



Original / Alimentos funcionales

# Efecto sobre el neurodesarrollo y neuroprotección en pez cebra de un extracto polifenólico de huesos de aceituna

Ernesto Cortés Castell<sup>1</sup>, C. Veciana Galindo<sup>2</sup>, L. Torro Montell<sup>2</sup>, E. Sirvent Segura<sup>2</sup>, M. M. Rizo Baeza<sup>3</sup> y V. Gil Guillén<sup>4</sup>

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

## Resumen

**Objetivo:** Determinar el efecto de un extracto polifenólico de hueso de oliva en el desarrollo del sistema nervioso y frente al daño inducido mediante la neurotoxina ácido kaínico, utilizando como modelo animal el pez cebra.

**Material y métodos:** Se analiza el efecto del extracto a la máxima dosis tolerada (100 mg/ml de polifenoles) sobre la actividad colinérgica en larvas de pez cebra (72 horas post-fertilización). Se utilizan únicamente huevos fecundados sin anomalías. Se incuban 6 huevos/pocillo en microplaca de 24 pocillos en 2 ml de agua con DMSO (0,1%) a  $26 \pm 1^\circ \text{C}$ : a) neurodesarrollo: agua (control) y con 100 mg/ml de extracto, como ensayo; b) neuroprotección: agua y ácido kaínico (100  $\mu\text{M}$ ) (control) y con 100 mg/ml de extracto (ensayo). Todas las incubaciones por triplicado. A las 72 h se examinan y verifica ausencia de anomalías. Las larvas se homogeneizan y en los sobrenadantes se cuantifica actividad acetilcolinesterasa y concentración proteínas.

**Resultados:** La cantidad de proteína y apreciación morfológica es análoga en todos los ensayos, indicando mismo desarrollo. La acetilcolinesterasa en las larvas de pez, con el extracto polifenólico es del 162,2% (SD 44,2) respecto a controles (100% de actividad) ( $p < 0,01$ ). Las larvas de pez tratadas con ácido kaínico y extracto polifenólico presentan el 140,1% (SD 22,0) de actividad, respecto a las incubadas únicamente con la neurotoxina (100%) ( $p < 0,05$ ).

**Conclusión:** Los polifenoles extraídos de los huesos de aceituna producen incremento de actividad colinérgica durante el neurodesarrollo larvario en el pez cebra y protección frente a la neurotoxina ácido kaínico.

(Nutr Hosp. 2014;30:338-342)

DOI:10.3305/nh.2014.30.2.7604

Palabras clave: Polifenoles. Hueso oliva. Acetilcolinesterasa. Ácido kaínico. Pez cebra.

**Correspondencia:** Ernesto Cortés Castell.  
Universidad Miguel Hernández.  
España.  
E-mail: ernesto.cortes@umh.es

Recibido: 16-V-2014.  
Aceptado: 19-VI-2014.

## EFFECT ON ZEBRAFISH NEURODEVELOPMENT AND NEUROPROTECTION OF A POLYPHENOLIC EXTRACT OLIVE SEEDS

### Abstract

**Objective:** To determine the effect of a polyphenolic extract from olive pit on the development of the nervous system as well as its effect on pain induced by the neurotoxin kainic acid, taking the zebrafish as the animal model.

**Material and methods:** We analyse the effect of the extract at the maximum tolerated dose (100 mg/ml of polyphenols) on the cholinergic activity in zebrafish larvae (72 hours post-fertilization). Only fecundated eggs with no abnormalities are used. 6 eggs/bowl are incubated in a 24 bowls microplate in 2 ml of water with DMSO (0.1%) at  $26 \pm 1^\circ \text{C}$ : a) neurodevelopment: water (control) and 100 mg/ml of extract, as an essay; b) neuroprotection: water and kainic acid (100  $\mu\text{M}$ ) (control) and 100 mg/ml of extract (essay). All incubations are in triplicate. After 72 h, incubations are examined and checked for any abnormalities. Larvae are homogenized and acetyl cholinesterase activity and protein concentration in supernatants is quantified.

**Results:** The quantity of protein and the morphologic appreciation is similar in all the essays, showing a standard development. Acetyl cholinesterase in fish larvae, with the polyphenolic extract is 162.2% (SD 44.2) compared to controls (100% of activity) ( $p < 0.01$ ). Fish larvae treated with kainic acid and polyphenolic acid show 140.1% (SD 22.0) of activity, compared to those only incubated with the neurotoxin (100%) ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Polyphenols extracted from olive pit produce an increase in the cholinergic activity during the larvae neurodevelopment in the zebrafish as well as protection against the neurotoxin kainic acid.

(Nutr Hosp. 2014;30:338-342)

DOI:10.3305/nh.2014.30.2.7604

Key words: Polyphenols. Olive pit. Acetyl cholinesterase. Kainic acid. Zebrafish.

## Introducción

Hace tiempo que se conoce que la ingesta de determinados nutrientes puede influir sobre determinadas funciones cerebrales, de forma decisiva durante el desarrollo perinatal, pero también en otras etapas de la vida, como en la etapa adulta y la tercera edad. De hecho, recientemente se ha demostrado la existencia de una programación fetal o neonatal de la salud en la etapa adulta, lo que implica que nunca se deben considerar las distintas etapas fisiológicas de forma aislada, sino relacionadas. Entre estos nutrientes están los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (DHA) y compuestos antioxidantes naturales como los polifenoles, siendo importantes para la formación y desarrollo de las neuronas y otras células del SNC, pero también son claves en los adultos para la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Diversos estudios realizados *in vitro*, en modelos animales y en humanos han demostrado que la suplementación con estos nutrientes se asocia a una mejora de la función cognitiva, que se refleja en una mejora del proceso de aprendizaje o la memoria en niños o a una prevención del declive en personas de la tercera edad.

Estos conocimientos han despertado un creciente interés por nuevos alimentos ricos en sustancias con capacidad neuroprotectora, que puedan contribuir a prevenir la incidencia de factores degenerativos desde la infancia y mitigar el impacto de enfermedades de carácter neurodegenerativo, que presentan un creciente índice de prevalencia en la edad madura.

Diversos mecanismos de acción se han propuesto para explicar la capacidad neuroprotectora de estas sustancias, entre ellos la acción antiinflamatoria, la modulación de vías de señalización intracelular, la modulación de la expresión de proteínas, la inhibición de las vías apoptóticas o la acción antioxidante<sup>1</sup>.

Los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células<sup>2</sup>, así una dieta abundante en frutas y vegetales ricos en polifenoles y antocianinas proporciona un riesgo más bajo de contraer cáncer, enfermedades cardíacas y algunas enfermedades neurológicas<sup>3</sup>. Sugiriéndose que los compuestos presentes en estos alimentos pueden prevenir la neurodegeneración causada por el estrés oxidativo<sup>4</sup>.

Los estudios realizados sobre el desarrollo del SNC del pez cebra<sup>5</sup> indican que a las 24 horas ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (precursores de músculo y esqueleto). A los cinco días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Asimismo, ha aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales. En este momento el pez es capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento.

El objetivo es determinar el efecto de la suplementación de un extracto polifenólico de hueso de oliva en

fenómenos de neuroprotección frente a daño inducido mediante la neurotoxina ácido kaínico (KA) y su influencia en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), utilizando como modelo animal el pez cebra.

## Material y métodos

Se ha utilizado como modelo experimental la larva de pez cebra (*Danio rerio*), analizando el efecto de la suplementación del extracto a la máxima dosis tolerada (MTD) de 100 mg/ml de polifenoles en larvas de 72 horas post-fertilización (hpf)<sup>6</sup>. El efecto sobre el neurodesarrollo se realiza mediante el cultivo de los huevos en presencia del extracto. El efecto neuroprotector del extracto se determina frente a una pérdida controlada de neuronas colinérgicas. Como marcador del estado general del sistema nervioso central, en ambos casos, se utiliza la actividad colinérgica.

Para la realización de los ensayos fueron utilizados únicamente aquellos huevos fecundados que no presentaron ningún tipo de anomalía externa (asimetrías, vesículas,...) o cuya membrana estaba dañada. Se transfirieron 6 huevos/pocillo a una microplaca de 24 pocillos en un volumen de 2 ml con los siguientes tratamientos:

**Neurodesarrollo:** Para analizar el posible efecto sobre el neurodesarrollo se incubaron los huevos en agua con DMSO (0,1%)(Sigma-Aldrich) y en este mismo medio adicionado con 100 mg/ml del extracto de polifenoles, a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 72 h.

**Neuroprotección:** Se utilizó el ácido kaínico como neurotoxina inductora de daño neuronal. Se incubaron los huevos en agua con DMSO (0,1%) y ácido kaínico (100  $\mu\text{M}$ ) y el mismo medio con KA y 100 mg/ml del extracto, a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se examinaron las larvas determinando que el estado general de las mismas era correcto, sin ningún tipo de anomalías externas visibles. Todas las incubaciones se realizaron por triplicado.

Una vez finalizada la incubación y su control se cuantifico la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) mediante el método Ellman modificado<sup>7</sup>. Se homogeneizaron mecánicamente las larvas, se centrifugo a 12.000 rpm durante 10 minutos y se midieron los niveles de AChE en cada muestra. El método está basado en la hidrólisis enzimática del sustrato acetiltiocolina ATCh, y la tiocolina liberada reacciona con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB), dando lugar al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo con máximo de absorbancia entre 405 y 420 nm. de onda. La reacción se llevo a cabo añadiendo a cada pocillo de la microplaca 280 l de DTNB en buffer PBS 0.1M (pH 7,8), 10  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático (homogeneizado), iniciándose la reacción al agregar 10  $\mu\text{l}$  de cloruro de acetiltiocolina. Inmediatamente, en un lector de microplacas se hicieron las lecturas de absorbancia. Se realizaron tres replicados y como blancos se utilizaron 3 pocillos por microplaca sustituyendo el homogenei-

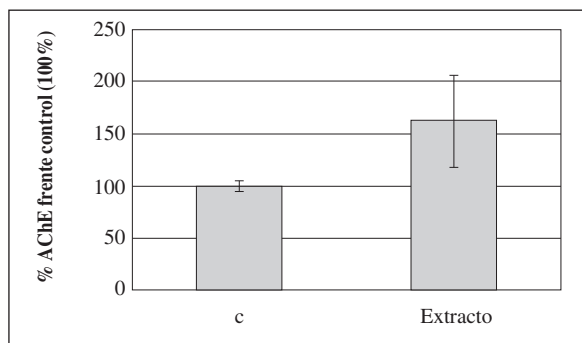


Fig. 1.—Niveles de acetilcolinesterasa (media  $\pm$  SD) en las larvas de pez cebra incubadas con 100 mg/ml de extracto polifenólico de huesos de oliva, frente al control sin extracto, considerado como el 100% de actividad.

zado por buffer. Se realizó la recta de calibrado con 7 patrones entre 0-400 mU/ml de AChE, rindiendo una recta de  $r^2 = 0,9735$  y de ecuación: AChE (mU/ml) =  $116 \times \text{Abs}_{420\text{nm}}$ .

Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación de proteína total de cada grupo experimental con BCA<sup>8</sup>, para normalizar el efecto de los niveles de AChE con los niveles de proteína. El método de BCA emplea el ácido bicinconónico capaz de formar un complejo púrpura intenso con los iones  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino que tiene lectura de absorbancia a 562 nm. Se añaden 100  $\mu\text{l}$  de BCA a 10  $\mu\text{l}$  de muestra, se incuban 10 minutos a 60° C y se lee la absorbancia a 562nm. Se realizó la recta de calibrado con 10 patrones entre 0-1600  $\mu\text{g/ml}$ , dando una recta de  $r^2 = 0,9942$  y de ecuación: proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $749 \times \text{Abs}_{562\text{nm}}$ .

## Resultados

La cantidad de proteína es análoga en todos los homogeneizados de las larvas de pez, siendo una buena medida del tamaño de las mismas y no constatándose diferencias ni efectos en los distintos medios de cultivo, al igual que la apreciación visual, sin alteraciones morfológicas visibles ni por acción del extracto de huesos de oliva, ni por el ácido kaínico.

a) Neurodesarrollo: Los niveles de acetilcolinesterasa en las larvas de pez cebra a las 72 hpf, en el medio de incubación con extracto de huesos de oliva ha sido del 162,2% (SD 44,2) frente a los controles únicamente con el agua con DMSO considerados el 100% de actividad, diferencia que es significativa según el test de Dunnett ( $p < 0,01$ ). Esta diferencia se ilustra en la figura 1.

b) Neuroprotección: La actividad de acetilcolinesterasa en las larvas de pez cebra a las 72 hpf tratadas durante ese periodo con ácido kaínico en presencia del extracto de polifenoles es de 140,1% (SD 22,0) frente a la actividad de las que han sido incubadas únicamente con la neurotóxina que ha sido considerada el 100%, con una diferencia que es significativa según el test de

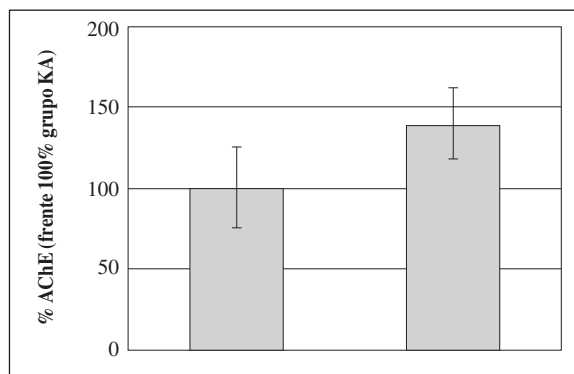


Fig. 2.—Niveles de acetilcolinesterasa (media y SD) en las larvas de pez cebra incubadas con 100 mg/ml del extracto y KA (100  $\mu\text{M}$ ), frente al grupo tratado únicamente con ácido kaínico, considerado como el 100% de actividad enzimática.

Dunnett ( $p < 0,05$ ). Esta diferencia está ilustrada en la figura 2.

## Discusión

El síndrome excitotóxico se ha descrito como una importante causa de daño y muerte neuronal en enfermedades neuropatológicas como la hipoxia, isquemia, epilepsia y la enfermedad de Alzheimer. Este fenómeno ha sido inducido en experimentos con roedores mediante la inyección de agonistas de glutamato como es el caso del ácido kaínico (KA), el cual causa *status epilepticus* junto con neurodegeneración posterior en la corteza y el hipocampo<sup>9,10,11</sup>.

El modelo de pez cebra se ha utilizado en ensayos de excitotoxicidad<sup>5</sup>, observándose el mismo fenómeno que el descrito en el modelo murino. A este respecto, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en una buena herramienta para estudios neuroconductuales, ya que muestra neuropatologías y fenotipos conductuales que son cuantificables<sup>12,13</sup> y propuesto como modelo experimental válido para estudio de la enfermedad de Alzheimer<sup>14</sup>. El pez cebra ofrece un compromiso razonable entre complejidad fisiológica y el rendimiento al tener un genoma caracterizado completamente, y mostrar homología fisiológica significativa a los mamíferos<sup>15</sup>, más estrechamente relacionado con los humanos que otros modelos como levaduras, gusanos o moscas, y el diseño y la conectividad en el centro de su sistema nervioso central (SNC) se correlaciona con la humana<sup>16</sup>. Su dualidad larva-adulto y disponibilidad de ambas formas es beneficiosa y permite la investigación de un espectro más amplio de fenómenos neurodegenerativos relacionados en la ontogénesis. Los embriones son transparentes y desarrollados externamente, hechos que permiten la observación directa de la embriogénesis y el desarrollo del sistema nervioso central. Los embriones son también fácilmente susceptibles a métodos para manipular los genes y la actividad de la proteína tales como la inyección de oligonucleótidos<sup>17</sup>, ARNm o cADN (transge-

nes), y para el cribado de bibliotecas de drogas están dispuestos en placas de microtitulación<sup>18</sup>. El desarrollo temprano del pez cebra permite analizar procesos y anomalías del sistema nervioso central, con una ventaja significativa en el análisis de las funciones cerebrales complejas características de los vertebrados<sup>19</sup>, con comportamientos de orden superior, incluyendo la memoria, respuestas condicionadas y comportamientos sociales como el aprender conductas<sup>20</sup> que lo hacen un modelo ideal para el estudio de trastornos del SNC<sup>21</sup> y modelo para el estudio de efectos de agentes bioactivos, como el caso del presente estudio.

En el presente estudio se ha utilizado el ácido kaínico como neurotoxina inductora de daño neuronal en larvas de pez cebra, con el objetivo de estudiar las propiedades neuroprotectoras del extracto a estudio mediante la determinación de los niveles de acetilcolinesterasa (AChE) como marcador del estado general del sistema nervioso central. Para ello se ha analizado el efecto de la suplementación del extracto de polifenoles de huesos de oliva frente al daño neurotóxico en larvas de 72 horas post-fertilización (hpf) utilizando la máxima dosis tolerada del extracto<sup>6</sup>. El efecto neuroprotector se determinó frente a la pérdida controlada de neuronas colinérgicas, utilizado como marcador del estado general del sistema nervioso central. Los datos obtenidos muestran que el extracto incrementó los niveles de Acetilcolinesterasa de las larvas de pez cebra comparados con la actividad colinérgica en presencia de la neurotoxina, indicando un efecto protector de aproximadamente el 40%. Del mismo modo se constata un efecto beneficioso en el desarrollo del SNC del animal, al inducir un aumento en los niveles de la enzima, alcanzando un incremento del 62,2% respecto a los niveles observados en los controles.

Los polifenoles contenidos en los extractos procedentes del olivo presentan propiedades antioxidantes que hacen que sean candidatos para la investigación de enfermedades neurodegenerativas y reguladoras de la obesidad<sup>22</sup>. Además tienen otras actividades biológicas que le confieren importancia dentro de la "Dieta mediterránea"<sup>23</sup>. Se ha demostrado, además de otros efectos beneficiosos, el poder protector de la ingesta de flavonoides, compuestos fenólicos contenidos en vinos, vegetales y frutas frente a la demencia<sup>24</sup>.

Recientes estudios sugieren que los extractos del olivo inhiben la inflamación y reducen el estrés oxidativo, observado en ratas con una isquemia cerebral provocada<sup>25</sup>. Su administración oral reduce el volumen de infarto, edema cerebral, la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro, y mejora las puntuaciones de déficit neurológico después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas.

En otros estudios, se evaluó el posible efecto neuroprotector de extracto de hoja de olivo seco en la isquemia cerebral global transitoria en gerbos de Mongolia<sup>26</sup>, valorando diferentes parámetros de estrés oxidativo y daño neuronal en el hipocampo y comparando con los efectos de la quercetina, un flavonoide conocido como

neuroprotector. El pretratamiento con extracto (100 mg/kg de peso del animal) inhibió significativamente la producción de superóxido y de óxido nítrico, disminuyó la peroxidación lipídica y aumento de actividad de la superóxido dismutasa, en todos los tiempos examinados. Además, ofreció mejoría histológica, observada por la disminución de daño neuronal en la región CA1 del hipocampo. Los efectos del extracto fueron significativamente mayores que los efectos de la quercetina (100 mg/kg peso del gerbo), indicando que ejerce una potente actividad neuroprotectora contra el daño neuronal en el hipocampo después de isquemia cerebral global transitoria, que puede atribuirse a sus propiedades antioxidantes.

Con este mismo extracto de polifenoles, se ha mostrado actividad antiinflamatoria en cultivo de monocitos humanos<sup>27</sup>.

La mayoría de los estudios sobre los efectos de los polifenoles procedentes de extractos del olivo apuntan que su acción beneficiosa se debe a su capacidad antioxidante, causada por la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno implicadas en las enfermedades humanas<sup>1</sup>.

Se concluye que los polifenoles extraídos de los huesos de aceituna producen un incremento de la actividad colinérgica durante el neurodesarrollo larvario en el pez cebra, así como una protección frente a la neurotoxina ácido kaínico.

## Referencias

1. de la Puerta R, Martínez Domínguez ME, Ruiz-Gutiérrez V. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitergic neurotransmission. *Life Sci* 2001; 69 (10): 1213-22.
2. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; (2): 291-5.
3. Bartlett H, Eperjesi F. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003; 23 (5): 383-99.
4. Bleys J, Miller E, Pastor-Barriuso R, Appel L, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006; 84 (4): 880-7.
5. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullman B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Development* 1995; 203: 255-310.
6. Veciana C, Cortés E, Torro L, Sirvent E, Rizo MM, Gil V. Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Nutr Hosp* 2014; 29 (6): 1388-93.
7. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
8. Smith et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 765.
9. Velísková J, Velísek L, Mares P. Epileptic phenomena produced by kainic acid in laboratory rats during ontogenesis. *Physiol Bohemoslov* 1988; 37: 395-405.
10. Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrophysiological, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: Metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1981; 6: 1361-91.

11. Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci* 2013; 14 (9): 18284-318.
12. Bowman TV, Zon LI. Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in zebrafish. *ACS Chem Biol* 2010; 5: 159-61.
13. Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 608-17.
14. Newman M, Verdile G, Martins RN, Lardelli M. Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 346-52.
15. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 2000; 10: 1351-8.
16. Gao M, Zhang WC, Liu QS, Hu JJ, Liu GT, Du GH. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio. *Eur J Pharmacol* 2008; 591: 73-9.
17. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish. *Nat Genet* 2000; 26: 216-20.
18. Zon LI, Peterson RT. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 35-44.
19. Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V et al. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* 2006; 3: 235-47.
20. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 353-67.
21. Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 717-24.
22. Sears B, Ricordi C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16 (9): 1137-54.
23. Visoli F. Antioxidant and aother biological activities of phenols from olives and olives oil. *Med Res Rev* 2001; 22: 65-75.
24. Commenges D. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 357-63.
25. Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulia B, Hashemi P, Pour MR. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomed* 2011; 18: 170-5.
26. Dekanski D, Selakovi V, Piperski V, Radulovi Z, Koreni A, Radenovi L. Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. *Phytomed* 2011; 18 (13): 1137-43.
27. Cortés E, Veciana C, Torro L, Sirvent E, Rizo MM, Gil V. Anti-inflammatory activity of olive seed polyphenolic extract in the THP1-XBlue-CD14 Human monocytes cell line. *Nutr Hosp* 2014; 30 (1): 113-7.