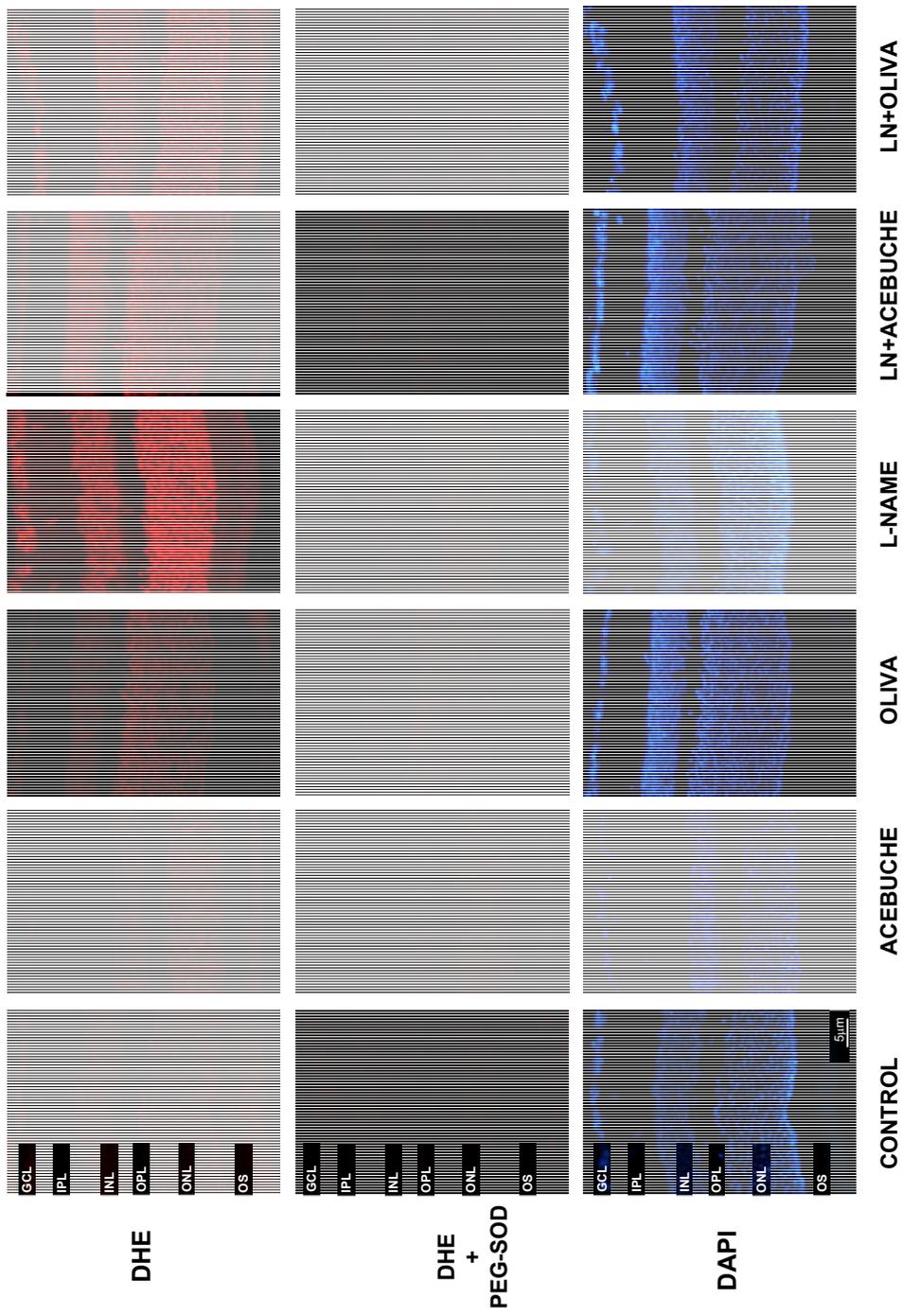


Fig. 4 (Cont.)