



Centro de Edafología y Biología
Aplicada del Segura

**Departamento de Ciencia y
Tecnología de los Alimentos**



Universidad de Murcia
Facultad de Medicina

**EFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS Y
ANTIBACTERIANOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS
ABUNDANTES EN CÍTRICOS Y GRANADA, Y DE SUS
DERIVADOS METABÓLICOS: MECANISMOS
CELULARES Y MOLECULARES**

**Memoria presentada para optar
al Grado de Doctor por la
Universidad de Murcia**

Juan Antonio Giménez Bastida

2012

Esta Tesis Doctoral y los estudios que se incluyen se han podido realizar gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

1. – CICYT-BFU2007-60576. Resveratrol de la dieta como cardioprotector. Biodisponibilidad, metabolismo, modulación de la expresión génica y función cardiovascular en cerdos y humanos (2007 – 2010).
2. – Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00063). Nuevos ingredientes de alimentos funcionales para mejorar la salud (Fun-C-Food) (2007 – 2012).
3. – Fundación SÉNECA (Grupo de excelencia GERM 06 04486). Ayuda a grupos y unidades de excelencia científica de la Región de Murcia.
4. – Fundación Séneca (05556/PI/04). Genómica funcional para identificar redes biomoleculares moduladas por polifenoles derivados de la dieta en modelos celulares humanos primarios frente a cancerosos.
5. – Comisión Europea (FP7-KBEE-2009-3(244956). Bees in Europe and the decline of honeybee colonies (BEE-DOC).
6. – CICYT (ALG 2011-22447). Papel de los elagitaninos de la Granada y sus metabolitos, las urolitinas, en el cáncer de colon. Estudios metabólicos y moleculares en animales modelo y pacientes (2012 – 2014).
7. – Conserjería de Agricultura de la Región de Murcia. Nuevos ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales con base científica (2007 – 2010).

El autor de esta Memoria ha disfrutado desde el 01/01/2008 hasta el 31/12/2009 de una beca predoctoral JAE-Predoc y desde el 01/01/2010 hasta el 31/12/2011 de un contrato en prácticas del CSIC.

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

JA. Giménez-Bastida, M Martínez-Florensa, JC Espín, FA. Tomás-Barberán, and MT García-Conesa. “A Citrus Containing Flavanones Represses Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Expresión and Regulates Multiple Inflammatory, Tissue Repair, and Fibrosis Genes in Human Colon Fibroblasts”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009 Oct 14;57(19):9305-15.

JA. Giménez-Bastida, P Truchado, M Larrosa, JC Espín, FA. Tomás-Barberán, A. Allende and MT García-Conesa. “Urolithins, ellagitannins metabolites produced by colon microbiota, inhibit *Quorum sensing* in *Yersinia enterocolitica*: Phenotypic response and associated molecular changes”, *Food Chemistry*, 2012, 132(3), 1465-1474 doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.003

Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC and García-Conesa MT. “Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- α induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells”, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2012, 56(5), 784-796. doi: 10.1002/mnfr.201100677.

Truchado P, **Giménez-Bastida JA**, Larrosa M, Castro-Ibáñez I, Espín JC, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Allende A, “Inhibition of Quorum sensing (QS) in *Yersinia enterocolitica* by orange extract rich in glycosylated flavanones”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, doi: dx.doi.org/10.1021/jf301365a

Giménez-Bastida JA, Larrosa M, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, Espín JC, García-Conesa MT, “Intestinal ellagitannin metabolites ameliorate cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, doi: 10.1021/jf300290f

García-Villalba R, **Giménez-Bastida JA**, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC, Larrosa M, “Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples”, *Journal of Separation Science*, 2012, doi: 10.1002/jssc.201101121

Otras publicaciones del autor realizadas durante el período pre-doctoral y que no se han incluido en la presente Tesis Doctoral:

González-Sarrías A, **Giménez-Bastida JA**, García-Conesa MT, Gómez-Sánchez MB, García-Talavera NV, Gil-Izquierdo A, Sánchez-Álvarez C, Fontana-Compiano LO, Morga-Egea JP, Pastor-Quirante FA, Martínez-Díaz F, Tomás-Barberan FA, Espín JC. “Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites, and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice” *Molecular Nutrition and Food Research*. 2010, 54, 311-322.

**EFFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS Y
ANTIBACTERIANOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS
ABUNDANTES EN CÍTRICOS Y GRANADA, Y DE SUS
DERIVADOS METABÓLICOS: MECANISMOS
CELULARES Y MOLECULARES**

**Trabajo realizado para optar al Título de Doctor por la
Universidad de Murcia**

Juan Antonio Giménez Bastida

2012

Abreviaturas

ABREVIATURAS

A: Absorbancia

$A_{m\acute{a}x}$: valor máximo de absorbancia alcanzado en fase estacionaria

AA: cido Araquidónico

ACN: Acetonitrilo

ADN: cido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AHL: *Acyl-Homoserin-Lactone* (Acil-Homoserín-Lactona)

ARN: cido Ribonucleico

ARNm: cido Ribonucleico mensajero

ATCC: *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Celulares)

BSA: *Bovine Serum Albumin* (Albúmina Sérica Bovina)

CCD: *Charge-Coupled Device*

CCR: Cáncer Colorrectal

CML: Células Musculares Lisas

COXs: *Cicloxygenases* (Ciclooxigenasas)

CT / C: Control

CU: Colitis Ulcerosa

CYP450: *Cytochrome P450* (Citocromo P450)

DAI: *Disease Activity Index* (ndice de Actividad de la Enfermedad)

DE: Desviación Estándar

DER: Desviación Estándar Relativa

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNPH: *2,4-Dinitrophenylhydrazine* (2,4-Dinitrofenilhidrazina)

DO: Densidad Óptica

DSS: *Dextran Sulfate Sodium* (Dextrán Sulfato de Sodio)

EA: *Ellagic Acid* (Ácido Elágico)

EC: Enfermedad de Crohn

ECACC: *European Collection of Cell Cultures* (Colección Europea de Cultivos Celulares)

ECV: Enfermedad Cardiovascular

EDTA: Ácido Etiléndiaminotetracético

EGCG: Epigallocatequina Galato

EI: Estándar Interno

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EMEM: *Eagle's Minimal Essential Medium* (Medio Mínimo Esencial de Eagle)

ESI: *Electrospray Ionization* (Ionización por Electrospray)

ETs: *Ellagitannins* (Elagitaninos)

EtOH: Etanol

FDR: *False Discovery Rate*

GEPAS: *Gene Expression Pattern Analysis Suite*

Gr: Granada

HAOECs/HAECs: *Human Aortic Endothelial Cells* (Células Endoteliales de Aorta Humana)

HBSS: *Hank's Buffered Salt Solution* (Solución o tampón de Hank)

HCT: Hematocrito

HDL: *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Alta Densidad)

HED: *Human Equivalent Dose* (Dosis Equivalente en Humanos)

HETAB: *Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide* (Hexadecil Trimetilamonio Bromidio)

HGB: Hemoglobina

HPLC: *High Pressure Liquid Chromatography* (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

HSL: *Homoserine Lactone* (Homoserín Lactona)

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Células Endoteliales de la Vena del Cordón Umbilical Humano)

IPA: *Ingenuity Pathways Analysis*

ISEMFs: *Intestinal Subepithelial Miofibroblasts* (Miofibroblastos Subepiteliales Intestinales)

LC Límite de cuantificación

LD: límite de detección

LDL: (*Low Density Lipoprotein*) Lipoproteína de Baja Densidad

LDLox: LDL oxidada

LDL-R: *LDL receptor* (Receptor de la LDL)

LPS: *Lipopolysaccharide* (Lipopolisacárido)

LT: Leucotrienos

MDA: Malondialdehído

MEC: Matriz Extracelular

MeOH: Metanol

MIX: Mezcla de metabolitos

MMPs: *Matrix Metalloproteinases* (Metaloproteinasas de la Matriz)

MRM: Monitorización de Reacciones Múltiples

MS: Masas

MTT: *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide* [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]

NO: *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

PAGE: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida)

PBS: *Phosphate Buffer Saline* (Tampón Fosfato Salino)

PDL: *Population Doubling Level* (Nivel de Duplicación de la Población)

PLT: *Platelets* (Plaquetas)

PMA: *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate* (Éster de Forbol-12-Miristato-13-Acetato)

PSA: *Prostate Serum Antigen* (Antígeno de Suero Prostático)

QqQ: Triple cuadrupolo

QS: *Quorum Sensing*

RBC: contenido en glóbulos rojos

RIN: *RNA Integrity Number* (Número de Integridad del ARN)

RMA: *Robust Multi-array Average*

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa)

SBF: Suero Bovino Fetal

SCFAs: *Short Chain Fatty Acids* (Ácidos grasos de cadena corta)

T: Tratado

TBS: *Tris-Buffered Saline* (Tampón Salino Tris)

TBX: Tromboxanos

TG: Triglicéridos

TLR: *Toll like receptor*

TTBS: *Tween20-Tris-Buffered Saline* (Tampón Salino Tris con Tween20)

TEP: *1,1,3,3-tetraethoxypropane* (1,1,3,3-Tetraetoxipropano)

TNBS: *2,4,6-trinitrobenzene Sulfonic Acid* (Ácido 2,4,6-trinitrobenceno-Sulfónico)

UCF: Unidades Formadoras de Colonias

UDPGA/UDP: *Uridine 5'-Diphospho-Glucuronic acid* (Uridina-5'-Difosfo- α -D-Ácido Glucurónico)

UGTs: *UDP-Glucuronyl-Transferases* (UDP-Glucuronosil-Transferasas)

UHPLC: *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución)

Uro: Urolitina

Uro-A-gluc: Urolitina A glucurónido

Uro-B-gluc: Urolitina B glucurónido

UV: Ultravioleta

VLDL: *Very Low Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de muy Baja Densidad)

WBC: contenido en glóbulos blancos

ABREVIATURAS II

ALCAM: *Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule* (Molécula de Adhesión de los leucocitos activados).

AP-1: *Activator Protein 1* (Proteína Activadora 1)

AR/AREG: *Amphiregulin* (Ampirregulina)

BCAM: *Basal Cell Adhesion Molecule*

bFGF: *basic Fibroblast Growth Factor* (Factor de Crecimiento Fibroblástico básico)

bNGF: *beta-Nerve Growth Factor* (Factor de Crecimiento Nervioso beta)

CCL-2; MCP-1: *Chemokine ligand 2* (Quimioquina Ligando 2); *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1)

CCL-20: *Chemokine ligand 20* (Quimioquina Ligando 20)

CDH1: *Cadherin 1*(Cadherina 1)

CDH3: *Cadherin 3* (Cadherina 3)

CDH5: *Cadherin 5* (Cadherina 5)

c-Myc: *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue (avian)*

COX-2: *Cyclooxygenase 2* (Ciclooxygenasa 2)

COL13A1: *Collagen, type XIII, α 1*

COL1A1: *Collagen, type I, α 1*

COL1A2: *Collagen, type I, α 2*

COL5A1: *Collagen, type V, α 2*

COL11A1: *Collagen, type XI, α 1*

COL4A1: *Collagen, type IV, α 1*

COL4A3: *Collagen, type IV, α 3*

CREB: *cAMP responsive element binding protein*

CXCL1: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*

CXCL2: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2*

CXCL3: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 3*

CXCL5: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 5*

CXCL6: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 6*

CXCL10: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 10*

CXCL11: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 11*

EGF: *Endothelial Growth Factor* (Factor de Crecimiento Endotelial)

EGF-R: *Endothelial Growth Factor Receptor* (Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial)

EpCAM: *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (Molécula de Adhesión Celular Epitelial)

FGF-4: *Fibroblast Growth Factor 4* (Factor de Crecimiento de Fibroblastos 4)

FGF-5: *Fibroblast Growth Factor 5* (Factor de Crecimiento de Fibroblastos 5)

FGF-6: *Fibroblast Growth Factor 6* (Factor de Crecimiento de Fibroblastos 6)

FGF-7: *Fibroblast Growth Factor 7* (Factor de Crecimiento de Fibroblastos 7)

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase* (Gliceraldehído-3-Fosfato-Deshidrogenasa)

GCSF: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos)

GDNF: *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor* (Factor neurotrófico derivado de las células gliales)

GM-CSF: *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Factor Estimulante de Colonias de Monocitos y Granulocitos)

HB-EGF: *Heparin-Binding EGF-like Growth Factor*

HGF: *Hepatocyte Growth Factor* (Factor de Crecimiento Hepatocitario)

ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule-1* (Molécula de Adhesión Intercelular 1)

ICAM-2: *Intercellular Adhesion Molecule-2* (Molécula de Adhesión Intercelular 2)

ICAM-3: *Intercellular Adhesion Molecule-3* (Molécula de Adhesión Intercelular 3)

IGF-I: *Insulin Growth Factor I* (Factor de Crecimiento Insulínico I)

IGF-I-sR: *Insulin Growth Factor I soluble Receptor* (Receptor soluble del Factor de Crecimiento Insulínico I)

IGF-II: *Insulin Growth Factor II* (Factor de Crecimiento Insulínico II)

IGFBP-1: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1* (Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1)

IGFBP-2: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2* (Factor de Crecimiento Insulínico tipo 2)

IGFBP-3: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3* (Factor de Crecimiento Insulínico tipo 3)

IGFBP-4: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4* (Factor de Crecimiento Insulínico tipo 4)

IGFBP-6: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 6* (Factor de Crecimiento Insulínico tipo 6)

LAMA1: *Laminin, $\alpha 1$*

IL-1 α : *Interleukin-1 α* (Interleuquina-1 α)

IL-1 β : *Interleukin-1 β* (Interleuquina-1 β)

IL-6: *Interleukin-6* (Interleuquina-6)

IL-8: *Interleukin-8* (Interleuquina-8)

IL-11: *Interleukin-11* (Interleuquina-11)

IL-24: *Interleukin-24* (Interleuquina-24)

IL-R1: *Interleukin-Receptor 1* (Receptor de la Interleuquina-1)

IFN- γ : *Interferon- γ* (Interferón- γ)

iNOS: *inducible Nitric Oxide Synthase* (Sintasa Inducible del Óxido Nítrico)

IRAK2: *Interleukin-1 receptor associated kinase 2* (Receptor de la interleuquina-1 asociado a la quinasa 2)

KGF: *Keratinocytes Growth Factor* (Factor de Crecimiento de los Queratinocitos)

LAMA1: *Laminin, $\alpha 1$* (Laminina $\alpha 1$)

M-CSF: *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos)

M-CSFR: *Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor* (Receptor del Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos)

MMP-12: *Matrix Metalloproteinase 12; Macrophage elastase* (Metaloproteínasa de Matriz 12; Macrófago elastasa)

mPGES: *microsomal Prostaglandin E Synthasa* (Prostaglandina E Sintasa microsomal)

MPO: Mieloperoxidasa

NF- κ B: *Nuclear Factor kappa B* (Factor Nuclear *kappa B*)

NT-3: *Neurotrophin-3* (Neurotrofina-3)

NT-4: *Neurotrophin-4* (Neurotrofina-4)

PAI-1: *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1)

PECAM-1: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1* (Molécula de Adhesión Celular Endotelial Plaquetaria 1)

PDGF-AA: *Platelet Derived Growth Factor-AA* (factor de crecimiento plaquetario AA)

PDGF-AB: *Platelet Derived Growth Factor-AB* (factor de crecimiento plaquetario AB)

PDGF-BB: *Platelet Derived Growth Factor-BB* (factor de crecimiento plaquetario BB)

PDGF-R- α : *Platelet Derived Growth Factor-Receptor- α* (Receptor α del Factor de Crecimiento Plaquetario)

PDGF-R- β : *Platelet Derived Growth Factor-Receptor- β* (Receptor β del Factor de Crecimiento Plaquetario)

PF-4: *Platelet Factor 4* (Factor Plaquetario 4)

PGE₂: *Prostaglandin E₂* (Prostaglandina E₂)

PIGF: *Placental Growth Factor* (Factor de Crecimiento Placentario)

PTGES: *Prostaglandin E Synthasa* (Sintasa de la Prostaglandina E)

SCF: *Stem Cell Factor* (Factor de Células Madre)

SCF-R: *Stem Cell Factor Receptor* (Receptor del Factor de Células Madre)

SELE: *Selectin E* (Selectina E)

SELL: *Selectin L* (Selectina L)

SELP: *Selectin P* (Selectina P)

SERPINE1: *Serpin Peptidase Inhibitor, clade I (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1*

SERPINB1: *Serpin Peptidase Inhibitor, clade B (ovoalbumin), member 1*

SERPINE2: *Serpin Peptidase Inhibitor, clade I (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2*

SMAD3: SMAD family member 3

SMURF2: SMAD specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2

TGF- α : *Transforming Growth Factor α* (Factor de Crecimiento Transformante α)

TGF- β : *Transforming Growth Factor β* (Factor de Crecimiento Transformante β)

TGF- β 2: *Transforming Growth Factor β 2* (Factor de Crecimiento Transformante β 2)

TGF- β 3: *Transforming Growth Factor β 3* (Factor de Crecimiento Transformante β 3)

TGF- β -R-2: *Transforming Growth Factor β Receptor II* (Receptor del Factor de Crecimiento Transformante β II)

TGF- β -R-3: *Transforming Growth Factor β Receptor III* (Receptor del Factor de Crecimiento Transformante β III)

TIMPs: *Tissue Inhibitor Metalloproteinases* (Inhibidor Tisular de las Metaloproteinasas)

TLR: *Toll Like Receptor* (Receptor Tipo Toll)

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor α* (Factor de necrosis tumoral α)

Tp53: Tumor Protein p53

VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Protein 1* (Molécula de Adhesión Celular Vascular 1)

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar)

VEGF R: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar)

Índice general

Índice General

1. -	Capítulo 1: Introducción general.....	3
1.1. -	Enfermedades prevalentes en la sociedad occidentalizada asociadas con inflamación.....	3
1.2. -	Bases generales del proceso inflamatorio.	6
1.2.1. -	Sistemas celulares involucrados en el proceso inflamatorio.	6
1.2.1.1. -	Las células del sistema inmune.	7
1.2.1.2. -	El endotelio vascular.	9
1.2.1.3. -	Las células musculares lisas.	10
1.2.1.4. -	Fibroblastos.	10
1.2.2. -	Mediadores moleculares de la inflamación.	11
1.2.2.1. -	Los sistemas enzimáticos plasmáticos.....	11
1.2.2.2. -	Otras moléculas mediadoras.....	12
1.2.2.2.1. -	Mediadores de acción rápida: histamina y serotonina..	12
1.2.2.2.2. -	Prostaglandinas y leucotrienos.	12
1.2.2.2.3. -	Citoquinas.....	13
1.2.2.2.3.1. -	Citoquinas pro-inflamatorias.	13
1.2.2.2.3.2. -	Citoquinas anti-inflamatorias.	16
1.3. -	Aterosclerosis.	17
1.3.1. -	Arterias: componentes celulares y moleculares principales involucrados en la inflamación vascular.....	17
1.3.2. -	Desarrollo de la aterosclerosis.....	20
1.3.2.1. -	Adhesión de monocitos a células endoteliales.	21
1.3.2.2. -	Angiogénesis y aterosclerosis.....	24
1.3.2.2.1. -	Migración de las células endoteliales.....	25

1.4. – Enfermedades inflamatorias del intestino.	27
1.4.1. – La mucosa intestinal: principales elementos celulares constitutivos y papel en la inflamación intestinal.....	28
1.4.2. – Fibroblastos y miofibroblastos de la mucosa intestinal.....	30
1.4.2.1. – Papel de los miofibroblastos en la respuesta inflamatoria.....	31
1.4.2.2. – Reparación de la mucosa intestinal (<i>wound healing</i>): papel de los miofibroblastos.	33
1.4.2.2.1. – Migración y proliferación de los ISEMFs.	33
1.4.2.2.2. – Síntesis de los componentes de la matriz extracelular.	35
1.4.3. – Papel de la microbiota en las enfermedades inflamatorias intestinales.....	36
1.4.3.1. – Microbiota residente: principales grupos y posibles efectos moduladores en la inflamación del intestino.	37
1.4.3.2. – El papel de microorganismos productores de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en la inflamación intestinal.....	38
1.4.3.3. – Microorganismos patógenos e inflamación intestinal.	39
1.4.3.4. – <i>Quorum sensing</i> y su posible papel en la prevención de la inflamación intestinal.	41
1.5. – Papel de la dieta en las enfermedades crónicas inflamatorias.....	43
1.5.1. – Compuestos fenólicos de la dieta y salud.....	44
1.5.2. – Clasificación general de los compuestos fenólicos.	46
1.5.3. – Metabolismo y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos.	48
1.5.3.1.– Mecanismos generales de conjugación. Glucuronidación.....	49
1.5.4. – Compuestos fenólicos como moléculas con propiedades anti-inflamatorias.	51

1.5.5. – Compuestos fenólicos como moléculas con propiedades anti-microbianas y anti-QS.....	53
1.6. – Compuestos fenólicos abundantes en cítricos: flavanonas.....	55
1.6.1. – Principales flavanonas, estructura y presencia en cítricos.....	56
1.6.2. – Biodisponibilidad y metabolismo de las flavanonas.	57
1.6.3. – Las flavanonas como compuestos anti-inflamatorios.....	59
1.7. – Compuestos fenólicos abundantes en la granada: elagitaninos.....	61
1.7.1. – Los elagitaninos y el ácido elágico: estructuras y presencia en la granada y otros alimentos.....	62
1.7.2. – Biodisponibilidad y metabolismo de elagitaninos y ácido elágico...	64
1.7.3. – Actividad anti-inflamatoria de los ETs, EA y sus derivados metabólicos.	69
2. - Capítulo 2: Objetivos.....	77
3. - Capítulo 3: Materiales y Métodos	85
3.1. – Materiales.	85
3.1.1. – Extractos naturales y patrones comerciales.....	85
3.1.2. – Otros reactivos generales.....	86
3.2. – Cultivos celulares.	87
3.2.1. – Cultivos celulares eucariotas.	87
3.2.1.1. – Miofibroblastos de colon humano. Línea CCD18-Co.....	87
3.2.1.1.1. – Mantenimiento de la línea CCD18-Co.	88
3.2.1.1.2. – Subcultivo de la línea CCD18-Co.	88
3.2.1.2. – Células endoteliales de aorta humana (HAEC).	89

3.2.1.2.1.	– Mantenimiento de la línea de células HAECs.....	89
3.2.1.2.2.	– Subcultivo de la línea HAECs.	90
3.2.1.3.	– Células monocíticas de leucemia humana (THP-1).	90
3.2.1.3.1.	– Mantenimiento y subcultivo de la línea THP-1.....	91
3.2.1.3.2.	– Tinción de monocitos THP-1 con calceína.....	91
3.2.1.3.3.	– Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).....	92
3.2.2.	– Ensayos de proliferación y viabilidad celular.	92
3.2.2.1.	– Recuento de células vivas con azul tripán. Microscopía óptica.....	92
3.2.2.2.	– Ensayo de MTT.	93
3.2.3.	– Ensayo de migración celular (reparación de tejidos / <i>wound healing</i>).	93
3.2.4.	– Ensayo de adhesión de monocitos.	96
3.2.5.	– Cultivos celulares procariotas.....	97
3.2.5.1.	– Mantenimiento de los microorganismos.....	98
3.2.5.2.	– Análisis del crecimiento microbiano.	98
3.2.5.3.	– Ensayo de inhibición del crecimiento microbiano.	99
3.2.5.4.	– Subcultivo de los microorganismos.....	99
3.2.5.5.	– Ensayo de violaceína.	99
3.2.5.6.	– Formación de biopelículas.....	100
3.2.5.7.	– Motilidad bacteriana: Tipo natación (<i>swimming</i>) y tipo enjambre (<i>swarming</i>).	101
3.2.5.8.	– Análisis de las AHLs producidas por <i>Y. enterocolítica</i> . Efectos inhibitorios de los compuestos fenólicos.	101

3.3. – Modelos animales.....	102
3.3.1. – Mantenimiento de los animales de laboratorio.....	102
3.4. – Estudios moleculares.....	103
3.4.1. – Expresión génica.	103
3.4.1.1.– Extracción y purificación de ARN en cultivos celulares y mucosa de colon de rata.	
3.4.1.2.– Extracción y purificación de ARN en microorganismos.....	103
3.4.1.3.– Cuantificación y evaluación de la calidad del ARN.....	104
3.4.1.4.– Cuantificación de la pureza del ARNm por geles de agarosa. .	105
3.4.2. – Microarrays (Affymetrix).....	105
3.4.3. – Expresión génica. RT-PCR a tiempo real.....	106
3.4.3.1.– Equipo para RT-PCR a tiempo real.....	106
3.4.3.1.1. – Análisis de los resultados por el método de la curva estándar.....	108
3.4.3.1.2. – Análisis de los resultados por el método del Ct. Cuantificación Relativa.	109
3.4.4. – Identificación y cuantificación de proteínas.....	110
3.4.4.1.– Cuantificación de proteína.....	110
3.4.4.2.– Extracción de proteína.....	110
3.4.4.3.– Electroforesis en gel de electroforesis de poliacrilamida (PAGE) y Western Blot.	111
3.4.4.4.– Antibody array.....	112
3.4.4.5.– Ensayo de ELISA.	116
3.5. – Análisis por cromatografía.....	117

3.5.1. – GC-MS/MS. Determinación de SCFAs en muestras de heces de rata.	117
3.5.2. – HPLC-DAD-UV-Vis.	118
3.5.3. – HPLC-DAD-MS/MS.	119
3.5.3.1.– HPLC-DAD-MS/MS (1100 series).	120
3.5.3.2.– HPLC-DAD-MS/MS (1200 series).	121
3.5.3.3.– UPLC-QqQ-MS/MS.	122
4. - Capítulo 4: Los metabolitos derivados de elagitaninos, urolitina-A glucurónico y su aglicona urolitina-A, reducen los procesos inflamatorios inducidos por TNF- α en células endoteliales de aorta humana y modulan algunos de los marcadores moleculares asociados.	127
4.1. – Resumen	127
4.2. – Introducción.....	128
4.3. – Materiales y Métodos	131
4.4. – Resultados	138
4.5. – Discusión.....	144
4.6. – Anexos.....	155
5. - Capítulo 5: El ácido elágico y los metabolitos intestinales derivados de elagitaninos, urolitinas, atenúan la inflamación inducida por las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 β y TNF- α , en miofibroblastos de colon humano y modulan marcadores moleculares asociados.	161
5.1. – Resumen	161
5.2. – Introducción.....	162

5.3. – Materiales y Métodos	164
5.4. – Resultados	169
5.5. – Discusión.....	183
5.6. – Anexos.....	189
6. - Capítulo 6: Estudio de un extracto rico en flavanonas como represor de la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y como regulador de genes relacionados con inflamación, reparación de tejidos y fibrosis en miofibroblastos de colon humanos.....	201
6.1. – Resumen	201
6.2. – Introducción.....	202
6.3. – Materiales y Métodos	204
6.4. – Resultados	212
6.5. – Discusión.....	225
7. - Capítulo 7: Urolitinas, principales metabolitos microbianos derivados de elagitaninos, como posibles inhibidores de la actividad <i>Quorum sensing</i> (QS) del patógeno intestinal ógeno intestinal <i>Yersinia enterocolítica</i> : efectos fenotípicos y moleculares.....	235
7.1. – Resumen	235
7.2. – Introducción.....	236
7.3. – Materiales y Métodos	239
7.4. – Resultados	243
7.5. – Discusión.....	251
7.6. – Anexo	260

8. -	Capítulo 8: Un extracto de narnaja rico en flavanonas glicosiladas inhibe de forma moderada la actividad <i>Quorum sensing</i> (QS) en <i>Yersinia enterocolitica</i> : efectos fenotípicos y moleculares.....	263
8.1. -	Resumen	263
8.2. -	Introducción.....	264
8.3. -	Materiales y Métodos	267
8.4. -	Resultados	271
8.5. -	Discusión.....	281
9. -	Capítulo 9: Estudio del consumo de un extracto de granada en ratas sanas en un modelo de colitis ulcerosa. Efectos de la inflamación en el metabolismo de los compuestos fenólicos y en la producción de ácidos grasos de cadena corta.	291
9.1. -	Resumen	291
9.2. -	Introducción.....	292
9.3. -	Materiales y Métodos	297
9.4. -	Resultados	307
9.5. -	Discusión.....	319
9.6. -	Anexos.....	328
10. -	Capítulo 10: Discusión general y conclusiones.....	355
10.1.	– Principales resultados obtenidos en esta Tesis.....	355
10.2.	– Aspectos críticos en relación con la aplicación de modelos <i>in vitro</i> al estudio de los efectos y mecanismos moleculares de acción de los compuestos fenólicos.	341
10.2.1.	– Representatividad de la realidad <i>in vivo</i> de los ensayos <i>in vitro</i> . ..	343

10.2.2. – Problemática específica de los modelos celulares de inflamación.	344
10.2.3. – Limitaciones de la aplicación de sistemas de análisis múltiple de marcadores (<i>arrays</i>).	346
10.2.4. – Posibles líneas de investigación futuras.	347
10.2.5. – Estudios celulares y moleculares.	347
10.2.6. – Estudios de síntesis y caracterización de metabolitos.	348
10.2.7. – Estudios relacionados con la microbiota.	349
10.2.8. – Estudios relacionados con patógenos intestinales y mecanismos de <i>QS</i>	350
11. - Capítulo 11: Bibliografía.	355

CAPÍTULO 1

Introducción General

1. - Introducción general

1.1. Enfermedades prevalentes en la sociedad occidentalizada asociadas con inflamación.

La **inflamación** (del latín *inflammatio*: encender, hacer fuego) es la forma de manifestarse de muchas enfermedades. Se trata de una respuesta inespecífica a una gran variedad de lesiones tisulares cuya finalidad es la eliminación del agente causante, eliminación del tejido muerto y re-emplazamiento por tejido normal o la cicatrización del mismo (Ramos *et al.*, 2004; Iannitti y Palmieri, 2011). Esta respuesta es similar independientemente de cual sea la causa que la genera: una infección microbiana, una respuesta alérgica, una quemadura, etc. Puede distinguirse entre inflamación aguda e inflamación crónica. La inflamación aguda es un proceso de corta duración, limitado y que se inicia rápidamente frente a estímulos químicos, térmicos o infecciosos (Ramos *et al.*, 2004), y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de células inmunes a la zona inflamada facilitando la acción de las defensas del organismo y la recuperación de la homeostasis. Cuando la inflamación aguda no se resuelve pasa a ser inflamación crónica, de más larga duración, puede generar un exceso de especies reactivas producidas por las células inflamatorias que a su vez pueden terminar provocando un daño irreparable en ácidos nucleicos, proteínas y/o lípidos lo cual genera la alteración de células y tejidos que hace que se produzca más inflamación mediante la producción de moléculas de señalización, expresión de genes y producción de enzimas relacionadas con la inflamación crónica. Estas moléculas inflamatorias producidas por las células inmunes y células inflamadas generan un daño oxidativo que se extiende hacia

tejidos próximos provocando una reacción inflamatoria en cascada. Como consecuencia de estos procesos, la inflamación crónica predispone al organismo a la progresión de enfermedades (Kontogianni *et al.*, 2006; Scivo *et al.*, 2011) que se caracterizan por un proceso de infiltración de células inflamatorias, excesiva producción de moléculas inflamatorias, desregulación de la señalización celular y pérdida de la función protectora (Pan *et al.*, 2010). Numerosos estudios indican que el envejecimiento y las enfermedades asociadas están relacionados con la desregulación del funcionamiento del sistema inmune y de la respuesta inflamatoria (Iannitti y Palmieri, 2011). Entre las patologías crónicas más frecuentes asociadas al envejecimiento y a la desregulación del proceso inflamatorio normal se incluyen la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes, enfermedades neurológicas como el Alzheimer (Pan *et al.*, 2010; Santangelo *et al.*, 2007) y las enfermedades inflamatorias del tracto intestinal que pueden, en última instancia, desembocar en la aparición de cáncer (Ardizzone *et al.*, 2005).

a) La aterosclerosis es un proceso caracterizado por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias generando placas de ateroma (Libby *et al.*, 2011). Se trata de una forma común de arterioesclerosis (palabra que viene del griego *arterio*, que significa “arteria” y *sclerosis* que significa “cicatriz, rigidez”) que se caracteriza por el endurecimiento de las arterias (Zieman *et al.*, 2005). La aterosclerosis y patologías asociadas están entre las enfermedades cardiovasculares (ECVs) más prevalentes en la actualidad y una de las primeras causas de muerte tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Haraoui *et al.*, 2012; Gaziano *et al.*, 2010). En la actualidad, las ECVs suponen aproximadamente un 30% de las muertes

aunque las tasas varían entre países desarrollados y países en vías de desarrollo (Gaziano *et al.*, 2010). Según el Instituto Nacional de Estadística, en 2008 las ECVs fueron la primera causa de muerte en España con un 31,8% del total de las defunciones. Se ha calculado que en el año 2020 la aterosclerosis será la primera causa de mortalidad en todo el mundo.

b) Las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, Parkinson y otras patologías del sistema nervioso se asocian también con daño inflamatorio (Pan *et al.*, 2010). Estas enfermedades están aumentando su prevalencia con el aumento de la longevidad de las poblaciones. (Xie *et al.*, 2011).

c) La obesidad es el resultado de una excesiva acumulación de grasa en el tejido adiposo y se relaciona con muchos desórdenes metabólicos. Estudios recientes sugieren que la obesidad se asocia con una inflamación crónica de bajo grado (Pan *et al.*, 2010). Esta enfermedad ha incrementado también su prevalencia, tanto en Europa como en el resto del mundo y se estima que en el futuro va a seguir aumentando (von Ruesten *et al.*, 2011). En tres décadas -entre 1980 y 2008- la prevalencia de la obesidad se ha duplicado en el mundo y, en la actualidad, más de una de cada 10 personas la padece.

d) Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) constituyen un tipo de patología que se genera por la inflamación crónica continuada del intestino (Pan *et al.*, 2010). Las formas más comunes son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). La preocupación por ambas enfermedades ha aumentado ya que afecta a individuos jóvenes a

los que deteriora gravemente su calidad de vida (Shivananda *et al.*, 1996; Nerich *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2008). En general, se estima una prevalencia entre 120-200/100.000 personas (Cosnes *et al.*, 2011). En los países en vías de desarrollo está aumentando el número de casos/año de la enfermedad, lo que también se observa en los últimos estudios realizados en España (López-Serrano, 2009). Tanto la CU como la EC se relacionan con el desarrollo del cáncer colorrectal (CCR). Diversos mecanismos moleculares implicados en los procesos inflamatorios como la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, incremento de metabolitos del ácido araquidónico (AA), de citoquinas y factores de crecimiento o disfunción del sistema inmune se asocian a la progresión del CCR.

1.2. – Bases generales del proceso inflamatorio.

La inflamación es un mecanismo biológico de protección del organismo que favorece la eliminación de estímulos peligrosos, como patógenos, toxinas, células dañadas, u otros irritantes (Gossiau *et al.*, 2011) al igual que inicia procesos de reparación de tejidos dañados. Es una respuesta muy compleja que implica a distintos tipos celulares (neutrófilos, linfocitos, monocitos, fibroblastos) junto con una cascada de mediadores moleculares, como ROS y RNS, y citoquinas pro-inflamatorias, los cuales están muy regulados por el organismo (Pan *et al.*, 2010).

1.2.1. – Sistemas celulares involucrados en el proceso inflamatorio.

Los tejidos principales involucrados en la reacción inflamatoria son:

1.- La sangre: que aporta células que participan en la respuesta inflamatoria (células del sistema inmune), así como el plasma que aporta numerosas proteínas y moléculas activadoras y/o reguladoras del proceso (Frangogiannis *et al.*, 2002).

2.- El endotelio vascular: que libera moléculas que regulan la respuesta inmune y que expresa en su superficie proteínas de adhesión para el reclutamiento de células al intersticio celular (Liu *et al.*, 2004).

3.- Las células del tejido conectivo: células musculares lisas (CML) (Enzerink y Vaheri, 2011; Libby *et al.*, 2011) fibroblastos (Enzerink y Vaheri, 2011; Chakravorty y Kumar, 1999) y macrófagos (Devalary *et al.*, 2011).

1.2.1.1.– Las células del sistema inmune.

El sistema inmune es un complejo grupo de células relacionadas entre si que integran funciones esenciales para la salud (Middelton *et al.*, 2000). Los componentes celulares principales del sistema inmune son: 1) fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos), 2) granulocitos, 3) plaquetas y 4) células linfoides (linfocitos T y B). Las células del sistema inmune actúan de una manera coordinada con la finalidad de eliminar el estímulo o agente que causa la inflamación y recuperar la homeostasis en el tejido.

- a) Monocitos. Los monocitos son fagocitos mononucleares que contienen un núcleo grande en forma de riñón (Gartner y Hiatt, 1997). Estas células se encuentran en el bazo o permanecen en circulación unos cuantos días para acabar migrando por el endotelio hacia el tejido conectivo de los tejidos. Durante el proceso inflamatorio, los monocitos se dirigen a la zona inflamada, gracias a la liberación de citoquinas, interaccionan con las células endoteliales por unión a moléculas de adhesión, y se introducen en

el tejido diferenciándose a macrófagos (Devalary *et al.*, **2011**) debido a la presencia de factores de crecimiento, citoquinas pro-inflamatorias y/o productos microbianos (Shi y Pamer, **2011**). Los monocitos están implicados, además de en la inflamación, en otros procesos como la angiogénesis y la remodelación de los tejidos dañados (Hristov y Weber, **2011**).

- b) Macrófagos. Los macrófagos mononucleares proceden de los monocitos y son las células dominantes en la inflamación crónica, ya que tienen un tiempo de vida que va desde meses hasta años. Una vez los monocitos salen de los capilares sanguíneos y se localizan en los tejidos se transforman en macrófagos. Los macrófagos juegan un papel central en los procesos ateroscleróticos donde forman las células espumosas (Galkina y Ley, **2009**).
- c) Granulocitos. Dentro de este grupo de células inmunes se incluyen los neutrófilos, eosinófilos y los basófilos. Los neutrófilos son los más abundantes e intervienen en la respuesta inflamatoria secretando citoquinas y fagocitando los agentes infecciosos que producen la inflamación. Eosinófilos y basófilos son células menos abundantes e intervienen en la respuesta inflamatoria generada por parásitos y/o en procesos alérgicos (Gartner y Hiatt, **1997**).
- d) Plaquetas. Las plaquetas tienen un papel muy importante en el proceso hemostático y en la formación de trombos. Las plaquetas regulan la respuesta inmune en el proceso inflamatorio mediante la secreción de mediadores inflamatorios que modulan la migración de leucocitos hacia el tejido inflamado (Galkina y Ley, **2009**).

- e) Linfocitos. El papel de los linfocitos es de gran importancia en el proceso inflamatorio. La desregulación entre los distintos tipos de linfocitos se relaciona con la aparición de EIIs (Hansen *et al.*, 2010). En relación a la aterosclerosis, se sugiere que la respuesta de los linfocitos afecta a esta patología, no solo en la producción de citoquinas pro-inflamatorias sino también en la regulación de la función de los linfocitos B y producción de anticuerpos (Galkina y Ley, 2009).

1.2.1.2. – El endotelio vascular.

El endotelio vascular está constituido por una monocapa de células endoteliales que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y separa la sangre de los tejidos. Las células endoteliales se encargan del mantenimiento de la homeostasis de los vasos (Esper *et al.*, 2006), liberan moléculas que regulan la respuesta inmune y expresan en su superficie moléculas de adhesión para el reclutamiento de células al intersticio celular (Liu *et al.*, 2004). Además, las células endoteliales responden a las citoquinas producidas por varias células inmunes y por células vasculares, mediando en la respuesta inflamatoria (Sprague y Khalil, 2009). La respuesta de la célula endotelial a las diferentes alteraciones del entorno requiere de un alto grado de control y regulación para evitar que la respuesta fisiológica de estas células se convierta en patológica. El proceso por el cual las células endoteliales pierden la capacidad de mantener la homeostasis conduciendo al desarrollo de procesos inflamatorios patológicos y enfermedades vasculares se conoce como “**disfunción endotelial**” o “**activación endotelial**” (Esper *et al.*, 2006).

1.2.1.3.– Las células musculares lisas.

Las CML se encuentran localizadas en la túnica media de las arterias, embebidas en una compleja matriz extracelular (MEC) rica en fibras de elastina (Libby *et al.*, 2011). Estas células están altamente especializadas y regulan la contracción, el diámetro del tono vascular, la presión sanguínea y la distribución del flujo sanguíneo. Además, intervienen en los procesos de regeneración de la MEC sintetizando proteínas y proteasas y en la respuesta inflamatoria mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias y expresando marcadores inflamatorios (Owens *et al.*, 2004).

1.2.1.4. – Fibroblastos.

Los fibroblastos son un grupo de células de origen y naturaleza heterogéneo, que morfológicamente se caracterizan por ser células adherentes, planas y fusiformes. Los fibroblastos del cuerpo humano se dividen en subgrupos de células, cada uno de los cuales presenta funciones y perfil de expresión de proteínas diferentes, de manera que los distintos tipos de fibroblastos varían entre órganos y regiones anatómicas. Los fibroblastos tienen un importante papel en el mantenimiento del tejido conectivo y en la iniciación y modulación de la respuesta inflamatoria. En los tejidos inflamados, los fibroblastos secretan quimioquinas y citoquinas, regulan la infiltración de leucocitos y forman una barrera inflamatoria que alerta a las células y tejidos vecinos de estímulos peligrosos (Enzerink y Vaheri, 2011).

El proceso inflamatorio se inicia y regula gracias a la expresión y regulación de una red compleja de moléculas que permiten la comunicación entre las células

linfocitarias y las otras células implicadas en el proceso (tejido endotelial, fibroblástico, etc) (Gosslau *et al.*, 2011).

1.2.2. – Mediadores moleculares de la inflamación.

La inflamación está bajo el control de sistemas enzimáticos plasmáticos y de moléculas mediadoras (producidas y liberadas por las células) que participan en el proceso inflamatorio.

1.2.2.1. – Los sistemas enzimáticos plasmáticos.

Una gran variedad de fenómenos en la respuesta inflamatoria están mediados por proteínas plasmáticas que pertenecen a varios sistemas interrelacionados entre si: el sistema de coagulación (que incluye los factores de coagulación como el fibrinógeno y la protrombina), el sistema de las quininas (principalmente bradiquinina) y el sistema del complemento (en particular, C3a, C5a y en menor medida C4a, denominadas *anafilotoxinas*) (Moreau *et al.*, 2005). Estas moléculas tienen un papel mediador en la inflamación induciendo vasodilatación, quimiotaxis, aumentando la permeabilidad vascular, activando receptores y moléculas involucradas en la inflamación, dolor, etc. Por ejemplo, la bradiquinina aumenta la luz vascular para aumentar el aporte sanguíneo y contrae el músculo liso para evitar la difusión de los agentes pro-inflamatorios (Moreau *et al.*, 2005).

El inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) es una molécula que pertenece a la familia de los inhibidores de las serín proteasas (Czekay *et al.*, 2011). Interviene en procesos de coagulación/fibrinólisis (evitando la acumulación de coágulos de fibrina), en inflamación y en la reparación de tejidos (*wound healing*). Está producida principalmente por células endoteliales, CML, fibroblastos y

monocitos/macrófagos. PAI-1 muestra un papel destacado en los procesos inflamatorios observándose niveles elevados de esta molécula en pacientes con aterosclerosis o septicemia (Kruithof, 2008). Además, es un potente regulador de la migración celular y la angiogénesis (Stefansson *et al.*, 2003; Czekay *et al.*, 2011) e interviene en diversos procesos inmunes (Poggi *et al.*, 2007).

1.2.2.2. – Otras moléculas mediadoras.

1.2.2.2.1. – Mediadores de acción rápida: histamina y serotonina

La histamina y la serotonina son dos importantes aminas vasoactivas que ejercen su actividad sobre los vasos sanguíneos. La histamina se comporta como un potente vasodilatador sistémico en tejidos animales, interviniendo en procesos alérgicos e inflamatorios (Cianchi *et al.*, 2005). La serotonina, por su parte, es una sustancia que interviene en la regulación del sistema inmune (Pelletier y Siegel, 2009) y que muestra un comportamiento parecido al de la histamina.

1.2.2.2.2. – Prostaglandinas y leucotrienos.

Los eicosanoides son unas sustancias que provienen del AA, que es un ácido graso que se produce por acción de la fosfolipasa A₂ a partir de los fosfolípidos (Gosslau *et al.*, 2011). Los eicosanoides se dividen en: prostaglandinas, tromboxanos (TBX) y leucotrienos (LT). Las prostaglandinas y los TBX son un tipo de eicosanoides en cuya síntesis están implicadas las ciclooxigenasas (COXs) (Gosslau *et al.*, 2011; St-Onge *et al.*, 2007), mientras que los LT, por su parte, se generan por acción de la 5-lipooxigenasa (LOX). Las prostaglandinas son mediadores de gran importancia en la regulación de procesos inflamatorios e inmunes (Powel *et al.*, 1999b). En particular, la prostaglandina E₂ (PGE₂) es un mediador clave en los

procesos de inflamación crónica, como las EIIs (Rieder *et al.*, 2010) o la inflamación vascular (Zhang y Daaka, 2011), regulando la respuesta de células del sistema inmune, modulando la producción de quimioquinas (Kalinski *et al.*, 2012) o controlando el comportamiento de distintos tipos celulares durante los procesos inflamatorios (Rieder *et al.*, 2010; Zhang y Daaka, 2011).

1.2.2.2.3. – Citoquinas.

Las citoquinas son un grupo de pequeñas moléculas, a menudo glicosiladas, sintetizadas por las células inmunitarias, endoteliales y fibroblásticas. Controlan numerosos procesos: la respuesta inflamatoria local y sistémica, la reparación tisular, la defensa frente a la infección y la proliferación de los linfocitos T y B. Las citoquinas se pueden clasificar como pro-inflamatorias y anti-inflamatorias y engloban a varias subfamilias, entre las que se incluyen las interleuquinas (ILs), interferones (IFNs), factores de necrosis tumoral (TNFs), factores de crecimiento, factores estimulantes de colonia y quimioquinas (McGeer y McGeer, 2002; Sprague y Khalil, 2009).

1.2.2.2.3.1. – Citoquinas pro-inflamatorias.

Las citoquinas pro-inflamatorias son aquellas que están implicadas en la activación y mantenimiento de los procesos inflamatorios, siendo los macrófagos la principal fuente. Estas citoquinas pueden actuar: aumentando la reacción inflamatoria, estimulando la secreción de otras citoquinas pro-inflamatorias, favoreciendo la secreción de quimioquinas (Sprague y Khalil, 2009) y/o aumentando la expresión de moléculas de adhesión (Koga *et al.*, 2002). Las citoquinas pro-inflamatorias más importantes son la IL-1 y el TNF- α (Loppnow *et al.*, 2011). La IL-

1 es una citoquina multifuncional que presenta dos isoformas, IL-1 α e IL-1 β , las cuales tienen funciones biológicas indistinguibles (Bujak y Frangogiannis, 2009). Por su parte, el TNF- α es una citoquina multifactorial (Cheng *et al.*, 2011; Loppnow *et al.*, 2011), producida principalmente por macrófagos y monocitos (Yoshida *et al.*, 1997; Bradley, 2008; Apostolaki *et al.*, 2011) y en menor medida por linfocitos, neutrófilos, células endoteliales o fibroblastos (Bradley, 2008).

Otras citoquinas pro-inflamatorias importantes son la IL-6 que induce fiebre y estimula los linfocitos T (aunque puede comportarse como anti-inflamatoria disminuyendo la expresión de IL-1 β y TNF- α) (Gossiau *et al.*, 2011), y la IL-8 y la quimioquina ligando 2 (CCL-2; MCP-1) que también intervienen en el proceso inflamatorio. IL-8 está implicada en la quimiotaxis, atrayendo a los leucocitos hacia los tejidos inflamados (Szekanecz *et al.*, 1994). CCL-2, por otro lado, regula la migración e infiltración de monocitos y macrófagos (Deshmane *et al.*, 2009). Otras moléculas importantes en la regulación de la inflamación son la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), y la proteína de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) que están implicadas en la trans migración de los leucocitos a los tejidos inflamados (Liu *et al.*, 2004). Otras citoquinas como IL-12, IL-15, IL-18 o el IFN- γ son importantes mediadores en el proceso inflamatorio, regulando la actividad de las células del sistema inmune, disminuyendo o estimulando la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, induciendo fiebre, etc (Gossiau *et al.*, 2011).

En la **Figura 1.1** se muestra un esquema representativo de algunas de las principales células implicadas en la respuesta inflamatoria así como de algunas de las moléculas producidas por dichas células y que intervienen en el proceso.

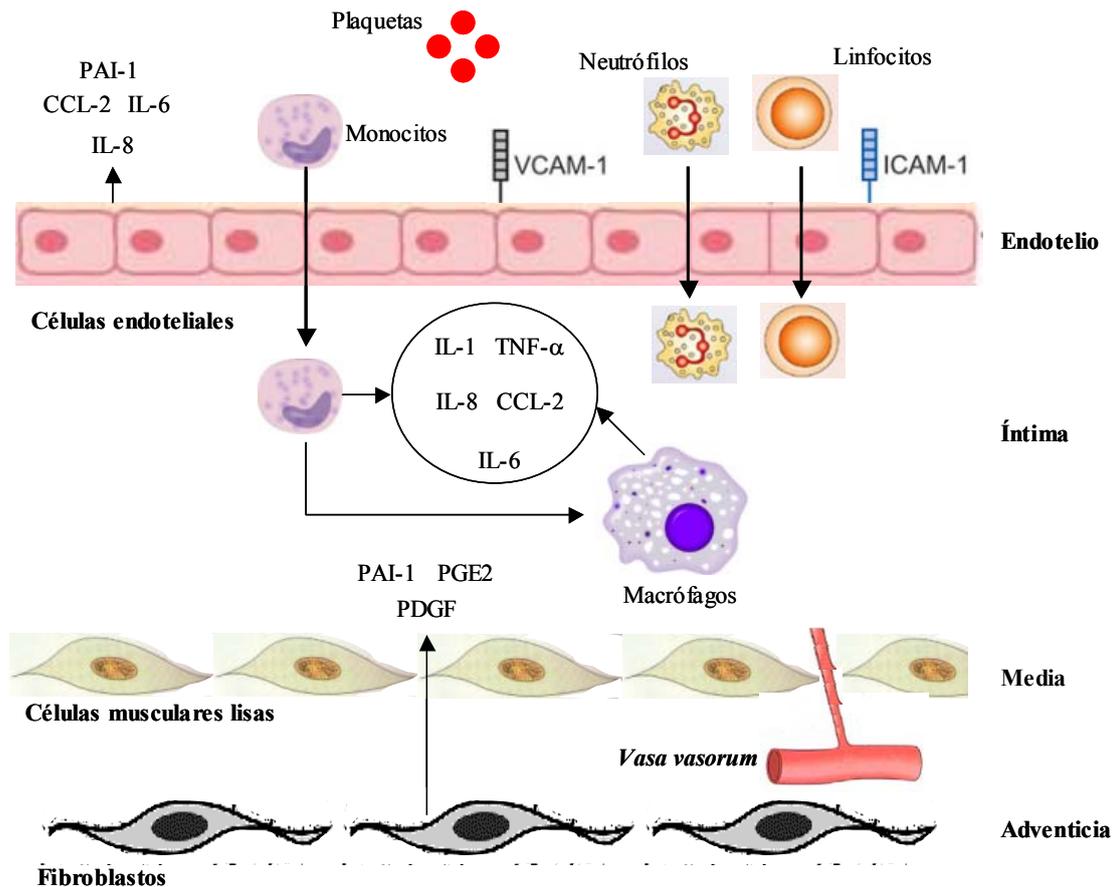


Figura 1.1. Representación de algunos de los grupos celulares y principales moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria. Abreviaturas: Factor de crecimiento plaquetario (PDGF).

Muchas de estas moléculas mediadoras de la respuesta inflamatoria convergen en la regulación de la actividad del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 1.2.). La activación e introducción en el núcleo celular de este factor de transcripción es un proceso clave en la regulación de la transcripción de genes relacionados con la inflamación (Kofler *et al.*, 2005) entre los que se incluyen a su vez las quimioquinas, citoquinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión y factores de crecimiento (Bujak y Frangogiannis, 2009; Gossiau *et al.*, 2011). A través de la modulación de la expresión génica, el NF- κ B regula a su vez procesos celulares básicos como la apoptosis celular, la activación celular, y la producción de diversos mediadores inflamatorios. Además de NF- κ B, la proteína activadora 1 (AP-1) (otro

importante factor de transcripción de genes relacionados con inflamación) y la proteína CREB (*cAMP responsive element binding protein*), que es el principal co-activador de ambos, juegan un papel esencial en la regulación del proceso inflamatorio (Gossiau *et al.*, 2011).

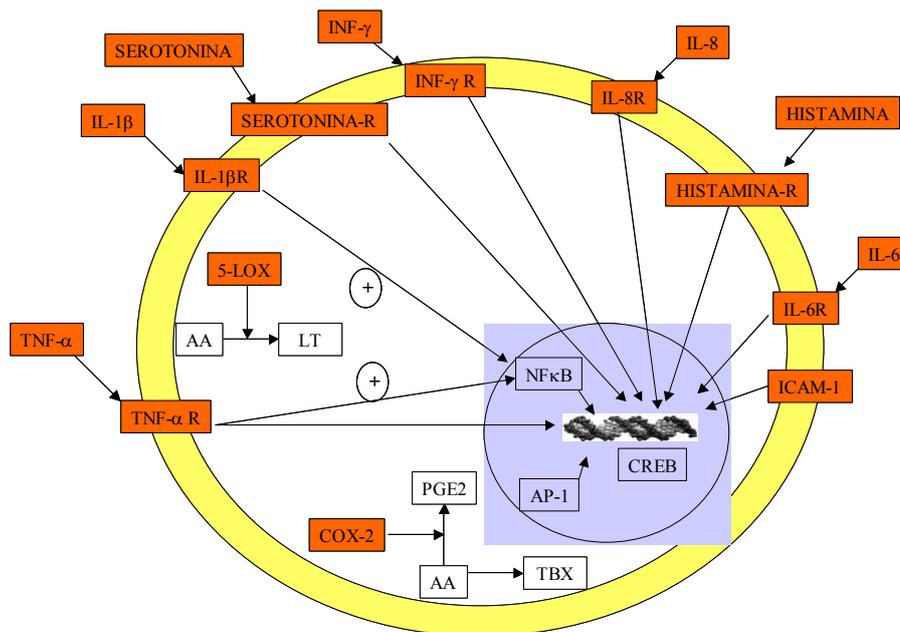


Figura 1.2. Red de mediadores moleculares asociados con el proceso de inflamación. Efectores y receptores inflamatorios (naranja); factor de transcripción y cofactor (gris claro); otros mediadores (blanco) (modificada de Gossiau *et al.*, 2011).

1.2.2.2.3.2. – Citoquinas anti-inflamatorias.

Las citoquinas anti-inflamatorias están implicadas en una disminución de la respuesta inflamatoria. Entre estas citoquinas se incluyen la IL-4, IL-10, IL-13, IFN- α y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Sin embargo, es difícil establecer una clasificación clara entre citoquinas pro- o anti-inflamatorias, ya que la respuesta inflamatoria está determinada no solo por el balance entre ambas, sino también por la sincronización en la liberación, las condiciones en las que se liberan, presencia de factores sinérgicos o competitivos, densidad de receptores y respuesta del tejido a cada citoquina (Sprague y Khalil, 2009).

1.3. – Aterosclerosis.

La aterosclerosis es la base etiológica de diversas ECVs (Padró *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2010). Las ECVs más comunes relacionadas con inflamación crónica y aterosclerosis son: cardiopatías isquémicas e infartos, accidentes vasculocerebrales (ictus o trombosis cerebral) y enfermedad coronaria. Tradicionalmente, se han considerado como factores de riesgo de las ECVs: el sexo (Villablanca *et al.*, 2010), la edad, la hipertensión, la hipercolesterolemia, la dislipidemia (Pan *et al.*, 2010), la diabetes, la obesidad, el tabaquismo, el sedentarismo (Haraoui *et al.*, 2012) y una dieta rica en grasas, sal y carbohidratos (Das y Chakrabarti, 2006). Numerosos estudios han demostrado que la inflamación vascular es una etapa temprana del desarrollo de la aterosclerosis (Pan *et al.*, 2010). La prevención de las etapas iniciales de los procesos ateroscleróticos y, en general, el tratamiento de la inflamación sistémica ha despertado un gran interés como terapia para disminuir el riesgo cardiovascular (Haraoui *et al.*, 2012).

1.3.1. – Arterias: componentes celulares y moleculares principales involucrados en la inflamación vascular.

Las **arterias** llevan la sangre oxigenada (exceptuando las arterias pulmonares) desde el corazón a las demás partes del cuerpo. Constan de tres capas concéntricas (Gartner y Hiatt, 1997) (**Figura 1.3**): **interna** o **íntima**, constituida por el endotelio (un epitelio simple plano), una lámina basal y una capa conjuntiva subendotelial; **media**: compuesta por CML concéntricas, fibras elásticas y fibras de colágeno; y **externa** o **adventicia**: formada por tejido conjuntivo laxo, compuesto fundamentalmente por fibroblastos y colágeno. En arterias de diámetro superior a 1 mm, la nutrición de estas túnicas y el aporte de oxígeno corre a cargo de una red de

microvasos denominados *vasa vasorum* que se originan en la capa adventicia de las arterias (Zagorchev y Mulligan-Kehoe, 2011). Se han identificado 3 tipos de *vasa vasorum*: internos, externos y venosos. El grado y la distribución de la vascularización de los vasos por los *vasa vasorum*, depende del grosor de la pared de los vasos (Langheinrich *et al.*, 2007).

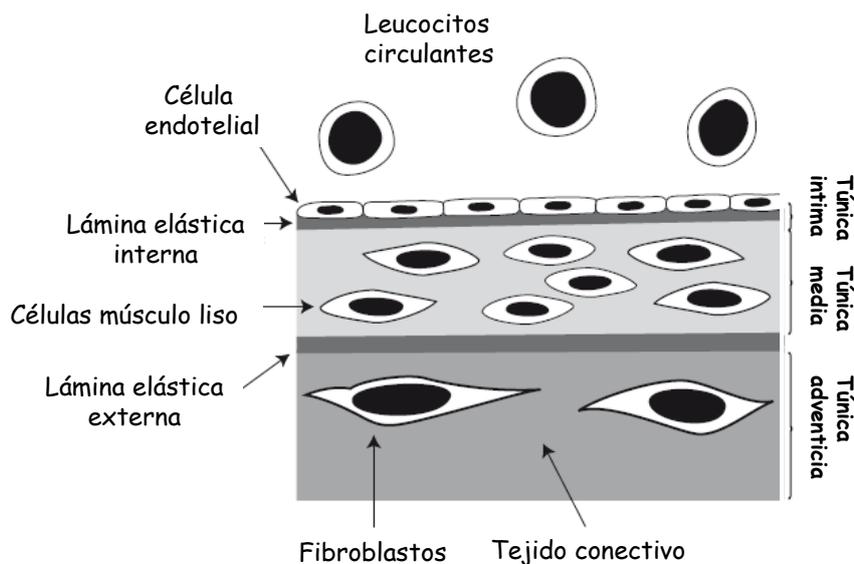


Figura 1.3. Esquema de la pared arterial. Se distingue la túnica íntima en la que encontramos las células endoteliales, la túnica media en la que se localizan las CML y la túnica adventicia compuesta por tejido conectivo y fibroblastos (modificado de Enzerink y Vaheri, 2011).

El endotelio vascular es un órgano multifactorial, capaz de percibir estímulos (tanto sistémicos como locales) y modificar su estado funcional para contribuir a mantener la homeostasis de la pared vascular (Badimón *et al.*, 2009). En condiciones fisiológicas, el endotelio presenta una superficie a través de la cual se produce el intercambio de numerosas moléculas entre la sangre y los tejidos y se controla el tono vascular, el tránsito de células inflamatorias hacia la pared vascular (Badimón *et al.*, 2009), la respuesta inflamatoria y la deposición de MEC (Onat *et al.*, 2011). La MEC tiene un papel muy importante en los procesos de remodelación del endotelio vascular ya que ejerce una gran influencia sobre el comportamiento celular y la morfogénesis vascular además de interactuar con las células endoteliales mediante

receptores de adhesión específicos, intervenir en los procesos de migración, proliferación o interacciones célula-célula durante la formación de vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes (angiogénesis) (Arroyo e Iruela-Arispe, **2010**). La regeneración de la MEC está regulada principalmente por unas enzimas llamadas metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que se encargan de su degradación. Entre las MMPs que intervienen en el proceso de remodelación de la MEC encontramos la MMP-1, una colagenasa intersticial que degrada colágeno, la MMP-2 (colagenasa-A) que degrada colágeno no fibrilar o la MMP-3 (estromelisina-1) que degrada proteoglicanos, laminina o fibronectina (Andoh *et al.*, **2007**). Otra MMP importante es la MMP-12, la cual es capaz de degradar un amplio rango de componentes de la MEC como la elastina, colágeno tipo IV, laminina, etc. (Pender *et al.*, **2006**). Esta MMP, se ha asociado con una elevada expresión de MMP-3, sugiriendo que MMP-12 juega un papel muy importante en la cascada de activación de las MMPs y por lo tanto favorece la degradación de la MEC (Liang *et al.*, **2006**). Estas enzimas, a su vez, están controladas por unos inhibidores específicos (TIMPs). El balance entre estos dos componentes controla la remodelación de la MEC tanto en condiciones fisiológicas normales como de inflamación (Andoh *et al.*, **2005**). Además, en el mantenimiento de la maquinaria sintética de la MEC, tiene un papel destacado el sistema “activador del plasminógeno tipo tejido/urokinasa; plasmina; MMPs”. En este sistema tiene un papel destacado PAI-1, ya que a elevados niveles previene la actividad proteolítica y contribuye a disminuir la velocidad de degradación del colágeno, favoreciendo la fibrogénesis en los tejidos (Ghosh y Vaughan, **2012**).

Las CML, situadas en la en la túnica media, producen gran parte de los componentes mayoritarios de la MEC, como proteoglicanos (componentes estructurales muy importantes), colágeno y elastina (esenciales en el mantenimiento

de la integridad y elasticidad de la pared vascular), así como un gran número de proteínas que determinan el balance entre síntesis y degradación de la MEC (Badimón *et al.*, 2009). Los fibroblastos, por su parte, son células situadas en la túnica adventicia de los vasos que tienen la función de sintetizar proteínas de la MEC como colágenos y fibronectina. En la actualidad, numerosos estudios revelan que, además de funciones relacionadas con la MEC, los fibroblastos tienen la capacidad de regular e intervenir en la función endotelial (Enzerik y Vaheri, 2011).

1.3.2. – Desarrollo de la aterosclerosis.

La aterosclerosis es una compleja enfermedad crónica de la pared arterial (Badimón *et al.*, 2009; Libby *et al.*, 2011) que presenta una etiología multifactorial y se desencadena por factores tanto sistémicos como locales que inducen un deterioro de la función vascular (Badimón *et al.*, 2009). En la aterosclerosis existe un componente inmunológico, con la acumulación de leucocitos en las lesiones ateroscleróticas (Mestas y Ley, 2008) y un proceso de desarrollo y deposición de estrías de grasa cargadas de colesterol en los vasos sanguíneos asociado con estrés oxidativo e inflamación (Martin K.R., 2010). Este proceso de deposición está relacionado con la hipercolesterolemia plasmática (presencia de niveles elevados de colesterol en sangre) y especialmente con la concentración elevada de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que son un grupo heterogéneo de lipoproteínas en cuyo núcleo contienen triglicéridos y ésteres de colesterol. El aumento del tránsito a través del endotelio vascular de esta lipoproteína, provoca su acumulación en el espacio sub-endotelial (MEC), donde interacciona con componentes de la MEC como proteoglicanos y colágeno (presentan elevada capacidad para interaccionar, retener y agregar lipoproteínas ricas en colesterol) y proteínas favoreciendo su

modificación (agregaciones, glucosilaciones, proteólisis enzimáticas, oxidaciones, etc.), lo que incrementa su aterogenicidad (Badimón *et al.*, 2009) y retención en la íntima vascular.

1.3.2.1. – Adhesión de monocitos a células endoteliales.

Un proceso relevante durante el proceso de las lesiones ateroscleróticas es la adhesión de los monocitos circulantes a las células endoteliales y su posterior infiltración al espacio sub-endotelial. Las LDL, especialmente las formas modificadas, inducen en las células endoteliales, el aumento en la expresión y la secreción de compuestos quimiotácticos solubles como IL-8 y CCL-2 y un aumento en las moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y selectinas como E-selectina, L-selectina o la P-selectina (Martín *et al.*, 2007; Badimón *et al.*, 2009) que quedan expuestas en la superficie de las células endoteliales activadas y favorecen la migración, la adhesión y la transmigración leucocitaria (monocitos y células T) (**Figura 1.4**). El hecho de que las diferentes moléculas de adhesión y moléculas quimiotácticas se expresen de forma casi simultánea en las células endoteliales indica una activación concertada de diferentes genes, a través de un factor de transcripción común, el NF- κ B (Csiszar *et al.*, 2008).

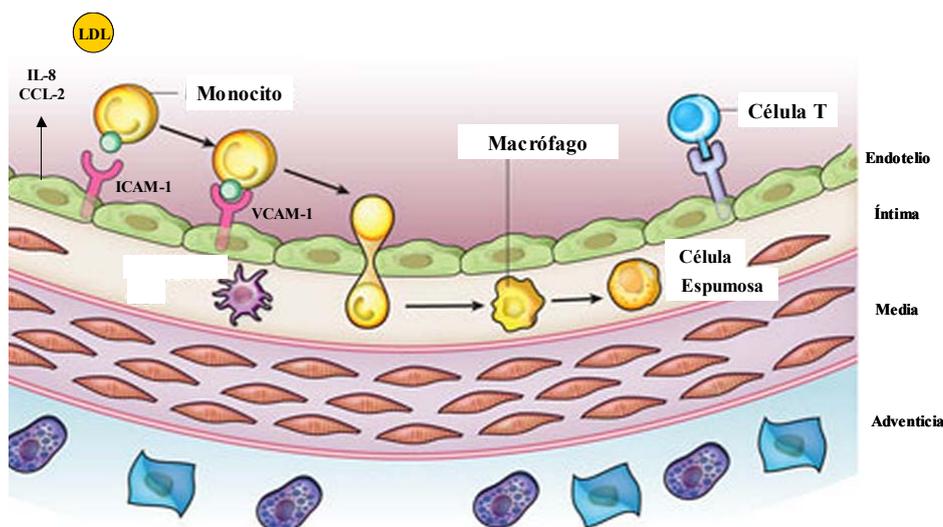


Figura 1.4. Etapas iniciales de la aterosclerosis. Se observa la adhesión de monocitos sanguíneos a las células endoteliales, migración hacia la túnica íntima, maduración de los monocitos a macrófagos y la internalización de lípidos que genera células espumosas (modificada de Libby *et al.*, 2011).

Las citoquinas pro-inflamatorias producidas por las células endoteliales, IL-1 y TNF- α , tienen un papel muy importante en este punto ya que contribuyen al desarrollo de la lesión aterosclerótica, facilitando la propagación de la respuesta inmunitaria atrayendo más leucocitos hacia la lesión y estimulando a los monocitos y macrófagos. Tanto la IL-1 como el TNF- α contribuyen a la inflamación vascular y a la trans migración celular ya que inducen la expresión de moléculas de adhesión (E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1) y la producción de quimioquinas como CCL-2, IL-8 y de otras citoquinas relacionadas con inflamación como la IL-6. Macrófagos y monocitos producen ambas citoquinas lo que contribuye al mantenimiento de la respuesta inflamatoria y a la atracción de nuevas células inmunes a la zona afectada (Padró *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009; Weiming *et al.*, 2008; Liping *et al.*, 2004).

Los monocitos infiltrados en la íntima arterial se diferencian a macrófagos, que internalizan una cantidad elevada de moléculas de colesterol y ésteres de colesterol provenientes de las LDL modificadas. Este proceso de diferenciación e internalización de colesterol está favorecido por la presencia de plaquetas en las

lesiones ateroscleróticas. La internalización de colesterol da lugar a las células espumosas que secretan a su vez citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, MMPs, IFN- δ y ROS que mantienen un estímulo quimiotáctico para leucocitos adheridos al endotelio vascular, aumentan la expresión de receptores, promueven la replicación de macrófagos y regulan la acumulación de las CML en la íntima (**Figura 1.5**). La proliferación de estas células, que liberan mediadores fibrogénicos, genera una densa MEC alrededor de las células espumosas y monocitos que junto con las estrías de grasa permiten el desarrollo de una placa fibrosa (Badimón *et al.*, 2009).

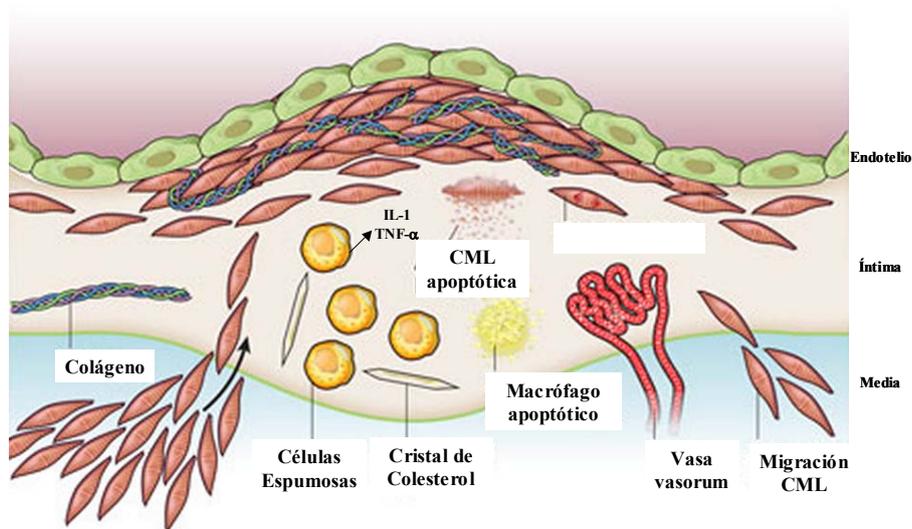


Figura 1.5. La progresión de la lesión aterosclerótica implica la migración de las CML desde la túnica media hacia la íntima. Además, se produce una proliferación, en la túnica íntima, tanto de las CML residentes como de las que han migrado desde la túnica media. Tiene lugar una síntesis de componentes de la MEC como el colágeno. En el interior de la placa se produce muerte celular de los macrófagos y de las CMLs que genera liberación de lípidos al espacio extracelular y se acumulan en la región central de la placa. En lesiones ateroscleróticas avanzadas se puede observar cristales de colesterol y microvasos sanguíneos (modificada de Libby *et al.*, 2011).

La trombosis es la última complicación del proceso aterosclerótico. La rotura de la placa fibrosa permite a los componentes de coagulación sanguíneos entrar en

contacto con el interior de la placa, provocando que el trombo se extienda hacia el interior del lumen dificultando el flujo sanguíneo (Libby *et al.*, 2011).

1.3.2.2.– Angiogénesis y aterosclerosis.

La angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos (neovascularización) a partir de vasos pre-existentes siendo un fenómeno que tiene lugar durante procesos fisiológicos básicos tales como el desarrollo embrionario (Slavin *et al.*, 2009; Dejana, *et al.*, 2009), el crecimiento del organismo, la cicatrización de heridas (Singer y Clark, 1999; Slavin *et al.*, 2009) y en procesos patológicos como la aterosclerosis (Slavin *et al.*, 2009) o el desarrollo de tumores. En los últimos años, se ha investigado el papel de la angiogénesis en el desarrollo de la aterosclerosis (Khurana *et al.*, 2005; Zagorchev y Mulligan-Kehoe, 2011). El proceso de neovascularización es un rasgo común de las lesiones ateroscleróticas humanas (Khurana *et al.*, 2005; Gössl *et al.*, 2009). La neovascularización de los *vasa vasorum* (**Figura 1.5**) (Zagorchev y Mulligan-Kehoe, 2011), favorece la entrada de componentes pro-inflamatorios y pro-ateroscleróticos hacia la pared de los vasos (Gössl *et al.*, 2009). En la actualidad, existen dos teorías sobre el mecanismo por el cual las células inflamatorias entran a los vasos para iniciar la respuesta inflamatoria:

- Teoría “*inside-out*”: la respuesta inmune se inicia en la capa íntima mediante adhesión de las células inmunes al endotelio que se infiltran en el espacio sub-endotelial.
- Teoría “*outside-in*”: es una teoría más reciente que defiende que la respuesta inflamatoria se inicia en la capa adventicia y se dirige hacia la túnica media e íntima.

La teoría “*outside-in*” relaciona la neovascularización de los *vasa vasorum* con el desarrollo de la placa aterosclerótica. Estudios en los que se observó un incremento de la neovascularización de los *vasa vasorum*, un aumento de leucocitos en la capa adventicia (Zargochev y Mulligan-Kehoe, 2011; Galkina y Ley, 2009), la proliferación y diferenciación de los fibroblastos de la adventicia en miofibroblastos (Zargochev y Mulligan-Kehoe, 2011) y/o la expresión de moléculas de adhesión en los *vasa vasorum* (Gössl *et al.*, 2009) apoyan esta teoría.

1.3.2.2.1. – Migración de las células endoteliales.

El endotelio desempeña un papel clave en el proceso de angiogénesis que tiene lugar en las placas ateroscleróticas. En este proceso, se requiere la migración y proliferación de las células del endotelio para generar nuevos vasos en el interior de las lesiones (Martínez-González *et al.*, 2001). La migración endotelial durante la angiogénesis está regulada por: citoquinas, factores de crecimiento, angiopoyetinas (proteínas de secreción con función señalizadora), MEC y el flujo sanguíneo (Lamallice *et al.*, 2007). El proceso angiogénico depende de un balance que se produce entre factores pro-angiogénicos e inhibidores angiogénicos (Yoshida *et al.*, 1997) (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Factores que intervienen en el proceso angiogénico

	Molécula		Referencias
Factores pro-angiogénicos	VEGF	bFGF	Szekanecz <i>et al.</i> , 1994
	EGF	PDGF	Yoshida <i>et al.</i> , 1997
	TGF- α	HGF	Lamalice <i>et al.</i> , 2007
	TGF- β	TNF- α	Barrientos <i>et al.</i> , 2008
	IL-8	IL-1 β	Qazi <i>et al.</i> , 2009
	PAI-1		Arroyo e Iruela-Arispe, 2010 Jagielsa <i>et al.</i> , 2012
Factores anti-angiogénicos	IFN- α	TGF- β	Szekanecz <i>et al.</i> , 1994
	IFN- β	TNF- α	Yoshida <i>et al.</i> , 1997
	IFN- γ	PAI-1	Kuljaca <i>et al.</i> , 2007
			Qazi <i>et al.</i> , 2009 Heidenreich <i>et al.</i> , 2009

Abreviaturas: factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); factor de crecimiento endotelial (EGF); factor de crecimiento plaquetario (PDGF); factor de crecimiento hepático (HGF).

VEGF es un potente agente angiogénico que promueve la proliferación y la migración endotelial (Lamalice *et al.*, 2007; Barrientos *et al.*, 2008) además de aumentar la permeabilidad del endotelio (Arroyo e Iruela-Arispe, 2010). Junto con VEGF, bFGF también promueve la migración de las células endoteliales (Lamalice *et al.*, 2007; Arroyo e Iruela-Arispe, 2010) siendo, junto con las angiopoyetinas, los principales factores que promueven la migración endotelial (Lamalice *et al.*, 2007). En general, se considera que TNF- α es una molécula pro-angiogénica ya que aumenta la producción de VEGF, bFGF e IL-8 (potente factor angiogénico que favorece la migración endotelial) (Yoshida *et al.*, 1997; Szekanecz *et al.*, 1994) y promueve el proceso angiogénico (Arroyo e Iruela-Arispe, 2010). Sin embargo, TNF- α puede actuar como factor angiogénico o anti-angiogénico dependiendo del sistema sobre el que actúe. (Yoshida *et al.*, 1997; Szekanecz *et al.*, 1994). Hay estudios que indican que esta diferencia puede deberse a la concentración de TNF- α utilizada (Fajardo *et al.*, 1992) o al tiempo de exposición (Yoshida *et al.*, 1997). IL-1 β es otra citoquina pro-inflamatoria que regula la angiogénesis de manera directa

favoreciendo la proliferación de las células endoteliales (Jagielsa *et al.*, 2012). Otra molécula clave en la regulación de la angiogénesis es PAI-1. Esta serín proteasa interviene en los procesos de remodelación vascular y, al igual que ocurre con el TNF- α , PAI-1 puede comportarse como un factor pro-angiogénico a concentraciones fisiológicas, mientras que a elevadas concentraciones parece ser anti-angiogénico (Diebold *et al.*, 2008).

1.4. – Enfermedades inflamatorias del intestino.

La EC y la CU son EIIs de alta prevalencia en la sociedad occidentalizada y que han aumentado su frecuencia en los países desarrollados desde la mitad del siglo XX. Hasta 1,4 millones de personas en Estados Unidos y 2,2 en Europa sufren EIIs (Edward *et al.*, 2004; Antón Martínez *et al.*, 2010). En España la tasa de incidencia ha aumentado en los últimos años, y la CU presenta una incidencia estimada de 7,57 por cada 100000 personas/año, mientras que para la EC es de 9,12 por cada 100000 personas/año (López-Serrano *et al.*, 2009). El estilo de vida occidentalizado se asocia con la aparición de EIIs, siendo los principales factores de riesgo el tabaquismo, dietas grasas y altas en consumo de azúcares, uso de medicamentos, estrés, alto *status* socioeconómico e incluso apendectomía (Danese *et al.*, 2011; Ahuja *et al.*, 2008). La etiología de las EIIs no está establecida aunque existen dos teorías que abordan las posibles causas que generan estas enfermedades. La primera habla de una desregulación primaria del sistema inmune de la mucosa del intestino que conduce a una excesiva respuesta inmunológica contra la microbiota mientras que la segunda hace referencia a cambios en la composición de la microbiota del colon y trastornos de la función de la barrera epitelial que provocan respuestas patológicas del sistema inmune de la mucosa normal (Larrosa *et al.*, 2010b; Stecher, *et al.*,

2008). En general se considera que las enfermedades inflamatorias del intestino se producen como consecuencia de varios factores tanto ambientales como agentes infecciosos que contribuyen a desarrollar la enfermedad sobre una base genética (Figura 1.6).

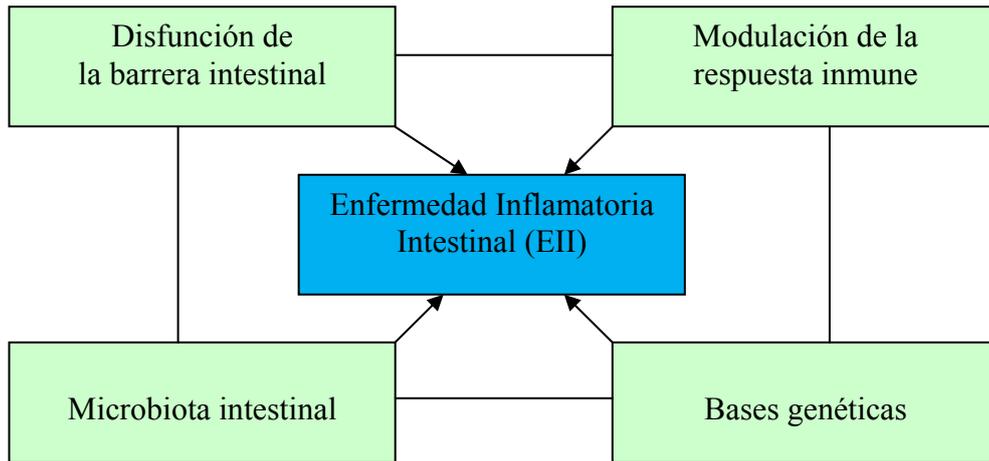


Figura 1.6. Interacción de varios factores que contribuyen a la inflamación crónica intestinal en individuos susceptibles. La susceptibilidad genética se ve influenciada por la microbiota intestinal, la cual proporciona antígenos que estimulan la respuesta inmune patogénica o protectora. Los factores ambientales son necesarios para iniciar la inflamación (imagen adaptada de Sartor, 2006).

1.4.1. – La mucosa intestinal: principales elementos celulares constitutivos y papel en la inflamación intestinal.

La pared del tracto intestinal está compuesta por varias capas (Gartner y Hiatt, 1997) (Figura 1.7):

- Mucosa: dividida a su vez en
 - o Epitelio: monocapa más externa de células epiteliales especializadas en absorción y secreción recubierta de *mucus* que separa al hospedador del ambiente externo, evitando los peligros asociados a la intrusión de antígenos tales como bacterias patógenas, virus o microorganismos comensales oportunistas (Goto *et al.*, 2012)

- la capa subyacente y separada por una membrana basal de colágeno es la **lámina propia** formada principalmente por conectivo laxo
 - muscular de la mucosa (*muscularis mucosae*) de tejido muscular liso
- la capa mas interna o submucosa
 - capa muscular
 - capa adventicia de tejido conectivo

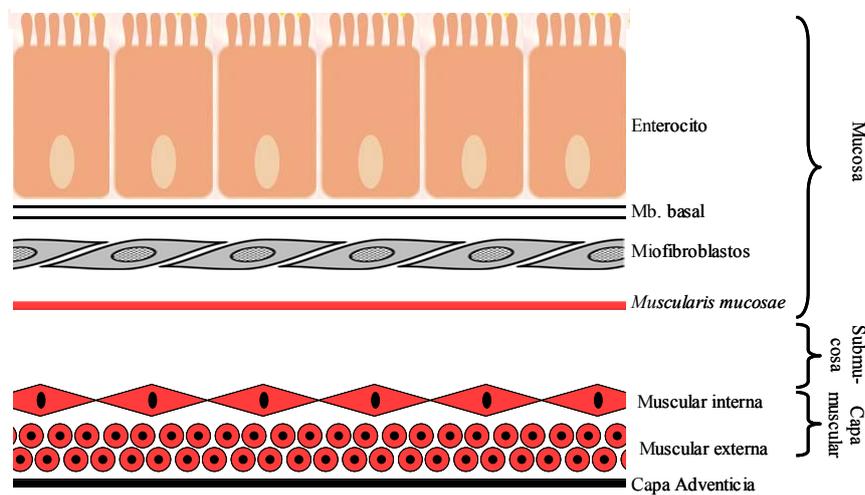


Figura 1.7. Histología general de la pared intestinal. Se divide en capa mucosa, compuesta por enterocitos que descansan sobre la membrana basal, miofibroblastos y una muscular de la mucosa; capa submucosa; capa muscular compuesta por una capa muscular interna y otra externa; capa adventicia formada por tejido conectivo.

En la **lámina propia (o corion)** de la mucosa intestinal (Figura 1.8) encontramos diversos y abundantes elementos celulares: células inflamatorias como los linfocitos (que constituyen el Tejido Linfoide Relacionado con la Mucosa), células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) y células plasmáticas (Varol *et al.*, 2010; Andoh *et al.*, 2007). Además, encontramos las células mesenquimales sub-epiteliales que son fibroblastos y miofibroblastos entre otros (Pinchuk *et al.*, 2010; Andoh *et al.*, 2007). En diversas patologías del tubo

digestivo (incluidas las EIIs) se producen alteraciones de la arquitectura de la mucosa. En la reparación de estas lesiones es necesaria la participación activa de esta capa y sus células, en particular, de los fibroblastos (Powel *et al.*, 2011).

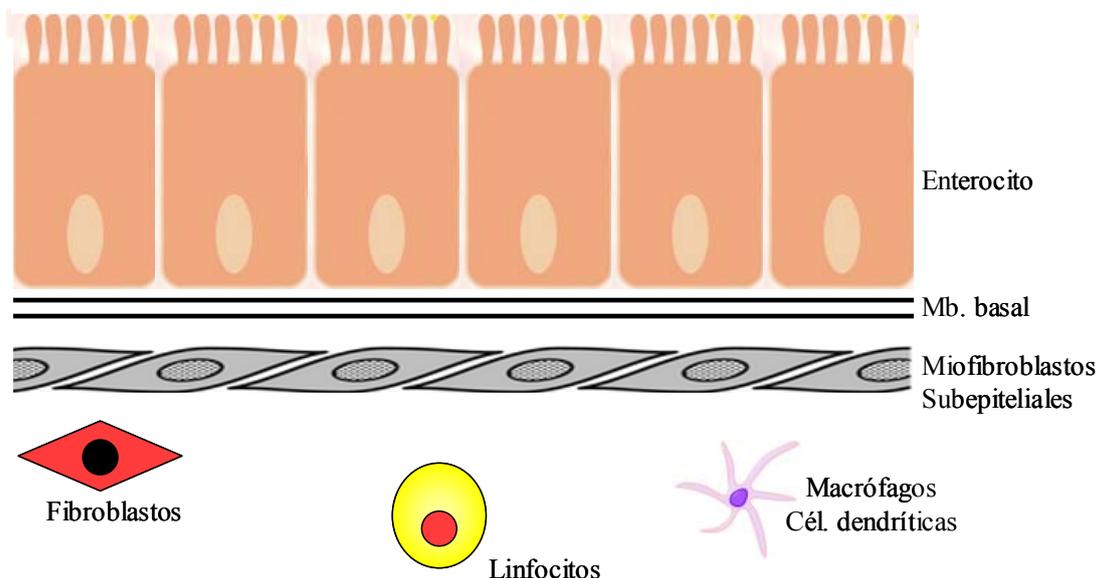


Figura 1.8. Estructura de la mucosa intestinal: epitelio y lámina propia. Se indica los elementos celulares más importantes: fibroblastos, miofibroblastos, células linfocitarias (modificada de Andoh *et al.*, 2007).

1.4.2. – Fibroblastos y miofibroblastos de la mucosa intestinal.

Los fibroblastos representan el tipo celular más abundante del tejido conectivo no cartilaginoso y participan de manera crucial en su fisiología y fisiopatología. En la actualidad, el fibroblasto se engloba dentro de un grupo heterogéneo de células o subpoblaciones denominadas genéricamente como fibroblastos, las cuales muestran unos fenotipos característicos en ciertos estados fisiológicos o fisiopatológicos (Abraham *et al.*, 2004). Entre estas subpoblaciones, encontramos los miofibroblastos.

Los miofibroblastos subepiteliales intestinales (ISEMFs) son un tipo de fibroblastos que expresan α -actina de músculo liso en su citoplasma y que forman una malla o red por debajo de la membrana basal del epitelio del intestino grueso y

delgado (Andoh *et al.*, 2007) (**Figura 1.8**). Son células muy activas (Rieder *et al.*, 2007) que participan en procesos normales y patológicos mediados por citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y otros mediadores de los procesos inflamatorios. Por medio de estas moléculas, los ISEMFs participan en la protección de la mucosa intestinal, en la modulación de la respuesta inmune de la mucosa, así como en la inflamación y la reparación, restitución y fibrosis de los tejidos de la mucosa dañados (Powel *et al.*, 1999b; Andoh *et al.*, 2007).

1.4.2.1.– Papel de los miofibroblastos en la respuesta inflamatoria.

Debido a su localización, número y expresión de receptores TLR (*Toll Like Receptors*), los ISEMFs juegan un importante papel en la respuesta inmune de la mucosa gastrointestinal (Powel *et al.*, 2011). Estas células son capaces de producir factores de crecimiento, mediadores pro-inflamatorios, quimioquinas y moléculas de adhesión (**Tabla 1.2**) que junto con otras citoquinas producidas por los linfocitos (IL-17 e IL-22) generan una amplificación de la respuesta pro-inflamatoria regulando la acción de las células inflamatorias del sistema inmune (Pinchuk *et al.*, 2010).

Tabla 1.2. Moléculas producidas por miofibroblastos que intervienen en la regulación de la respuesta inflamatoria

	Compuesto		Referencias
Citoquinas	IL-1 α	TNF- α	Pinchuk <i>et al.</i> , 2010
	IL-1 β	IL-6	Powel <i>et al.</i> , 1999b
Factores de crecimiento	bFGF	GM-CSF	Powel <i>et al.</i> , 1999b
	HGF	KGF	Brenmoehl <i>et al.</i> , 2009
	IGF-I	PDGF-BB	Pinchuk <i>et al.</i> , 2010
	IGF-II	PDGF-AA	
	TGF- α	VEGF	
	TGF- β	SCF	
Quimioquinas	IL-8	CCL-2	Pinchuk <i>et al.</i> , 2010
Moléculas de adhesión	ICAM-1	VCAM-1	Chakravortty y Kumar, 1999
			Powel <i>et al.</i> , 1999b
			Brannigan <i>et al.</i> , 2002
Otros mediadores	PGE2	PAI-1	Pinchuk <i>et al.</i> , 2010 Dellas y Loskutoff, 2005

Abreviaturas: Factor de crecimiento insulínico (IGF); Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); Factor de crecimiento de los keratinocitos (KGF); Factor de células madre (SCF).

Durante procesos inflamatorios crónicos como las EII, los miofibroblastos secretan las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β o IL-6 que inducen la secreción de quimioquinas como IL-8 y CCL-2 que producen la atracción de monocitos (Dunay y Sibley, **2010**), linfocitos, neutrófilos y macrófagos a la región inflamada (Powel *et al.*, **2011**). Además, esas citoquinas pro-inflamatorias producen un aumento tanto en la expresión de proteínas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) que aumentan el paso de células inmunes al tejido dañado, como de factores de crecimiento (PDGF-BB, bFGF o HGF) que aumentan la migración de los ISEMFs hacia la zona inflamada. Moléculas como PGE2 y PAI-1, son reguladores producidos por estas células que aumentan su expresión en respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias liberadas y que intervienen en la regulación de la respuesta inflamatoria (Powel *et al.*, **2011**; Kruithof, **2008**). Existen estudios que indican que los ISEMFs, gracias a su capacidad para producir citoquinas pro-inflamatorias, factores de

crecimiento y quimioquinas (Powel *et al.*, 1999b), pueden mantener la respuesta inflamatoria, pudiendo contribuir al desarrollo de las EIIs, EC y CU, mediante alteración en la deposición de MEC, aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y desregulación del balance de las células inflamatorias de la mucosa (Pinchuk *et al.*, 2010).

1.4.2.2. – Reparación de la mucosa intestinal (*wound healing*): papel de los miofibroblastos.

La reparación de tejidos es un proceso de gran importancia que consiste en la regeneración de órganos y tejidos que han sufrido algún tipo de daño o heridas (Rieder *et al.*, 2007). Se trata de un mecanismo altamente regulado y que consta de varias etapas: i) control hemostático de sangrado, ii) etapa inflamatoria, iii) etapa proliferativa y iv) etapa de remodelado (Delavary *et al.*, 2011). Las EIIs conducen a la destrucción de la barrera epitelial, pérdida de células epiteliales y destrucción de la MEC de la lámina propia y la consiguiente ulceración epitelial (Rieder *et al.*, 2007) permitiendo el acceso de la microbiota del lumen y antígenos de la dieta a la lámina propia donde entran en contacto con las células residentes (Andoh *et al.*, 2007; Chakravorty y Kumar, 1999).

1.4.2.2.1. – Migración y proliferación de los ISEMFs.

Los ISEMFs son de gran importancia en la regeneración de la mucosa intestinal, gracias a su capacidad para secretar proteínas de la MEC, factores de crecimiento y citoquinas además de ser células contráctiles y con capacidad migratoria y de proliferación. La migración de los miofibroblastos a través de la MEC parece ser un proceso fundamental durante la fase inicial de la reparación de

tejidos, pudiendo inducir su propia migración mediante la secreción de factores de crecimiento. Además, la proliferación de los miofibroblastos (Jobson *et al.*, 1998) y la influencia que ejercen sobre la proliferación y diferenciación de las células epiteliales, son unos mecanismos de gran importancia durante la reparación de tejidos (Rieder *et al.*, 2007).

La capacidad migratoria de ISEMFs aislados de la mucosa de pacientes con EC, está reducida en comparación con los aislados de individuos sanos (Rieder *et al.*, 2007). El tratamiento de ISEMFs aislados de mucosa normal con citoquinas como IFN- γ o TNF- α , factores de crecimiento como TGF- β , o con PGE2 provocan una disminución de la migración de estas células (Rieder *et al.*, 2007; Rieder *et al.*, 2010), mientras que IGF-I, EGF, PDGF-AA y PDGF-BB aumentan su capacidad migratoria en presencia de fibronectina (proteína presente en la MEC) (Rieder *et al.*, 2010). Cabe destacar el papel de PAI-1 en el proceso de migración celular ya que, como se ha indicado anteriormente, puede favorecerlo a bajos niveles o disminuirlo a elevadas concentraciones (Dellas y Loskutoff, 2005; Czekay *et al.*, 2011). El proceso migratorio es un fenómeno complejo ya que la capacidad migratoria de los miofibroblastos puede variar en función del tejido en el que se encuentran y del tipo de enfermedad, observándose distintos comportamientos de estas células (Rieder *et al.*, 2007).

Los fibroblastos se acumulan en la zona dañada (**Figura 1.9**), donde después sintetizarán nueva MEC (fundamentalmente fibronectina y colágeno). La capacidad de migrar, de tapar el área afectada y la producción de la MEC confiere a los ISEMFs un papel esencial durante la inflamación crónica (Rieder *et al.*, 2007). TNF- α , IL-1 β , TGF- β , PDGF-AA, PDGF-BB, bFGF, IGF-I e IGF-II entre otros, favorecen la proliferación de los ISEMFs y la síntesis de componentes de la MEC

(Okuno *et al.*, 2002; Jobson *et al.*, 1998; Rieder *et al.*, 2007; Rieder *et al.*, 2010; Andoh *et al.*, 2005; Andoh *et al.*, 2007).

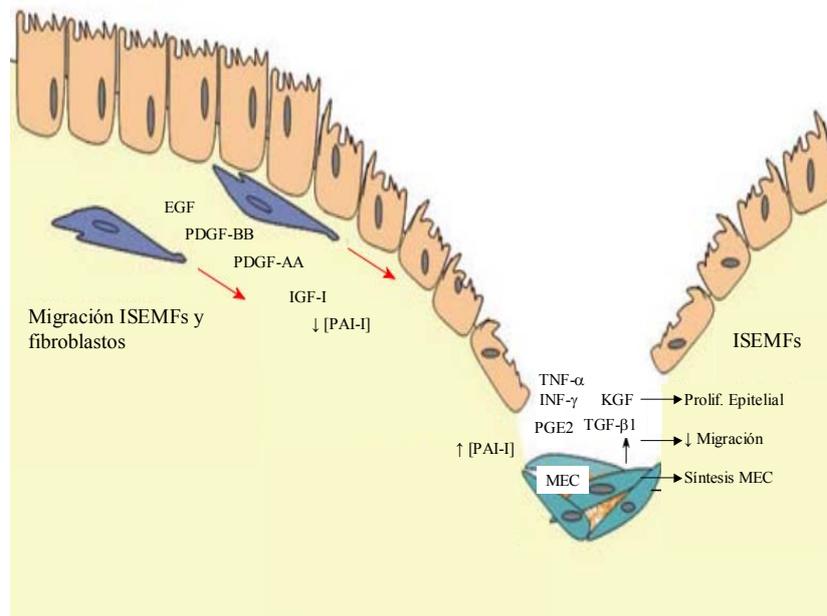


Figura 1.9. Representación hipotética del papel de los ISEMFs durante el proceso de reparación de tejidos y la regulación de la migración y proliferación por los factores de crecimiento, citoquinas, PGE2 y PAI-1. Una vez que se ha producido el daño, los fibroblastos y los ISEMFs se desplazan hacia la zona dañada gracias a la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que favorecen la migración de estas células. Una vez alcanzada la zona dañada, disminuye la migración, comienza la síntesis de MEC y secretan KGF que induce una proliferación de las células epiteliales (modificada de Brenmoehl *et al.*, 2009). ↓ indica disminución; ↓ [] indica baja concentración; ↑ [] indica alta concentración.

1.4.2.2.2. – Síntesis de los componentes de la matriz extracelular.

La producción de moléculas de la matriz como colágeno, glicosaminoglicanos o fibronectina en el espacio intersticial o membrana basal, forma parte de la función de los ISEMFs en el proceso de reparación de tejidos (Powel *et al.*, 1999a). Este proceso de producción de factores de la MEC por parte de los ISEMFs está modulado por citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento contribuyendo al proceso de remodelación del tejido (Andoh *et al.*, 2007).

La actividad de las MMPs, que son las principales enzimas encargadas de la degradación de la MEC, está controlada por los TIMPs y por inhibidores no específicos como la macroglobulina- β_2 (Andoh *et al.*, 2005). El balance entre ambos

(MMPs/TIMPs) controla el proceso de remodelación de la MEC tanto en condiciones fisiológicas como durante el proceso de inflamación y reparación de heridas (Rieder *et al.*, 2007; Andoh *et al.*, 2007). Algunos estudios muestran que la expresión de MMPs y TIMPs está aumentada en la mucosa inflamada de pacientes con EII (Andoh *et al.*, 2007). A su vez, estudios *in vitro* muestran que IL-1 β , TNF- α (Andoh *et al.*, 2007) e IL-17 (Andoh *et al.*, 2007; Bamba *et al.*, 2003a) aumentan la producción de algunas MMPs y TIMPs lo que indica la regulación de estos factores por citoquinas pro-inflamatorias. PAI-1 tiene un papel muy importante en el control del balance de la MEC ya que controla la síntesis de la MEC, disminuyendo la degradación del colágeno a bajos niveles lo que favorece el proceso fibrótico (Ghosh y Vaughan, 2012). Una MMP destacada es la MMP-12 que favorece la degradación de proteínas de la MEC y regula la cascada de activación de otras MMPs (Pender *et al.*, 2006).

La función migratoria y proliferativa de los miofibroblastos así como su habilidad para reparar los tejidos dañados mediante la producción de MEC, juega un papel clave en el control de las EIIs. Los tratamientos actuales disponibles para paliar los problemas de fibrosis y fistulas son insuficientes e insatisfactorios, por lo que se necesitan nuevas terapias y tratamientos preventivos. Una posible diana terapéutica que ayudara a evitar/paliar el daño tisular de la mucosa podría ser a través de la modulación de la actividad de los ISEMFs (Rieder *et al.*, 2007).

1.4.3. – Papel de la microbiota en las enfermedades inflamatorias intestinales.

La salud intestinal depende de forma fundamental de la relación entre el hospedador y la microbiota siendo esta relación especialmente relevante en el colon

ya que alberga una diversidad microbiana superior a la de cualquier otro órgano (Gill *et al.*, 2006). Estos microorganismos llevan a cabo múltiples funciones que benefician al hospedador como la prevención de infecciones causadas por patógenos, digieren y proporcionan nutrientes como la vitamina B y el folato, y configuran el sistema inmune de la mucosa (Goto e Hiroshi, 2011). El sistema inmune del colon es tolerante a esta carga microbiana y la pérdida de esta tolerancia se postula como una de las principales causas de las EIIs (McDonald, 1995). Estudios con modelos animales demuestran la influencia de la microbiota en las EIIs, ya que animales libres de microorganismos no desarrollan colitis hasta que la flora microbiana se reestablece (Chandran *et al.*, 2003; Eckburg *et al.*, 2007). Por su parte, estudios en humanos han permitido consensuar que la densidad de la microbiota es mayor en pacientes con CU y/o EC que en pacientes sanos (Danese y Fiocchi, 2011; Sartor, 2008). En la actualidad, el proyecto “Microbioma Humano” trata de determinar la composición de la microbiota intestinal tanto en condiciones patológicas como de salud (Turnbaugh *et al.*, 2007). Sin embargo, todavía no se han identificado especies concretas de bacterias que generen EIIs (Chandran *et al.*, 2003).

1.4.3.1.– Microbiota residente: principales grupos y posibles efectos moduladores en la inflamación del intestino.

El papel que las bacterias desempeñan en el tracto gastrointestinal humano en los estados de salud y de enfermedad, es un tema de gran interés en la actualidad (Hansen *et al.*, 2010). El intestino de un adulto humano contiene alrededor de 10^{14} bacterias y se ha estimado hasta 1000 especies diferentes. Estudios recientes han descrito la enorme variedad de especies bacterianas que existe y ha identificado como grupos dominantes a: *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale*, *Clostridium*

leptum, *Bacteroides-Prevotella*, y especies de *Bifidobacterium* y *Atopobium* (Fava y Danese, 2011; Eckburg, 2005; Louis *et al.*, 2007; Zoetendal *et al.*, 2006). La microbiota comensal contribuye al “efecto barrera” que constituye un obstáculo para la invasión de patógenos de la mucosa intestinal (Fava y Danese, 2011). *Lactobacillus* y *Bifidobacterium sp* pueden inhibir el crecimiento de los patógenos intestinales gracias a la producción de compuestos bactericidas que disminuye el pH intestinal (Ivanov y Littman, 2011; Gareau *et al.*, 2010). *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) induce respuestas anti-inflamatorias mediante regulación del sistema inmune (Ivanov y Littman, 2011).

Existen evidencias que destacan que la actividad y composición de la microbiota intestinal en individuos afectados por EIIs es anormal. Sin embargo, la pregunta de si la alteración de la microbiota intestinal es una causa de la enfermedad o una consecuencia del estado inflamatorio del intestino todavía no tiene respuesta (Fava y Danese, 2011).

1.4.3.2.– El papel de microorganismos productores de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en la inflamación intestinal.

Los SCFAs acetato, butirato y propionato son los principales productos metabólicos de la fermentación anaeróbica bacteriana en el intestino. Estos ácidos grasos han mostrado ser importantes mediadores en la microbiota del colon y del sistema inmune, regulando la producción de citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas en los leucocitos (Vinolo *et al.*, 2011). El papel de los SCFAs como compuestos anti-inflamatorios ha adquirido mucho interés en los últimos años, dando lugar a estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que muestran su posible papel terapéutico frente a EIIs. Estudios *in vitro* han mostrado que butirato, propionato y acetato

inhiben la actividad de NF- κ B en células Colo320DM (células de adenocarcinoma de colon humano), disminuyen la producción de TNF- α en neutrófilos y bajan la producción de IL-6 en células de colon (Tedelind *et al.*, 2007), mientras que el butirato y el propionato reducen la expresión de IL-8 en células de cáncer de colon humano HT-29 (Gálvez *et al.*, 2005). En estudios *in vivo*, los SCFAs se suministraron de diferentes formas: a través de la ingesta de fibra dietética, mediante la aplicación de enemas (introducción de los compuestos directamente en el colon) o mediante administración oral de butirato sódico (Vinolo *et al.*, 2011). Estos estudios mostraron, en pacientes con EIIs, mejora sintomática, reducción de pérdida de peso, atenuación en la concentración de citoquinas pro-inflamatorias o mejora de la lesión de la mucosa entre otros efectos (Vinolo *et al.*, 2011).

En el colon humano, especies de *Clostridium* y *Bacteroides* son los principales productores de SCFAs (Fava y Danese, 2011), en particular, de acetato, propionato y butirato (Tedelind *et al.*, 2007). Diversos estudios relacionan la capacidad anti-inflamatoria de los SCFA con las EIIs, siendo el butirato el SCFA más estudiado (Tedelind *et al.*, 2007). Bajos recuentos de *Faecalibacterium prausnitzii*, un importante productor de butirato, se relacionan con la incidencia de EIIs con lo que su papel parece ser protector (Larrosa *et al.*, 2010b; Fava y Danese, 2011; Sokol *et al.*, 2009).

1.4.3.3.– Microorganismos patógenos e inflamación intestinal.

No solo la pérdida de tolerancia del hospedador hacia la microbiota intestinal es la causa de EIIs. La infección causada por agentes patógenos puede contribuir a causar un desequilibrio de las poblaciones microbianas naturales (disbiosis). La disbiosis se ha observado repetidamente en pacientes con inflamación intestinal. Se

sospecha que infecciones por bacterias patógenas en el tracto digestivo a partir de alimentos en mal estado pueden estar implicadas en un pequeño porcentaje de EIIs (Greenstein, 2003; Lamps *et al.*, 2003). Entre otros microorganismos, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni* y *Y. enterocolitica* se han identificado como posibles agentes causantes de CU, mientras que otros como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Y. enterocolitica* se han asociado con la EC (Saebo *et al.*, 2005).

Y. enterocolitica es un enteropatógeno de mamíferos que en humanos puede generar enteritis, enterocolitis, linfadenitis mesentérica o ileítis terminal, tras el consumo de alimentos contaminados o por inoculación directa tras una transfusión de sangre. Esta bacteria presenta facilidad para vivir cerca de los mamíferos, tanto en el medio acuático como en el medio terrestre generando patologías gracias a sus múltiples factores de virulencia (Bottone, 1997). Tras la ingestión de *Y. enterocolitica*, la bacteria coloniza el lumen y se disemina hacia otros órganos, como hígado o bazo, siguiendo dos caminos: i) atravesando directamente la barrera epitelial y colonizando otros tejidos; ii) migrando hacia los tejidos linfoides intestinales (placas de Peyer) y de ahí hacia otros órganos (Pepe y Miller, 1993; Handley *et al.*, 2005). La presencia de *Y. enterocolitica* en el colon se ha asociado con el desarrollo de EIIs. Entre las principales evidencias que relacionan la presencia de esta bacteria con las EIIs se encuentran: la presencia de anticuerpos específicos contra esta bacteria en pacientes con CU y EC, presencia de *Y. enterocolitica*, confirmada por PCR, en pacientes que desarrollan EC y/o elevada sensibilidad de las células mononucleares de los nódulos linfáticos mesentéricos hacia la bacteria (Saebo *et al.*, 2005).

1.4.3.4.– *Quorum sensing* y su posible papel en la prevención de la inflamación intestinal.

Aunque las bacterias son organismos unicelulares, normalmente muestran un comportamiento de grupo. Las bacterias son capaces de controlar la densidad de población gracias a la producción de unas moléculas de bajo peso molecular cuya concentración extracelular se relaciona con la densidad de población bacteriana. En el caso de las bacterias Gram-negativas, estas moléculas se denominan *N*-acil-homoserín-lactonas (AHLs) (**Figura 1.10**) y cuando alcanzan una concentración crítica, la población inicia una acción concertada expresando genes relacionados con procesos como la regulación de la bioluminiscencia o la motilidad bacteriana (Daniels *et al.*, 2004). Este tipo de comunicación se denomina “*Quorum Sensing*” (*QS*) y bacterias Gram-negativas como *Erwinia carotovora*, *Y. enterocolitica* y/o *Aeromonas hydrophila* lo utilizan (Truchado *et al.*, 2009a).

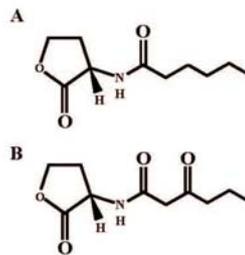


Fig 1.10. Estructura de las lactonas producidas por *Y. enterocolitica* A) *N*-hexanoil homoserín lactona; B) *N*-(3-oxohexanoil) homoserín lactona (imagen modificada de Atkinson *et al.*, 2006b).

En *Y. enterocolitica*, el proceso de *QS* está regulado por dos AHLs principalmente: la *N*-hexanoil-homoserín lactona (C6-HSL) y *N*-(3-oxohexanoil) homoserín lactona (3-oxo-C6-HSL) (**Figura 1.10**), las cuales están implicadas en la regulación de la virulencia, producción de metabolitos secundarios, motilidad y formación de biopelículas dependientes de la densidad de población bacteriana (Atkinson *et al.*, 2006a). La motilidad y la formación de biopelículas son dos procesos implicados en la diseminación de las bacterias. La formación de

biopelículas por microorganismos patógenos facilita su supervivencia en el hospedador. A partir de las biopelículas, los microorganismos pueden dispersarse de varias maneras, entre las que se incluye la migración de aquellos que presentan flagelos (Hall Stoodley y Stoodley, **2005**), los cuales, a su vez, pueden facilitar la adhesión del microorganismo a las células del hospedador, facilitando su diseminación (Daniels *et al.*, **2004**). El control de la motilidad y la formación de biopelículas en *Y. enterocolitica* mediante el bloqueo de la señalización por *QS*, podría ayudar a evitar la diseminación de esta bacteria por el organismo y disminuir su patogenicidad.

En la actualidad, los mecanismos de *QS* de las bacterias se están investigando como posibles dianas para combatir y evitar las infecciones en humanos, animales y plantas (Czajkowski *et al.*, **2009**). El sistema *QS* de las bacterias Gram-negativas dependiente de las AHLs puede inactivarse por dos tipos de estrategias: un primer tipo evitaría la generación de la señal, tanto a nivel genético reprimiendo la expresión de genes virulentos (Finch *et al.*, **1998**) como evitando la síntesis de las lactonas (Whitehead *et al.*, **2001**) y un segundo tipo que interceptaría o degradaría la señal para que no sea detectada (Uroz *et al.*, **2009**). La interceptación del *QS* podría disminuir la virulencia bacteriana, permitiendo disminuir las dosis de antibióticos y haciendo más eficaces a las defensas del hospedador (Geske *et al.*, **2008**).

Numerosas investigaciones se han centrado en la identificación de compuestos sintéticos y análogos con propiedades inhibitorias del *QS*. Sin embargo, hay menos estudios que investigan la capacidad anti-*QS* de compuestos naturales (Vikram *et al.*, **2010**; Lee *et al.*, **2009**; Vandeputte *et al.*, **2011**). Considerando el potencial de los compuestos naturales en la prevención de enfermedades, el estudio de la inhibición del *QS* y de la formación de biopelículas por estos compuestos, en

microorganismos relacionados con la inflamación intestinal, es un campo de gran interés en la prevención de la inflamación intestinal.

1.5. – Papel de la dieta en las enfermedades crónicas inflamatorias.

El estilo de vida y los hábitos alimentarios son dos factores críticos que pueden modificarse para evitar o retrasar el desarrollo de las enfermedades crónicas. Estudios epidemiológicos y experimentales han mostrado que existe una estrecha relación entre los hábitos alimentarios y el riesgo a padecer ciertas enfermedades. En general, se acepta que el consumo de alimentos derivados de productos vegetales como el vino, frutas, hortalizas, frutos secos, cereales, legumbres, especias, etc (abundantes en la dieta mediterránea) se asocia con efectos beneficiosos sobre la salud, particularmente sobre enfermedades crónicas relacionadas con la edad como ECVs, EII, enfermedades neurodegenerativas, diabetes tipo II o cáncer (Espín *et al.*, **2007a**). Un estudio reciente (Nordmann, **2011**) muestra que los patrones alimenticios de la dieta mediterránea disminuían los factores de riesgo cardiovascular y los marcadores de inflamación como la proteína C reactiva. Numerosos estudios se han centrado en el efecto inmunomodulador de los nutrientes tanto en estados de salud como de enfermedad, y han subrayado el papel de la nutrición como una posible práctica clínica en la salud pública. Casi todos los nutrientes de la dieta tienen un papel muy importante en el mantenimiento de una respuesta inmune óptima, como los ácidos grasos (saturados e insaturados), hidratos de carbono, vitaminas, minerales, etc (Kontogianni *et al.*, **2006**; Wu y Schauss, **2012**). Entre los compuestos de la dieta capaces de atenuar la respuesta inflamatoria se encuentran los compuestos fenólicos abundantes en los alimentos vegetales (Wu y Schauss, **2012**).

1.5.1. – Compuestos fenólicos de la dieta y salud.

La capacidad de algunos alimentos derivados de plantas de reducir el riesgo de padecer enfermedades se ha asociado, al menos en parte, a la presencia de metabolitos secundarios no-nutrientes (fitoquímicos) a los que se les atribuye una amplia variedad de actividades biológicas. Estos metabolitos tienen una potencia moderada como compuestos bioactivos y una baja biodisponibilidad en comparación con los fármacos, pero cuando se ingieren regularmente y en cantidades significativas podrían tener efectos fisiológicos perceptibles a largo plazo. Entre los fitoquímicos presentes en los alimentos que se han asociado con un efecto beneficioso sobre la salud se incluyen los glucosinolatos, terpenoides y un amplio y diverso grupo de **compuestos fenólicos** (antocianos, flavonas, flavan-3-oles, isoflavonas, estilbenos, elagitaninos (ETs) y ácido elágico (EA), etc. La actividad biológica de los compuestos fenólicos se ha asociado, al menos en parte, a sus propiedades antioxidantes y su capacidad para neutralizar radicales libres implicados en el desarrollo de la inflamación y las enfermedades degenerativas asociadas. Así, estos compuestos fenólicos pueden estar implicados en la prevención o reducción de la oxidación de las LDL en el desarrollo de la placa de ateroma, de la oxidación y alteración del ADN, etc (Espín *et al.*, 2007a; Olsson *et al.*, 2004). Sin embargo, no toda la bioactividad de los compuestos fenólicos se puede relacionar con la capacidad antioxidante de estas moléculas, ya que la mayor parte de estos compuestos sufren alteraciones y transformaciones de su estructura molecular durante el tránsito gastrointestinal y metabolismo en el organismo, con lo que los metabolitos formados pueden tener propiedades diferentes. Por ejemplo, se ha demostrado que los metabolitos derivados de los ETs, las urolitinas (Uros), presentan

actividad anti-inflamatoria a pesar de presentar una baja actividad antioxidante (Larrosa *et al.*, 2010a; Cerdá *et al.*, 2004).

En los últimos años, muchos constituyentes bioactivos de los alimentos, incluyendo los compuesto fenólicos, se han utilizado en la comercialización de los llamados **alimentos funcionales** que se definen como aquellos que, consumidos regularmente, ejercen un efecto beneficioso para la salud y el bienestar del individuo más allá de sus propiedades nutricionales, contribuyendo bien a un estatus más saludable o a un menor riesgo de padecer una enfermedad. Por su parte, los **nutracéuticos** se definen como suplementos dietéticos, presentados en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc), obtenidos a partir de una sustancia natural bioactiva presente usualmente en los alimentos y que tomada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presumiblemente, tiene un efecto favorable sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal (Espín *et al.*, 2007a). El objetivo de estos alimentos funcionales y/o nutracéuticos es incrementar la ingesta de compuestos bioactivos beneficiosos, incluidos los compuestos fenólicos de origen vegetal para contribuir a la prevención del riesgo de padecer ciertas enfermedades. Estos efectos beneficiosos deben estar, sin embargo, demostrados científicamente como indica el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 para lo que es esencial establecer: 1) que moléculas y/o derivados metabólicos son los verdaderos responsables *in vivo* de los efectos beneficiosos observados tras el consumo de estos productos o compuestos bioactivos, 2) que mecanismos celulares y moleculares se desencadenan en las células y tejidos diana expuestos a estos compuestos y explican los efectos beneficiosos.

1.5.2. – Clasificación general de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos están presentes en un amplio rango de productos vegetales y derivados (frutas, verduras, cereales, y bebidas derivadas). Se han descrito más de 8000 compuestos diferentes que se agrupan en base a su estructura química (Ramos, 2007). Las dos categorías principales en las que se dividen atendiendo a su estructura básica son flavonoides y no flavonoides (Waterhouse, 2002).

- **Flavonoides:** Compuestos fenólicos que poseen un esqueleto con 15 átomos de carbono y que se representan en un sistema de tipo C₆-C₃-C₆. El esqueleto de estos compuestos está formado por dos anillos bencénicos unidos a un tercero de tipo γ -pirano (Ferrazzano *et al.*, 2011). A los flavonoides se les atribuyen numerosas propiedades beneficiosas incluyendo: propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, anti-alérgicas, hepato-protectoras, anti-trombóticas, antivirales y anti-carcinogénicas entre otras (Middelton *et al.*, 2000). En la **Figura 1.11** se puede ver las principales familias de flavonoides presentes en los alimentos consumidos en la dieta.

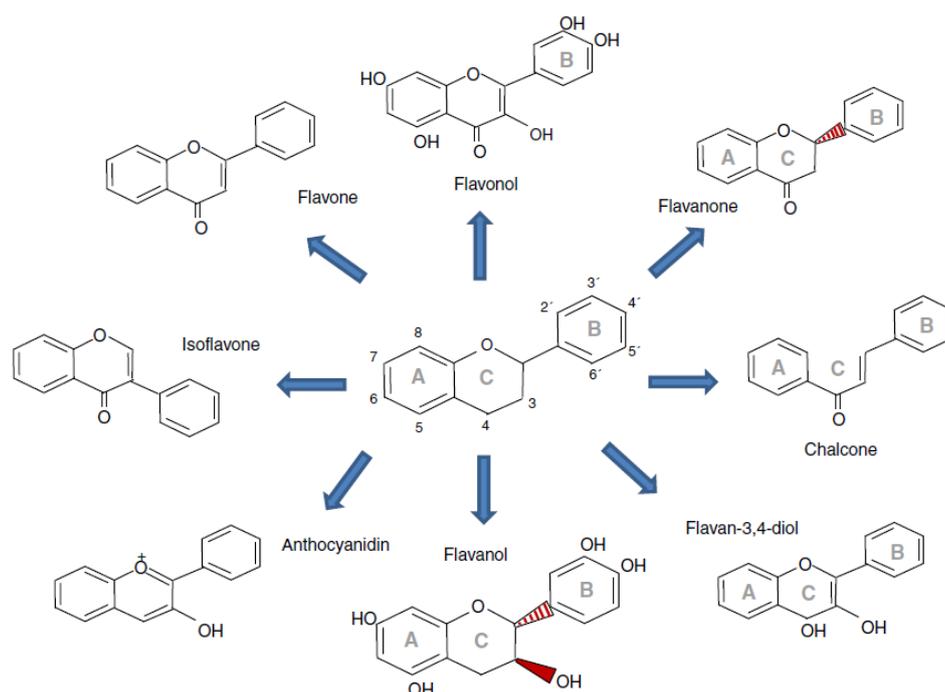


Figura 1.11. Estructura de las principales familias de flavonoides. A partir de un esqueleto formado por 3 anillos bencénicos, se derivan las distintas familias de compuestos flavonoides (Fraga y Oteiza, 2011).

- **No flavonoides:** Este grupo de compuestos fenólicos se divide a su vez en 4 subgrupos: ácidos hidroxicinámicos, ácidos benzóicos, taninos hidrolizables y estilbenos. Los ácidos hidroxicinámicos son muy abundantes en el zumo de uva y en el vino blanco. Dentro de este subgrupo encontramos el ácido cumárico, caféico o ferúlico. Los ácidos benzóicos, como el ácido gálico o el EA, son constituyentes de los taninos hidrolizables apareciendo en frutas como la fresa, frambuesa, zarzamora, granada o calabaza. Los taninos hidrolizables están formados por ésteres de ácido gálico y EA con glucosa u otros azúcares. Se clasifican en dos categorías: galotaninos y ETs. Se encuentran en frutas como la uva de la variedad *muscadine* o las frambuesas. Por último, los estilbenos están presentes en la uva e incluyen entre otros el resveratrol, compuesto ampliamente investigado por sus numerosas propiedades beneficiosas (Waterhouse, 2002) (Figura 1.12).

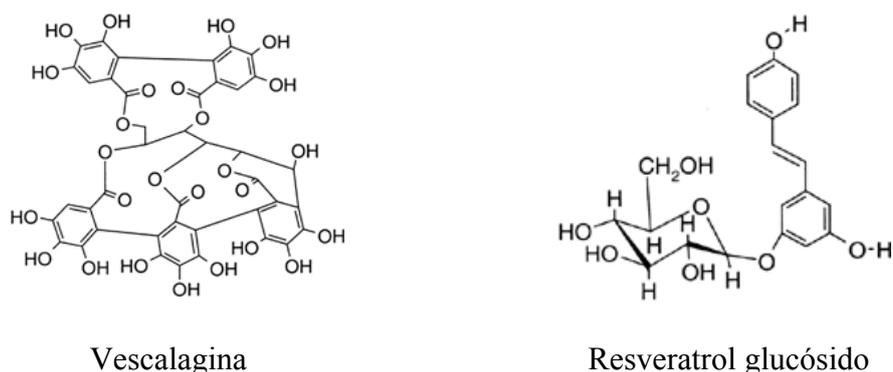


Figura 1.12. Compuestos fenólicos no flavonoides. La vescalagina (izquierda) es un ET presente en las bebidas envejecidas en barrica. El resveratrol glucósido (derecha) es un estilbeno presente en la uva (Waterhouse, 2002).

1.5.3. – Metabolismo y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos más abundantes en la dieta humana, no son necesariamente los más activos una vez ingeridos (Manach *et al.*, 2004). Esto nos indica que además del contenido en compuestos fenólicos en los alimentos, es muy importante conocer su biodisponibilidad (D'Achivio *et al.*, 2007). Las concentraciones que estos compuestos alcanzan en plasma se encuentran en el rango nM o μ M (Manach *et al.*, 2004). En general, la absorción de los compuestos fenólicos es baja, ya que mientras que las agliconas y algunos glicósidos se pueden absorber en el intestino delgado (Manach *et al.*, 2004), en su mayoría se encuentran como glicósidos, polímeros o ésteres que no se absorben en su forma nativa. Estos compuestos se hidrolizan por acción de las enzimas intestinales y/o la microbiota colónica antes de su absorción intestinal (Manach *et al.*, 2004; D'Achivio *et al.*, 2007). La flora intestinal degrada las agliconas, produciendo ácidos aromáticos en el proceso, los cuales se absorben y conjugan pudiendo ejercer sus posibles efectos beneficiosos en el organismo (Manach *et al.*, 2004). Puesto que los compuestos fenólicos ingeridos con la dieta son compuestos no nutrientes (xenobióticos), el organismo tiende a metabolizarlos (intestino e hígado) y eliminarlos por la orina y/o

heces. La metabolización de los compuestos fenólicos tiene lugar mediante el concurso de una serie combinada de acciones enzimáticas clasificadas en dos fases principales: fase I y fase II, que implican la activación de las moléculas y su conversión a otras más solubles en agua y fácilmente eliminables:

- En la fase I tienen lugar reacciones que incluyen la transformación del compuesto en un metabolito más polar que el original, introduciendo o exponiendo un grupo funcional (por ejemplo, -OH, -NH₂, -SH). Las principales enzimas de esta fase son los citocromos P450 (CYP450) que constituyen una superfamilia de enzimas del metabolismo de los xenobióticos y endobióticos (Jancova *et al.*, 2010) y que llevan a cabo hidroxilaciones gracias a su actividad oxigenasa (Ionnades y Lewis, 2004) (monooxigenasa y dioxigenasa) e hidrolasa.

- Las enzimas de fase II juegan un papel importante en la biotransformación de compuestos endógenos y xenobióticos para facilitar la excreción y la inactivación toxicológica y/o farmacológica (Kaferstein, 2009). Este proceso de biotransformación se lleva a cabo mediante reacciones de conjugación (Jancova *et al.*, 2010).

1.5.3.1.– Mecanismos generales de conjugación. Glucuronidación.

Las reacciones de fase II se llevan a cabo gracias a un grupo de enzimas, que se localizan principalmente en el citosol y que catalizan reacciones de conjugación. Estas reacciones incluyen la glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, y conjugación con aminoácidos o glutatión. Como norma general, los conjugados generados son más hidrofílicos que los compuestos originales. Los derivados metabólicos de compuestos fenólicos encontrados de forma más abundante en el

organismo humano son los derivados glucuronidados, sulfatados y/o metilados (Lolito *et al.*, 2011).

i) Glucuronidación:

Las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs) son las enzimas clave en el proceso de glucuronidación. Son una superfamilia de 117 enzimas de membrana que se encuentran, principalmente, en el retículo endoplasmático. Estas enzimas presentan una amplia distribución localizándose principalmente en el hígado y en el tracto intestinal, aunque también se ha visto presencia de UGTs en otros tejidos como riñón, cerebro, páncreas, placenta y epitelio nasal (Jancova *et al.*, 2010). La formación de glucurónidos conjugados es la ruta más importante en el proceso de detoxificación en el metabolismo de fase II de los vertebrados. En humanos, entre el 40-70% de todas las drogas clínicas sufren reacciones de glucuronidación. Estas enzimas catalizan la formación de un enlace entre grupos nucleofílicos O-, N-, S-, o un átomo de carbono con uridina-5'-difosfo- α -D-ácido glucurónico (UDPGA). Esta reacción forma β -D-glucurónidos (**Figura 1.13**) que se eliminan fácilmente por la bilis o la orina.

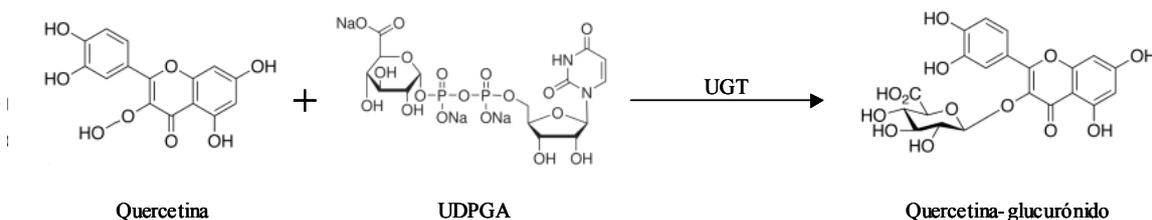


Figura 1.13. Conjugación de quercetina con UDPGA. Se produce la quercetina-glucurónido que es un compuesto más soluble que la quercetina aglicona (modificado de Terao *et al.*, 2011).

Las UGTs intestinales se consideran de gran importancia ya que constituyen el primer paso en la metabolización de compuestos provenientes de la dieta. Sin embargo, es a nivel hepático donde se producen la mayoría de las reacciones de

glucuronidación siendo las enzimas más importantes: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15 (Jancova *et al.*, 2010).

1.5.4. – Compuestos fenólicos como moléculas con propiedades anti-inflamatorias.

Entre las numerosas propiedades atribuidas a los compuestos fenólicos, y a los productos naturales enriquecidos en dichos compuestos, destacan sus propiedades anti-inflamatorias por su posible aplicación como anti-inflamatorios de acción general con efectos secundarios más reducidos que los de drogas o agentes químicos (Gosslau *et al.*, 2011). Numerosas evidencias experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, muestran las propiedades anti-inflamatorias de diversos grupos de compuestos fenólicos abundantes en la dieta. Estas propiedades se asocian de forma general con i) la modulación de las rutas moleculares de señalización inflamatoria, ii) disminución en la producción de moléculas inflamatorias, iii) disminución de la quimioatracción y activación de células inflamatorias, iv) regulación de la función celular y sus propiedades antioxidantes (Pan *et al.*, 2010).

Estudios *in vitro* han demostrado, por ejemplo, que la quercetina, flavonoide abundante en manzanas y cebolla, es capaz de inhibir la producción de TNF- α , de óxido nítrico (NO) y la expresión de la sintasa inducible del NO (iNOS) en macrófagos de ratón RAW 264.7 (González-Gallego *et al.*, 2010). Otros polifenoles, como la curcumina y el resveratrol, a concentraciones entre 1 y 20 μ M, suprimen la actividad de linfocitos y macrófagos de ratón mediante inhibición de la capacidad de proliferación de estas células (Sharma *et al.*, 2007). En estudios *in vivo* con modelos animales se ha visto, por ejemplo, que un extracto de uva enriquecido en resveratrol previene la aparición de lesiones ateroscleróticas en cerdo (Azorín-Ortuño *et al.*,

2011). En ratas, la granada y su metabolito microbiano derivado, la Uro-A (3,8-dihidroxi-6H-dibenzo [*b,d*] piran-6-ona), ejercen efectos protectores frente a inflamación intestinal inducida (Larrosa *et al.*, **2010b**). Los estudios epidemiológicos y de intervención sobre los efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores de los compuestos fenólicos no son del todo claros. En individuos sanos con patrones dietéticos en los que se consume una elevada cantidad de frutas y verduras, se ha observado una reducción en los niveles plasmáticos de proteína C reactiva, IL-6, TNF- α y moléculas de adhesión (González-Gallego *et al.*, **2010**). Por otra parte, no se observaron efectos beneficiosos en un estudio en el que se consumió té negro durante un corto período de tiempo (Widlansky *et al.*, **2005**). En otro estudio en el que 11 hombres y mujeres consumieron 800 mg de extracto de granada, se incrementó la capacidad antioxidante de estos voluntarios, aunque no se modificaron los niveles de IL-6 (Mertens-Talcott *et al.*, **2006**). Existen algunas investigaciones que estudian los efectos beneficiosos de estos compuestos fenólicos sobre enfermedades crónicas. Se ha visto que el zumo de uva es capaz de disminuir los niveles plasmáticos de CCL-2 y de LDL oxidadas (LDL_{ox}) en pacientes con aterosclerosis, mientras que el zumo de granada mantiene los niveles de antígeno de suero prostático (PSA) en individuos que padecían cáncer de próstata (González-Gallego *et al.*, **2010**; Pantuck *et al.*, **2006**).

En su mayoría, los estudios realizados hasta el momento sobre las propiedades anti-inflamatorias de compuestos fenólicos de la dieta son *in vitro*, mientras que el número de investigaciones llevadas a cabo en modelos *in vivo* son limitadas, siendo especialmente escasos los resultados de estudios en humanos. Diversos estudios (González-Sarriás *et al.* en **2009b**; González-Gallego *et al.*, **2010**) critican que la mayoría de los estudios *in vitro* que se han realizado hasta la

actualidad han investigado mayoritariamente los efectos anti-inflamatorios de extractos o compuestos fenólicos individuales (generalmente agliconas) a concentraciones superiores a las detectadas en los estudios *in vivo*. Esta aproximación resulta errónea por varias razones: i) los compuestos que se suelen utilizar en el estudio *in vitro* no son realmente biodisponibles en los modelos *in vivo* y por tanto no llegan a las células diana en estudio, ii) las moléculas que realmente alcanzan un tejido u órgano diana son metabolitos derivados de los compuestos originales y iii) las concentraciones que se utilizan no son representativas de las que realmente se alcanzan en el organismo o tejido diana. Debido a estas cuestiones críticas, muchos de los resultados obtenidos *in vitro* no reproducen la realidad del organismo vivo donde la respuesta observada puede ser muy diferente.

1.5.5. – Compuestos fenólicos como moléculas con propiedades anti-microbianas y anti-QS.

La resistencia que los microorganismos desarrollan a los antibióticos supone un gran problema en la sociedad actual, lo que genera la necesidad de buscar nuevos agentes anti-microbianos. Los productos naturales son una fuente de compuestos químicos que proporcionan agentes terapéuticos contra muchas enfermedades bacterianas (Ferrazzano *et al.*, 2011; Cushnie y Lamb, 2011). Por ejemplo, la catequina actúa sobre bacterias como *E. coli*, *Salmonella cholerae* o *P. aeruginosa*, generando peróxido de hidrógeno y alterando la permeabilidad de la membrana microbiana (Ferrazzano *et al.*, 2011). La granada y la punicalagina inhiben significativamente el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, mientras que el EA muestra un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre *Helicobacter pylori* (Landete *et al.*, 2011).

El descubrimiento de que muchas bacterias patógenas utilizan el mecanismo de *QS* para regular los factores de virulencia ha convertido este proceso en una importante diana terapéutica antimicrobiana (Truchado *et al.*, **2009**). El número de investigaciones que tratan de identificar compuestos de origen natural capaces de interferir con el *QS* de bacterias patógenas para disminuir su patogenicidad ha aumentado notablemente (Truchado *et al.*, **2009**; Cushnie y Lamb, **2011**). Un estudio llevado a cabo por Huber *et al.* en el año **2003** demostró que el ácido tánico, el EA y la epigallocatequina galato (EGCG) inhibían el crecimiento de *E. coli* y *Pseudomonas putida* a elevadas concentraciones al tiempo que bloqueaban la señalización por AHLs, lo que indicaba que estos compuestos podían comportarse como compuestos anti-microbianos y anti-*QS*. En los últimos años, numerosos estudios han continuado con la búsqueda de compuestos naturales que presenten actividades anti-*QS* frente a microorganismos patógenos. En la **Tabla 1.3** se listan algunos ejemplos recientes de estos estudios.

Tabla 1.3. Propiedades anti-*QS* de algunos compuestos fenólicos

Bacteria	Compuesto	Efecto	Referencia
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	EGCG	↓ motilidad ↓ formación biopelícula ↓ expresión genes virulentos	Lee <i>et al.</i> , 2009
	Naringenina	- formación biopelícula	Vikram <i>et al.</i> , 2010
	Punicalagina	- crecimiento	Reddy <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Catequina	- formación biopelícula	Vandeputte <i>et al.</i> , 2010
	Baicaleina	- formación biopelícula	Zeng <i>et al.</i> , 2008
	Naringenina	- producción de lactonas	Vandeputte <i>et al.</i> , 2010
	Punicalagina	- crecimiento	Reddy <i>et al.</i> , 2007
<i>Proteus mirabilis</i>	Resveratrol	- motilidad	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Y. enterocolitica</i>	Miel de castaño*	↓ producción de AHLs	Truchado <i>et al.</i> , 2009
<i>Erwinia carotovora</i>		↓ formación biopelícula	
<i>Aeromonas hydrophila</i>			

*En este estudio se investigó la capacidad anti-*QS* del producto natural completo; ↓ disminución; - inhibición.

La identificación de los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos es clave en el desarrollo de estos compuestos como anti-microbianos y anti-QS. La identificación de sus dianas celulares podría permitir la anticipación a los problemas relacionados con la seguridad clínica y la resistencia a antibióticos (Cushnie y Lamb, 2011).

1.6. – Compuestos fenólicos abundantes en cítricos: flavanonas.

El género *Citrus* es el cultivo de frutas más importante del mundo con una producción anual de aproximadamente 102 millones de toneladas. La naranja, la mandarina y el limón son las 3 especies del género *Citrus* más importantes. En España, Valencia y Murcia representan el 95% de las áreas productoras de alimentos del género *Citrus* (Pérez-Pérez *et al.*, 2005). En el año 2011, La Región de Murcia fue una de las comunidades españolas más productoras de naranja con una producción de 148.000 toneladas.

Numerosos estudios epidemiológicos, nutricionales y experimentales recomiendan el consumo regular de frutas y verduras, en general, y de cítricos, en particular, para la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas y para mantener una mejor calidad de vida. Además de la vitamina C, los cítricos son una importante fuente de diversos compuestos fenólicos que contribuyen a mantener un mejor estado de salud (Martí *et al.*, 2009). El zumo de naranja, por ejemplo, muestra efectos beneficiosos frente a las ECVs (Knet *et al.*, 1996; Yochum *et al.*, 1999) siendo capaz de disminuir la relación LDL/HDL en individuos sanos (Franke *et al.*, 2005). El consumo de zumo de limón se asocia con efectos protectores frente al desarrollo de cáncer, obesidad y ECVs, mientras que diversos extractos de limón se han utilizado en pacientes que presentaban defectos en la coagulación (proceso

relacionado con la aterosclerosis) (González-Molina *et al.*, 2010). Las flavanonas de los cítricos como la hesperidina, también han mostrado efectos anti-inflamatorios en modelos animales de inflamación intestinal (Crespo *et al.*, 1999; Lei *et al.*, 2009). En definitiva, los efectos beneficiosos descritos de las flavanonas de los cítricos sobre el endotelio vascular y la inflamación intestinal (Crespo *et al.*, 1999; Cayci *et al.*, 2010), convierten a estos compuestos, en un área de interés para la investigación.

1.6.1. – Principales flavanonas, estructura y presencia en cítricos.

Las flavanonas constituyen un grupo de compuestos fenólicos muy abundantes en los cítricos que se caracterizan por presentar una cadena de 3 átomos de carbono saturados y un átomo de oxígeno en el C₄. Por lo general, estos compuestos están glicosilados con un azúcar, generalmente un disacárido, en el C₇ (D'Archivio *et al.*, 2007). En los alimentos, las flavanonas se encuentran principalmente en su forma glucosídica (Silberberg *et al.*, 2006). La naringina y la neohesperidina son abundantes en los zumos de pomelo. La hesperidina y la neohesperidina se encuentran en naranjas dulces mientras que la eriocitrina y la neoeriocitrina se encuentran, a elevadas concentraciones, en zumos de limón y naranja amarga respectivamente (Merken *et al.*, 2000). En la **Figura 1.16** se presenta la estructura de las agliconas de las flavanonas, naringenina y hesperetina, así como de sus glicósidos, naringina y neohesperidina:

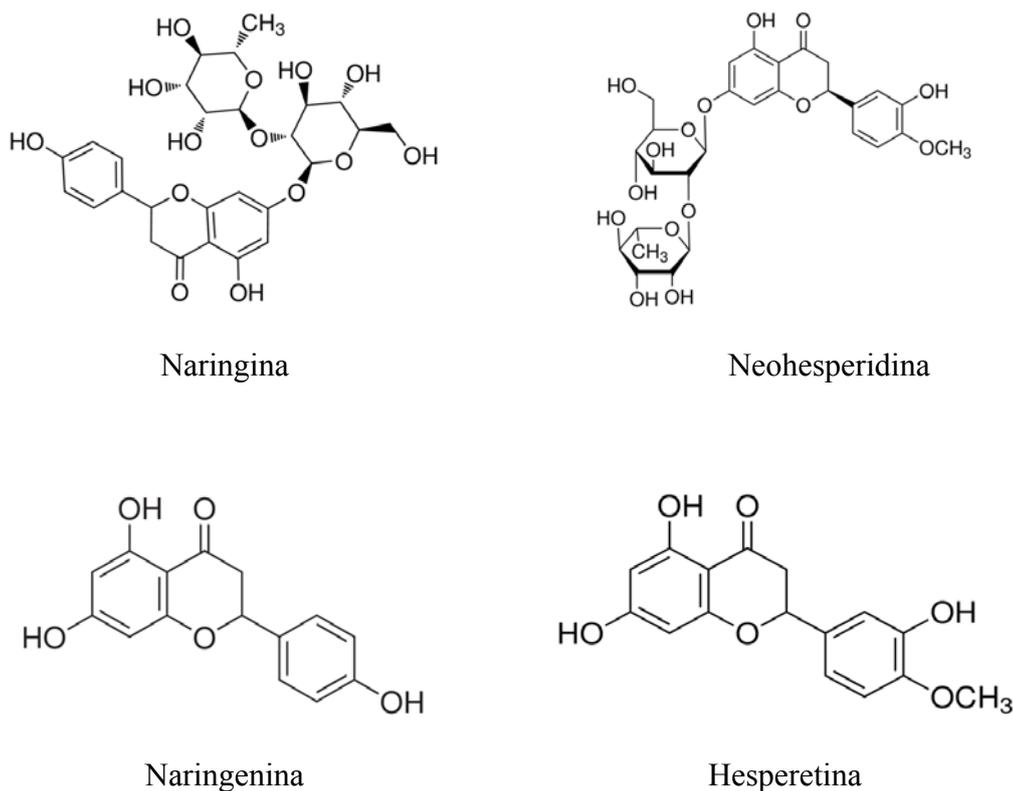


Figura. 1.14. Estructura de las agliconas, naringenina y hesperetina, y de los glucósidos, naringenina y hesperetina, presentes en los cítricos. La unión del azúcar neohesperidósido a la aglicona naringenina y de un rutinósido a la hesperetina genera los glicósidos naringina y neohesperidina respectivamente (modificado de Merken, 2000).

1.6.2. – Biodisponibilidad y metabolismo de las flavanonas.

Existen varios trabajos que han investigado el metabolismo y biodisponibilidad de las flavanonas, la formación de sus conjugados y la metabolización de las agliconas.

Absorción de las flavanonas. Estudios en ratas indican que los rutinósidos y los neohesperidósidos no se deglicosilan ni se absorben en el intestino delgado, sino que mayoritariamente llegan como tales moléculas intactas hasta el colon (Manach *et al.*, 2003). Una vez allí, la flora colónica por acción de α -ramnosidasas y β -glucosidasas, libera las agliconas que se absorben más rápidamente que los glucósidos (Espín *et al.*, 2007a). Las agliconas se glucuronidan en las células de la pared intestinal para posteriormente pasar al sistema circulatorio tanto en humanos

(Mullen *et al.*, 2008) como en ratas (Manach *et al.*, 2003). En general, al igual que ocurre con muchos otros compuestos fenólicos, la eficiencia de absorción de las flavanonas es baja, aunque esta eficiencia puede fluctuar dependiendo de la fuente y dosis consumida (Espín *et al.*, 2007a), la molécula de azúcar (Nielsen *et al.*, 2006), la degradación de las agliconas por parte de la microbiota intestinal (Manach *et al.*, 2003; Crozier *et al.*, 2009) o los sustituyentes en las posiciones 3' y 4' de las flavanonas (Mullen *et al.*, 2008; Crozier *et al.*, 2009).

Metabolismo microbiano de las flavanonas. Las agliconas de las flavanonas, pueden ser degradadas por acción de la microbiota intestinal generando ácidos fenólicos como el *p*-hidroxifenilpropiónico, *p*-cumárico o *p*-hidroxibenzóico (Manach *et al.*, 2003; El Mohsen *et al.*, 2004), los cuales pasan a la circulación enterohepática (Roowi *et al.*, 2009) y se utilizan como biomarcadores del consumo de alimentos ricos en flavanonas (Crozier *et al.*, 2009).

Circulación enterohepática. Los metabolitos absorbidos pasan por la vena porta hacia el hígado donde continúan metabolizándose mediante conjugaciones con grupos sulfato y ácido glucurónico antes de excretarse en la orina. Las concentraciones de estos metabolitos en plasma varían desde nM hasta μ M (Espín *et al.*, 2007a) aunque se han llegado a detectar concentraciones de mM en individuos que consumieron zumos enriquecidos en hesperidina y/o zumos tratados con glucosidasa (Nielsen *et al.*, 2006). En humanos, se ha visto que el tiempo que tardan las flavanonas y sus derivados conjugados en alcanzar su concentración máxima en plasma tras la ingesta se encuentra entre las 5-7 horas (Mullen *et al.*, 2008; Crozier *et al.*, 2009; Vallejo *et al.*, 2010). Estudios con ratas han mostrado que estos compuestos pueden alcanzar algunos tejidos periféricos y así se ha detectado

naringenina en cerebro, pulmones, corazón, hígado, riñón y/o bazo (El Mohsen *et al.*, 2004).

1.6.3. – Las flavanonas como compuestos anti-inflamatorios.

Las flavanonas más representativas e investigadas son las agliconas naringenina y la hesperetina junto con sus glucósidos naringina y hesperidina (**Figura 1.16**). Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* indican que estos compuestos muestran un amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas como son: capacidad antioxidante, hipocolesterolémica, hipoglucémica, actividad anticancerígena (Espín *et al.*, 2007a) y anti-inflamatoria (González *et al.*, 2011).

Anteriormente, se ha expuesto la importancia que tienen los procesos inflamatorios en el desarrollo de la aterosclerosis. El sistema inmune tiene un papel destacado en el desarrollo de esta enfermedad inflamatoria crónica, mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, adhesión de monocitos circulantes a células endoteliales, etc. Diversos estudios *in vitro* han evidenciado que algunas flavanonas podrían tener efectos antiaterogénicos. En el año 2011, Garg *et al.* observaron que la hesperidina era capaz de inhibir la liberación de histamina por parte de los basófilos. También, la naringenina es capaz de inhibir la secreción de IL-6, IL-8, IL-1 β y TNF- α en macrófagos activados por el lipopolisacárido (LPS) (González *et al.*, 2011; Bodet *et al.*, 2008), mientras que la naringina inhibe la expresión de MMP-9 inducida por TNF- α en CML vasculares (Pan *et al.*, 2010). Algunos estudios *in vivo* también indican un posible papel protector de las flavanonas en los procesos ateroscleróticos, ya que, por ejemplo, la naringenina es capaz de disminuir la expresión de CCL-2, ICAM-1 y VCAM-1 en conejos blancos “New Zealand” alimentados con una dieta rica en colesterol (Pan *et al.*, 2010).

Además, se ha observado que la hesperidina mejora la permeabilidad y la integridad del revestimiento de los capilares en pacientes que presentan desórdenes en los vasos sanguíneos y refuerza el tono venoso en pacientes con insuficiencia venosa (Garg *et al.*, 2001).

También se ha investigado el papel de las flavanonas frente a los procesos inflamatorios intestinales y se ha observado que la hesperidina ejerce efectos beneficiosos en diversos modelos experimentales de inflamación: en ratones a los cuales se les había inducido inflamación intestinal con LPS (Yeh *et al.*, 2007), en infecciones inducidas por endotoxinas (Li *et al.*, 2008), en modelos de artritis reumatoide (Li *et al.*, 2008; Kawaguchi *et al.*, 2006) y en otros modelos de inflamación intestinal. La naringina también presenta efectos moduladores positivos en casos de infección inducida por endotoxina o por LPS en ratón (Kanno *et al.*, 2006; Kawaguchi *et al.*, 2004). En la **Tabla 1.4** se resumen varios estudios que demuestran las propiedades anti-inflamatorias de las principales flavanonas:

Tabla 1.4. Efectos anti-inflamatorios de las flavanonas en modelos tanto *in vivo* como *in vitro*

Compuesto	Modelo celular	Efecto	Referencia
Hesperidina	Tejidos de granuloma	↓ producción de PGE2	Garg <i>et al.</i> , 2001
Naringina y hesperitina	Adipocitos 3T3-L1	↑ producción de adiponectina	Pan <i>et al.</i> , 2010
Hesperetina	Células de músculo liso vascular de aorta	- proliferación inducida por PDGF-BB	Pan <i>et al.</i> , 2010
	Células endoteliales (HUVEC)	↑ liberación de NO	Pan <i>et al.</i> , 2010
	Macrófagos	↓ secreción de TNF- α	González <i>et al.</i> , 2011 Comalada <i>et al.</i> , 2006
Hesperetina y hesperidina	Macrófagos Raw264.7	- expresión de COX-2 inducida por LPS	González <i>et al.</i> , 2011 Hirata <i>et al.</i> , 2005
Compuesto	Modelo animal	Efecto	Referencia
Hesperidina	Colitis inducida con TNBS en ratas	Reduce la necrosis colónica	Garg <i>et al.</i> , 2001
	Colitis inducida por DSS en ratones	↓ MPO, DAI, IL-6	Xu <i>et al.</i> , 2009
Naringina	Ratón sin LDLR	- aterosclerosis generada por dietas ricas en grasas	Pan <i>et al.</i> , 2010
Compuesto/Alimento	Grupo de Individuos	Efecto	Referencia
Zumo de naranja	13 Individuos sanos	↓ LDL/HDL	Franke <i>et al.</i> , 2005

Abreviaturas: Células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC); Dextrán sulfato sódico (DSS); Mieloperoxidasa (MPO); índice de actividad de la enfermedad (DAI); Receptor de la LDL (LDLR); Ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS); – inhibición; ↓ disminución; ↑ aumento.

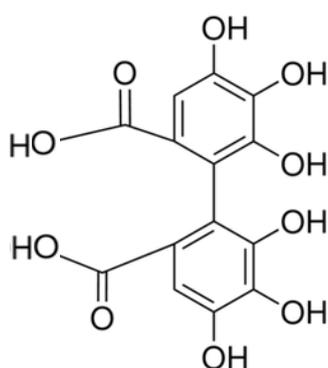
1.7. – Compuestos fenólicos abundantes en la granada: elagitaninos.

España es el mayor productor de granada de Europa superando las 25.000 toneladas en 2007 (Mena *et al.*, 2011). Esta producción se centra principalmente al sur-este de España, especialmente en Alicante y Murcia. En los últimos años, la granada ha adquirido mucha popularidad como alimento funcional y fuente de nutraceúticos. Sus efectos sobre la salud, tanto de la fruta como de sus extractos y zumos, se han estudiado en relación a distintas enfermedades crónicas. Esos estudios se han dividido en varias áreas generales como pueden ser la investigación sobre la actividad antioxidante de granada y derivados, los efectos del consumo de granada frente al desarrollo de cáncer, o sus propiedades anti-inflamatorias (Pantuck *et al.*,

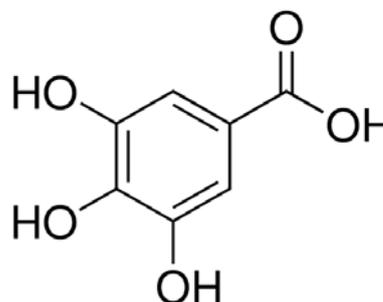
2006; Lansky *et al.*, 2007; Sartippour *et al.*, 2008; Bialonska *et al.*, 2009a; González-Sarriás *et al.*, 2010b; Johanningsmeier y Harris, 2011). Estudios clínicos han mostrado importantes resultados frente a ECVs, diabetes y cáncer de próstata. La capacidad antioxidante *in vitro* de la granada se ha atribuido a su elevado contenido en compuestos fenólicos, como la punicalagina o el EA. Estos compuestos se metabolizan durante la digestión, produciéndose una disminución de esta capacidad antioxidante (Cerdá *et al.*, 2004,2005b; Larrosa *et al.*, 2010a) lo que indica que su efecto *in vivo* pueda no deberse a sus propiedades antioxidantes.

1.7.1. – Los elagitaninos y el ácido elágico: estructuras y presencia en la granada y otros alimentos.

Los ETs son un complejo grupo de compuestos fenólicos que se caracterizan por poseer una o más moléculas de ácido hexahidroxidifénico y/o ácido gálico (Figura 1.17) esterificadas con un azúcar que normalmente es glucosa (Larrosa *et al.*, 2010a).



Ácido hexahidroxidifénico



Ácido gálico

Figura. 1.15. Estructura química del ácido hexahidroxidifénico y del ácido gálico. Estos compuestos forman di-ésteres, generalmente β -D-glucosa o ácido quínico en los ETs. El ácido hexahidroxidifénico, tras ser liberado de un ET, da lugar al EA por un proceso de lactonización.

Los ETs presentan una enorme variabilidad estructural debido a las diferentes posibilidades para la unión de los residuos de ácido hexadroxidifénico con una molécula de glucosa, y en particular debido a su fuerte tendencia a formar derivados diméricos y oligoméricos. Un ET representativo y abundante en la granada es la punicalagina (**Figura 1.18**) Los ETs pertenecen al grupo de los taninos hidrolizables debido a que en medios ácidos o básicos sufren una hidrólisis de los enlaces éster. Esta hidrólisis provoca una liberación de grupos hexahidroxidifénil que sufren una reorganización espontánea por un proceso de lactonización (ciclación y unión de puentes lactona) (Espín *et al.*, 2007b), dando lugar al EA el cual es un compuesto que presenta una solubilidad muy baja en agua (**Figura 1.18**).

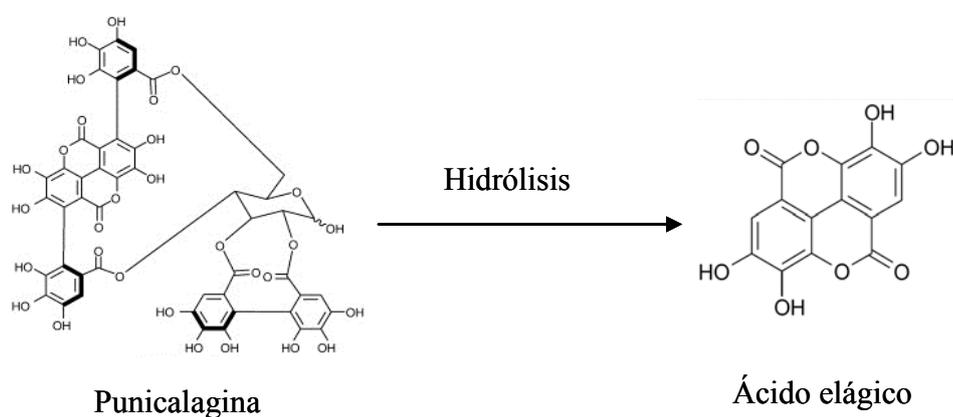


Figura 1.16. Hidrólisis de la punicalagina (ET presente en la granada) para dar EA (modificada de Larrosa *et al.*, 2010a).

Los ETs originales tienen un espectro UV bastante inespecífico, relacionado con sus residuos galoil (máxima absorción alrededor de 270 nm) y se clasifican en dos tipos:

- ETs monoméricos: son los que contienen una única molécula de glucosa. Algunos ejemplos son la punicalagina (granada), la pedunculagina, la sangüiina, vescalagina o la castalagina.

- ETs poliméricos: son aquellos que se generan por polimerización de los ETs monoméricos. Un ejemplo sería la roburina (Quideau *et al.*, 1996).

El EA (**Figura 1.18**) es un compuesto fenólico que tiene la fórmula molecular $C_{14}H_6O_8$, y tiene un espectro característico UV con dos máximos de absorción, uno a 365 nm y otro a 253 nm (González-Barrio *et al.*, 2011). El EA se puede encontrar en estado libre, en forma de derivados del EA (metilados, glicosilados o metoxilados) o como elemento estructural de los ETs.

Los ETs y el EA están presentes en muchos frutos de plantas, algunas de ellas de mucha importancia económica. En la granada, la concentración de punicalagina es de 1500-1900 mg/L (en el zumo de granada variedad Wonderful), mientras que el contenido de EA es de 35–75 mg/100 g peso fresco (Gil *et al.*, 2000). Otros alimentos que podemos destacar por su contenido en ETs y EA son los frutos secos como castañas, nueces, pistachos, avellanas y bellotas (Gonçalves *et al.*, 2010; Malik *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2001), frutos de las rosáceas como fresa, frambuesa, zarzamora (Koponen *et al.*, 2007; Aaby *et al.*, 2007; Törrönen, 2009; Bakkalbasi *et al.*, 2009) y algunas variedades de ciruela, melocotón, albaricoque, kaki, persimón y las uvas de la especie *Vitis rotundifolia*. Además, los vinos de crianza (Glabasnia and Hofmann, 2006; Clifford and Scalbert, 2000) y bebidas alcohólicas de reserva como son el brandy, coñac o el whisky (Glabasnia and Hofmann, 2006; Bakkalbasi *et al.*, 2009) son fuentes de estos compuestos.

1.7.2. – Biodisponibilidad y metabolismo de elagitaninos y ácido elágico.

La granada ha sido el alimento vegetal más utilizado en los estudios de la biodisponibilidad de los ETs, aunque este proceso también se ha estudiado en fresas, nueces, frambuesas o vinos envejecidos en barrica (Cerdá *et al.*, 2005b). Los ETs

son moléculas grandes que, por lo general, se absorben muy poco o nada. Los datos disponibles indican que los ETs de la dieta no se detectan en plasma o en otros fluidos biológicos tras la ingesta de alimentos ricos en estos compuestos. En un estudio de toxicidad con ratas, en el que se alimentó a los animales durante un largo período de tiempo con grandes cantidades de ETs de la granada, se detectaron pequeñas cantidades tanto en plasma como en orina (Cerdá *et al.*, **2003a**), sin embargo en estudios con humanos y animales modelo, no se observó presencia de estos compuestos en plasma o en orina (Cerdá *et al.*, **2005a**).

Absorción del EA. Estudios farmacocinéticos indican que el EA se puede absorber de 30-60min después de ingerir alimentos ricos en ETs (Teel y Martín *et al.*, 1988; Seeram *et al.*, **2004**). La absorción de este compuesto es baja y se detecta a bajos niveles en sangre, bilis y tejidos (Teel *et al.*, **1988**; Smart *et al.*, **1986**; Larrosa *et al.*, **2010a**) mientras que los metabolitos absorbidos se excretan por la orina (Teel *et al.*, **1988**; Espín *et al.*, **2007b**; Larrosa *et al.*, **2010a**). En plasma y tejidos, se han detectado derivados glucurónidos y metil-éster del EA y la punicalagina (concentraciones aproximadas de 0,025 μM de punicalagina) (Cerdá *et al.*, **2003a,b**). Estudios en humanos muestran una elevada variabilidad en el metabolismo de los ETs (Cerdá *et al.*, **2004**; Cerdá *et al.*, **2005b**). La determinación de la concentración de EA en el plasma de humanos, tras el consumo de zumo de granada, mostró una variación de las concentraciones de este compuesto que iban desde 0,06 hasta 0,1 μM (Seeram *et al.*, **2004**; Seeram *et al.*, **2006**). Sin embargo, en otros estudios no se detectó ni punicalagina ni EA en plasma después de haber ingerido zumo de granada (Cerdá *et al.*, **2004**, Cerdá *et al.*, **2006**). Hay estudios farmacocinéticos llevados a cabo con frambuesa en los que se observó una rápida pero pobre absorción de EA, detectándose concentraciones de

5 nM en plasma y pudiéndose detectar hasta 12 h después de la ingesta (Stoner *et al.*, 2005) contradiciendo este dato a la rápida eliminación observada en otros estudios (Seeram *et al.*, 2004).

Metabolismo microbiano. Los primeros estudios *in vivo* sobre la biodisponibilidad y metabolismo del EA y los ETs datan de los años 80. En algunos estudios con ratas se observó que el EA se absorbía rápidamente y que en las heces y orina de estos animales aparecía un metabolito designado como Uro-A (**Figura 1.19**) además de otros metabolitos. Se determinó que estos compuestos eran de origen bacteriano ya que, en animales libres de gérmenes no aparecían (Doyle *et al.*, 1980). Estos resultados se han confirmado más tarde tanto en humanos como en ratas (Cerdeja *et al.*, 2003a,b; Cerdá *et al.*, 2005a). Un estudio realizado en cerdos ibéricos alimentados con bellota de roble es en la actualidad, el más detallado sobre el metabolismo de los ETs (Espín *et al.*, 2007b). En este estudio se observó que en el yeyuno, los ETs liberan EA por acción de la microbiota intestinal y/o el pH intestinal. Este EA se metaboliza por acción de la flora intestinal produciendo secuencialmente, en la primera parte del tracto gastrointestinal, Uro-D (tetrahidroxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona), Uro-C (trihidroxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona) y Uro-A (3,8-dihidroxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona) mientras que en la región más distal del tracto gastrointestinal se continúa produciendo Uro-A y Uro-B (3-hidroxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona) (**Figura 1.19**).

En un estudio con ratas alimentadas con pienso suplementado con extracto de granada, se determinaron las concentraciones alcanzadas en colon de: i) Uro-A, 7-34 μM , ii) Uro-B, 2-65 μM , iii) Uro-C, 1,5-5,4 μM y trazas de EA (González-Sarrías *et al.*, 2009b). Una proporción de estos metabolitos bacterianos es absorbida y sufre diversas transformaciones metabólicas en intestino y principalmente en el hígado,

por acción de las enzimas de fase I (hidroxilaciones) y de fase II (metilaciones, glucuronidaciones y sulfataciones), para formar compuestos más solubles, principalmente derivados glucuronidados y metil-ésteres, que se acumulan en los tejidos o se excretan por la orina.

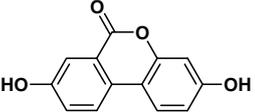
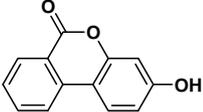
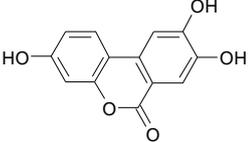
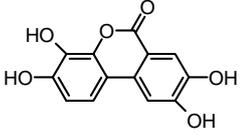
Compuesto	Estructura	Peso molecular
Urolitina-A		228
Urolitina-B		212
Urolitina-C		244
Urolitina-D		260

Fig. 1.17. Estructura y peso molecular de las urolitinas. Estas moléculas se generan por acción de la microbiota intestinal, dando lugar a la Uro-D que por una pérdida de grupos –OH secuencial, da lugar a la Uro-C, Uro-A y Uro-B (adaptada de González-Barrio, 2011).

En plasma y orina, se han detectado los metabolitos Uro-A-3-*O*-glucuronido (Uro-A-gluc), Uro-B-3-*O*-glucuronido (Uro-B-gluc) (**Figura 1.20**) y pequeñas cantidades de Uro-C-*O*-glucuronido y ácido 3,8-*O*-dimetilelágico-2-*O*-glucuronido (Espín *et al.*, 2007b; Crozier *et al.*, 2009).

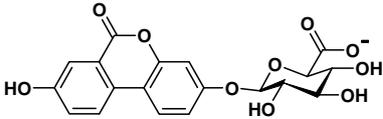
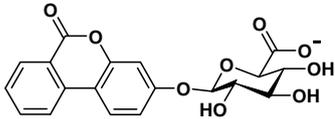
Compuesto	Estructura	Peso molecular
Urolitina-A-glucurónido		404
Urolitina-B-glucurónido		387

Fig. 1.18. Fórmula de los glucurónidos de las urolitinas, peso molecular. Estas moléculas se producen a partir de las agliconas en los colonocitos del intestino, hígado y otros órganos durante la circulación enterohepática.

La primera glucuronidación parece que tiene lugar en las células intestinales, mientras que en el hígado, los metabolitos sufren nuevas transformaciones generando diglucurónidos y/o sulfatos que posteriormente se secretan en el intestino delgado mediante la bilis (circulación enterohepática) o pasan a la circulación sanguínea, alcanzando los tejidos (González-Sarrías *et al.*, 2010b) y siendo expulsados por la orina. La **Figura 1.21** presenta un esquema resumen del metabolismo y biodisponibilidad de los ETs, EA y urolitinas.

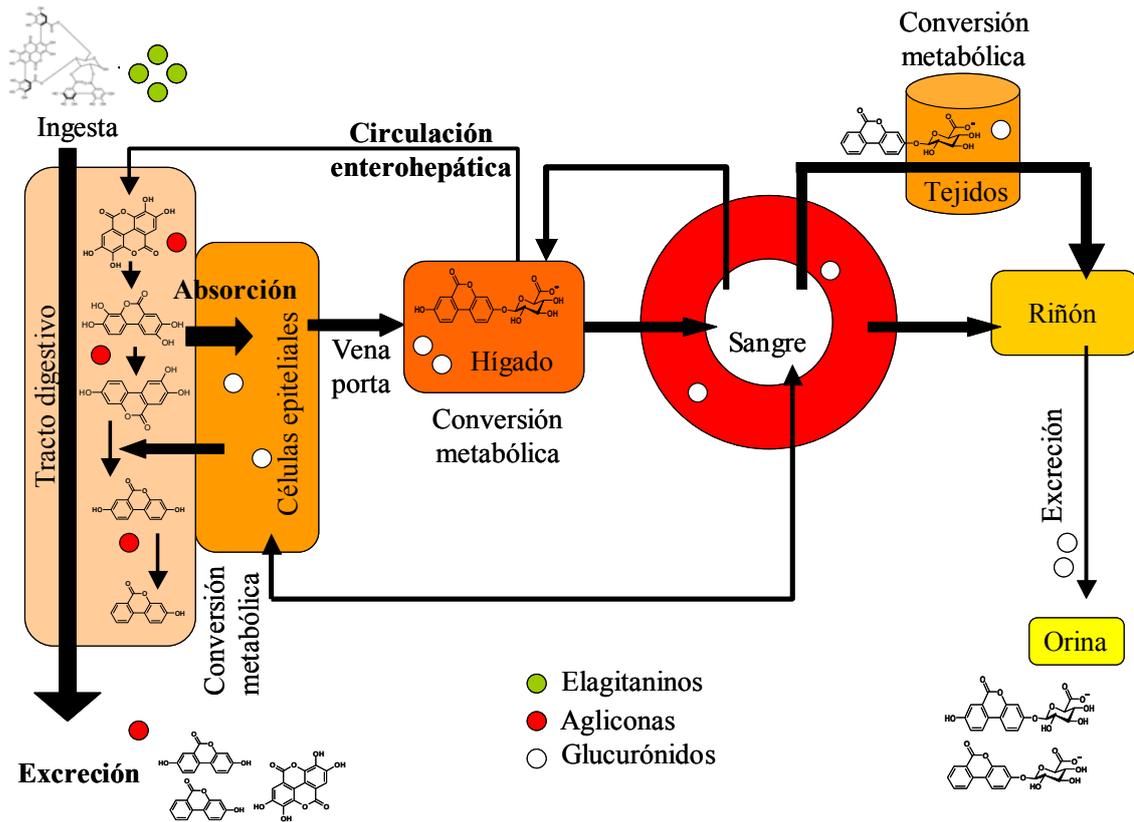


Figura 1.19. Metabolitos del EA producidos por el metabolismo bacteriano. Los ETs no se absorben como norma general y se transforman en el tracto gastrointestinal dando EA, el cual se absorbe rápidamente pero en muy pequeña proporción tanto en estómago como en intestino delgado. Este EA se transforma por acción de la microbiota del colon produciendo urolitinas que se metabolizan generando, principalmente, derivados glucuronidados que se distribuyen por los tejidos y se eliminan a través de la orina (Espín et al., 2007; Terao *et al.*, 2011).

1.7.3. – Actividad anti-inflamatoria de los ETs, EA y sus derivados metabólicos.

ETs, EA y urolitinas presentan un amplio rango de actividad biológica. Se han descrito propiedades estrogénicas y antiestrogénicas (Papoutsi *et al.*, 2005; Larrosa *et al.*, 2006a), anti-inflamatorias (Ishimoto *et al.*, 2011; González-Sarriás *et al.*, 2010a; Larrosa *et al.*, 2010b; Umesalma y Sudhandiran, 2010) y efectos antimicrobianos y prebióticos (Larrosa *et al.*, 2010b; Bialonska *et al.*, 2009b; Bialonska *et al.*, 2010). Estos compuestos, y en particular las urolitinas ejercen también efectos anti-proliferativos frente a células de cáncer de colon, regulando la

expresión de marcadores tumorales como *c-Myc*, *Ciclina B1* o *K-Ras* (González-Sarrías *et al.*, 2009a).

El papel de los ETs, EA y sus derivados metabólicos como compuestos anti-inflamatorios ha adquirido mucho interés en los últimos años. Numerosos estudios *in vitro* han explorado los efectos anti-inflamatorios de algunas de estas moléculas en relación con el proceso aterosclerótico y con la inflamación intestinal.

En la **Tabla 1.5** se recogen algunos de estos estudios:

Tabla 1.5. Resumen de algunos estudios *in vitro* que investigan las propiedades anti-inflamatorias de los ETs, EA y urolitinas

Compuesto	Modelo celular	Efecto	Referencia
EA, Uro-A y Uro-B	Inducción de COX-2 por IL-1 β en fibroblastos de colon humanos CCD18-Co	↓ expresión de COX-2 (no significativamente en el caso del EA)	González-Sarrías, <i>et al.</i> , 2010a
EA	Células endoteliales de vena umbilical humana	↓ actividad MMP-12	Huang <i>et al.</i> , 2009
	Inducción de AP-1 y proteínas quinasas por IL-1 β y TNF- α , y mitógenos respectivamente	↓ activación de AP-1 y de las proteínas quinasas	Masamune <i>et al.</i> , 2005
	Monocitos humanos	↓ producción PGE2	Karrison <i>et al.</i> , 2010
	Células endoteliales de aorta humana inflamadas con TNF- α	↓ expresión de ICAM-1 y VCAM-1	Papoutsis <i>et al.</i> , 2008
ETs y EA	Células endoteliales	Actividad anti-inflamatoria	Papoutsis <i>et al.</i> , 2008
EA y zumo de granada	HDL obtenidas de pacientes diabéticos	- oxidación de las HDL	Fuhrman <i>et al.</i> , 2010
Punicalagina y zumo de granada	Inducción de COX-2 por TNF- α en células HT-29	↓ expresión de COX-2	Lansky y Newman, 2007
Uro-A y Uro-B	Células neuroblastoma sometidas a leve estrés oxidativo	Efecto protector mediado por actividad anti-inflamatoria	Verzelloni <i>et al.</i> , 2011

Abreviaturas: Sintasa de prostaglandina 1 asociada a membrana (mPGES1); ↓ **disminución**; ↑ **aumento**; - **inhibición**.

Aunque estos estudios tienen interés a nivel mecanístico y molecular, muchos de ellos tienen menos relevancia desde el punto de vista fisiológico, debido a que no consideran las posibles transformaciones metabólicas de los compuestos *in vivo* ni

las concentraciones reales a las que se pueden encontrar en células y tejidos. Así, en la mayoría de estos trabajos se utilizan compuestos y modelos celulares que no representan la situación real *in vivo*. Solo un número minoritario de trabajos tiene en cuenta la biodisponibilidad de ETs, EA o urolitinas, utilizando modelos celulares adecuados y concentraciones representativas de modelos *in vivo* (Larrosa *et al.*, 2006b; González-Sarriás *et al.*, 2010a).

Los primeros ensayos en animales con ETs y EA datan de los años 60. Desde entonces, numerosos estudios se han llevado a cabo en los que se ha investigado las propiedades anti-inflamatorias del EA, zumo de granada, extracto de granada o nueces sobre ratas, ratones o conejos (Larrosa *et al.*, 2010a). Algunos de estos estudios, se resumen en la **Tabla 1.6**:

Tabla 1.6. Estudios *in vivo* que muestran las propiedades anti-inflamatorias de los ETs, EA y las urolitinas

Compuesto/Alimento	Modelo animal	Efecto	Referencia
EA	Ratas albinas Wistar con cáncer de colon	↓ iNOS, COX-2, IL-6 y TNF- α	Umesala y Sudhandiran, 2010
Uro-A y Uro-B	Ratas Sprague-Dawley sanas	↑ CYP1A1 en mucosa colónica	González-Sarriás <i>et al.</i> , 2009b
Extracto de granada y Uro-A	Colitis inducida con DSS en ratas Fisher F344	↓ COX-2, PGE2, iNOS y PTGES	Larrosa <i>et al.</i> , 2010b
Uro-A	Ratas con edemas producidos por carragenanos	↓ volumen de los edemas	Ishimoto <i>et al.</i> , 2010
Flores de extracto de granada	Ratas Wistar	↓ niveles de LDL, VLDL, colesterol total y TG	Bagri <i>et al.</i> , 2009
Piel de granada y extracto de piel de granada	Ratas Sprague-Dawley	Actividad hipocolesterolemica	Hossin, 2009

Abreviaturas: triglicéridos (TG); lipoproteína de muy baja densidad (VLDL); sintasa de prostaglandinas E (PTGES).

Aunque algunos estudios animales parecen indicar un efecto protector, de los ETs, EA y las urolitinas, frente a la inflamación colónica y a las ECVs, se deben tener en cuenta diversos factores: i) muchos estudios se llevan a cabo con extracto de granada que no solamente contiene compuestos fenólicos sino también fibra,

azúcares, ácidos orgánicos y otros compuestos que podrían ser responsables de parte de los efectos observados, ii) la biodisponibilidad de los compuestos es muy baja, por lo que se debe asumir que las bajas dosis tienen un efecto potente o que no se requiere de una interacción directa y iii) en algunos de estos ensayos las dosis utilizadas son mucho mayores que aquellas que son relevantes desde un punto de vista nutricional (González-Sarrías, 2009c).

A pesar de los numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* que indican que los ETs, EA y urolitinas tienen propiedades anti-inflamatorias, los resultados derivados de los estudios de intervención en humanos es mucho más limitada. Existen evidencias que indican que tanto la granada como las nueces muestran propiedades cardioprotectoras (Larrosa *et al.*, 2010a). En la **Tabla 1.7** se recogen algunos estudios en humanos que muestran propiedades anti-inflamatorias de los ETs:

Tabla 1.7. Efectos anti-inflamatorios de los ETs, EA y metabolitos derivados.

Compuesto/Alimento	Grupo de Individuos	Efecto	Referencia
Zumo grana concentrado	Pacientes diabéticos	Efectos antioxidantes en macrófagos	Rosenblat <i>et al.</i> , 2006
Nueces	Individuos con colesterol plasmático total ligeramente alto	↓ colesterol total y triglicéridos	Torabian <i>et al.</i> , 2010
	Pacientes diabéticos	↓ LDL y ↑ HDL	Tapsell <i>et al.</i> , 2004
Zumo granada concentrado o nueces	Individuos con estenosis carotídea	↓ engrosamiento de la íntima carotídea	Aviram <i>et al.</i> , 2004
	Pacientes diabéticos	Mejora de la función endotelial	Ma <i>et al.</i> , 2010

↓ **disminución**; ↑ **aumento**

Estos resultados que muestran la capacidad anti-inflamatoria de los ETs, EA y sus metabolitos derivados, las urolitinas, sugieren que estos compuestos bioactivos podrían utilizarse en la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas como la aterosclerosis o la EII. Sin embargo, son necesarios más estudios clínicos que corroboren los resultados obtenidos tanto *in vitro* como en animales. Además, futuros estudios *in vitro* deberán diseñarse minuciosamente para que los

resultados obtenidos puedan contribuir a clarificar los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos beneficiosos que se les atribuyen a estos compuestos (Cerdá, **2005c**; González-Sarrías, **2009c**; Azorín-Ortuño, **2011c**).

CAPÍTULO 2

Objetivos

2. - Objetivos

En la introducción que precede se ha expuesto que los procesos inflamatorios están asociados al desarrollo de enfermedades crónicas de alta prevalencia en la sociedad actual como son la disfunción vascular que conduce a la aterosclerosis y las inflamaciones intestinales. En dichos procesos está implicada una red compleja de moléculas mediadoras producidas a su vez por diversos elementos celulares participantes. De una parte intervienen los propios tejidos y epitelios humanos (endotelial, intestinal) que interaccionan directamente con células del sistema inmune (monocitos circulantes). De otra parte, y cada vez se le confiere un papel más importante, están las bacterias que colonizan el tracto digestivo, tanto las residentes habituales como las patógenas que accidentalmente se instalan en el intestino. La desregulación del equilibrio entre el sistema inmune humano y la flora intestinal debido a posibles infecciones con patógenos intestinales es una de las posibles causas del desarrollo de inflamación intestinal crónica. Un mayor conocimiento del papel de células y bacterias en la inflamación así como de su regulación a nivel molecular contribuirá a entender los procesos inflamatorios y, consecuentemente, la prevención de las enfermedades asociadas a ellos. En esta línea, resulta de gran interés la búsqueda de nuevos agentes naturales que ejerzan efectos moduladores en los procesos inflamatorios y/o que permitan controlar o reducir la colonización del intestino por microorganismos patógenos que alteren el equilibrio de la microbiota residente.

En la introducción, se ha abordado también el papel de la dieta como factor clave para intervenir en el desarrollo de enfermedades crónicas de base inflamatoria, previniéndolas o retrasando su aparición. Entre otros componentes, la dieta contiene una

gran cantidad y variedad de compuestos bioactivos de naturaleza fenólica que exhiben, entre otras muchas propiedades, efectos anti-inflamatorios y anti-microbianos, y cuyo consumo puede contribuir a la modulación de los procesos inflamatorios asociados con las enfermedades crónicas. En particular, numerosos estudios señalan que los compuestos fenólicos denominados flavanonas, abundantes en cítricos, y los elagitaninos (ETs), presentes en la granada, así como algunos de sus derivados metabólicos, pueden contribuir a modular procesos inflamatorios a nivel sistémico (vascular) y del tracto digestivo previniendo o retrasando la aparición de patologías como la aterosclerosis y las inflamaciones intestinales.

Dado pues el interés en investigar y ahondar en los mecanismos moleculares que son la base de las enfermedades inflamatorias y de su posible modulación por compuestos fenólicos de la dieta así como, el interés particular en el valor biosaludable de cítricos y granada en la Región de Murcia, en esta Tesis Doctoral se pretende ahondar en la investigación de las propiedades anti-inflamatorias y anti-microbianas de flavanonas y derivados metabólicos de ETs. Para el desarrollo de este trabajo se aplicarán diversos modelos celulares, bacterianos y animales con diseños experimentales apropiados en combinación con técnicas de análisis molecular múltiple como son los ‘arrays’ de expresión proteica y génica.

El presente trabajo se ha dividido en los siguientes **objetivos específicos**:

- 1. – Estudios celulares y moleculares en relación con los efectos beneficiosos de elagitaninos frente al desarrollo de aterosclerosis.**

Se investigarán los posibles efectos anti-inflamatorios de los principales metabolitos de ETs circulantes en plasma, los conjugados glucurónidos de las urolitinas, sobre un modelo celular humano de endotelio de aorta. En concreto se

estudiarán los efectos de estos metabolitos sobre: i) la adhesión de monocitos a las células endoteliales de aorta (etapa inicial clave en el desarrollo del proceso de aterosclerosis) y ii) la capacidad de las células endoteliales de aorta para migrar y proliferar (procesos fundamentales en la angiogénesis y neo-vascularización del tejido aórtico). Las respuestas celulares observadas se acompañarán de estudios moleculares a nivel de proteína para intentar esclarecer algunos de los posibles mecanismos de acción de los compuestos ensayados.

2. – Estudios celulares y moleculares en relación con los efectos beneficiosos de elagitaninos y flavanonas frente al desarrollo de procesos inflamatorios intestinales.

Se investigarán los posibles efectos anti-inflamatorios de:

i) los principales derivados de ETs presentes en el colon, urolitinas y ácido elágico (EA).

ii) un extracto natural de naranja enriquecido en flavanonas y sus componentes mayoritarios

sobre un modelo celular humano de fibroblastos de colon (células que juegan un papel esencial en la respuesta inmune del tracto digestivo). En concreto se estudiarán los efectos de estos compuestos sobre: i) la adhesión de monocitos a los fibroblastos de colon (etapa inicial de la respuesta anti-inflamatoria en la mucosa) y ii) la capacidad de los fibroblastos de colon para migrar y proliferar (procesos fundamentales en la reparación de la mucosa intestinal). Las respuestas celulares observadas se acompañarán de estudios moleculares a nivel de proteína y expresión génica para intentar esclarecer algunos de los posibles mecanismos de acción de los compuestos ensayados.

3. – Estudios celulares y moleculares en relación con los efectos de ETs y flavanonas frente a la invasión de un patógeno intestinal: efectos anti-*Quorum Sensing* (QS).

Se investigarán los posibles efectos anti-QS de:

i) los principales derivados de ETs presentes en el colon, las urolitinas

ii) un extracto natural de naranja enriquecido en flavanonas y sus componentes mayoritarios

sobre los mecanismos invasivos (QS) de *Y. enterocolitica*, patógeno gastrointestinal que puede estar implicado en el desarrollo de inflamación intestinal crónica. Se determinará la respuesta de las bacterias frente al tratamiento con dichos compuestos examinando el efecto en: i) su capacidad para sintetizar moléculas inductoras de la invasión conocidas como homoserín lactonas (AHLs), ii) motilidad y formación de biofilms, iii) regulación de algunos de los principales genes involucrados en ambos procesos.

4. – Estudio de los efectos de ETs de la dieta en un modelo animal de inflamación intestinal

En este último capítulo de la Tesis se pretende ahondar en la investigación sobre las propiedades anti-inflamatorias de un extracto de granada rico en ETs utilizando un modelo animal de inflamación intestinal. De una parte se evaluarán los posibles efectos anti-inflamatorios midiendo varios parámetros clásicos asociados con inflamación. Pero además, en este capítulo se medirán los efectos del consumo del

extracto de granada sobre los niveles fecales de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), moléculas estas con propiedades anti-inflamatorias. Por último, y dado que el desarrollo de algunos cánceres de colon esta asociado con la enfermedad inflamatoria intestinal y que los derivados de ETs exhiben propiedades anticancerígenas frente a células de cáncer de colon, en este apartado abordaremos también los efectos del consumo del extracto de granada sobre los niveles de expresión de varios genes diana implicados en el desarrollo de cáncer.

CAPÍTULO 3

Materiales y Métodos

3. - Materiales y Métodos

3.1. – Materiales.

3.1.1. – Extractos naturales y patrones comerciales.

Extracto de naranja amarga rico en flavanonas. Proporcionado por la empresa ZOSTER S.A. (Murcia, España). Polvo higroscópico marrón con una humedad aproximada del 2,1 % (se almacenó en un desecador a temperatura ambiente) y el siguiente contenido indicado de flavanonas: 25,1 % naringina, 11,4 % neohesperidina, 1,5 % hesperidina, 0,4 % naringenina y hesperetina, 0,2 % isosakuranetina y 8,7 % otros (total flavonoides: 47,7 % en peso).

Extracto de granada. Proporcionado por la empresa Nutracitrus S.L. (Elche, España). La composición del extracto es de un 35 % de punicalaginas, 13 % punicalina, 4,5 % de ácido elágico (EA) glucósido y un 8,9 % de EA libre.

Patrones. Flavanonas: Naringina (naringenina-7-O-neohesperidósido), hesperidina (hesperetina-7-O-rutinósido), neohesperidina (hesperetina-7-O-neohesperidósido), naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona), hesperetina (3',5,7-trihidroxi-4'-methoxy flavanona), isosakuranetina (5,7-dihidroxi-4'-methoxyflavanona) y el cinamaldehído de Extrasynthese (Genay, Francia). Urolitinas: Urolitina-A (Uro-A; 3,8-dihidroxi-dibenzo-piran-6-ona), Urolitina-B (Uro-B; 3-hidroxi-dibenzo-piran-6-ona) sintetizados por la empresa Kyolab S.A. (Murcia, España) y Uro-B-Glucurónido (Uro-B-gluc; 3-hidroxi-6H-dibenzo-piran-6-ona glucurónido), sintetizado de acuerdo a Lucas *et al.* (2010). El EA se obtuvo fue proporcionado por Sigma Aldrich. Se prepararon soluciones stock de las flavanonas y de las urolitinas en dimetil sulfóxido (DMSO) que se conservaron a -20 °C. Estas soluciones stock se

adicionaron a los medios de cultivo a las concentraciones deseadas para cada ensayo siendo la concentración de DMSO <0,5 %. El glucurónido de la Uro-A (Uro-A-gluc; 3,8-dihidroxi-dibenzo-piran-6-ona glucurónido) se obtuvo por síntesis enzimática (capítulo 4, **apartado 2.2**). Lactonas: La *N*-hexanoil-DL-homoserín lactona (C6-HSL, ≥ 97 %, HPLC) y *N*-(3-oxo hexanoil)-DL-homoserín lactona (3-oxo-C6-HSL, ≥ 97 %, HPLC) se obtuvieron de Sigma (San Louis, MO, EEUU). Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs): ácido acético (C₂), ácido propiónico (C₃), ácido isobutírico (i-C₄), ácido butírico (C₄), ácido isovalérico (i-C₅), ácido valérico (C₅) y ácido 4-metil-valérico de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

3.1.2. – Otros reactivos generales.

Pepsina porcina (pepsin A, EC 3.4.23.1), pancreatina porcina (4 g/L, 1.6×10^{-3} U.S. Pharmacopeia (USP) especificaciones), sales biliares (25 g/L, mezcla de sodio colato y sodio deoxicolato), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) humano, calceína-AM, lipopolisacárido (LPS), bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), albúmina sérica bovina (BSA), 1,1,3,3,-tetraetoxipropano (TEP), que la sal disódica del difosfato de uridina-5 (UDP), la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), la *o*-dianisidina, el hexadecil-trimetil-amonio (HETAB) y forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La ketamina y la xilazina se obtuvieron de Merial Laboratorios (Barcelona, España) y Calier Laboratorios (Barcelona, España), respectivamente. El inhibidor de proteasas fue proporcionado por Roche (Mannheim, Alemania). La enzima recombinante humana UDP glucuronosil transferasa 1, polipéptido A1 (UGT1A1) se obtuvo de BD Gentest (Woburn, MA). La empresa Calbiochem suministró la interleukina 1 β (IL-1 β). Los disolventes orgánicos: metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetato de etilo y acetonitrilo (ACN) se obtuvieron de

Merck. El DMSO, ácido fórmico, dietil-éter y ácido *o*-fosfórico se obtuvieron de Panreac. El tampón fosfato salino (PBS) se compró a Fisher Scientific. El dextrán sulfato sódico (DSS) 36000-50000 fue suministrado por MP Biomedicals (Illkirch, Francia). En todos los experimentos se usó agua ultra pura obtenida por el sistema Milli-Q (Millipore).

3.2. – Cultivos celulares.

3.2.1. – Cultivos celulares eucariotas.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han utilizado tres líneas celulares: i) línea de fibroblastos de colon CCD18-Co obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC número CRL-1459) (Rockville, MD, EEUU), ii) línea de células endoteliales de aorta humana (HAECs) adquirida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Salisbury, Reino Unido) y iii) la línea monocítica de leucemia humana (THP-1) obtenida de la ECACC (número: 88081201) (Salisbury, Reino Unido).

3.2.1.1. – Miofibroblastos de colon humano. Línea CCD18-Co.

La línea CCD18-Co (**Figura 3.1**) son células adherentes con morfología fibroblástica que proceden de tejido normal de colon. Estas células llegan a senescencia al alcanzar un PDL (tiempo de duplicación de la población) de 42. Todos los ensayos se han realizado con células cuyo PDL se encontraba entre 30-36.

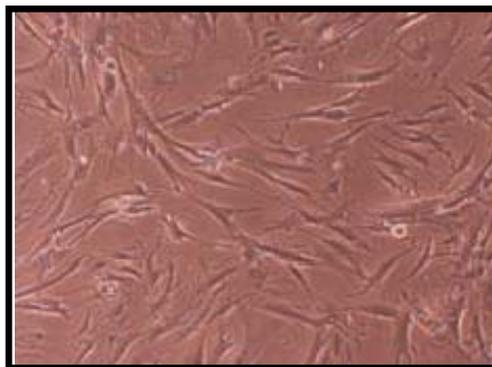


Figura 3.1. Miofibroblastos de colon humanos CCD-18Co.

3.2.1.1.1. – Mantenimiento de la línea CCD18-Co.

Los miofibroblastos de colon CCD18-Co se cultivaron en medio de cultivo EMEM suplementado con 2 mM L-glutamina, 0,1 mM aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato sódico, 1,5 g/L bicarbonato sódico, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina (Gibco, Invitrogen S.A., Barcelona, España), 10 % v/v de suero bovino fetal (SBF), a pH 7,2–7,4 y se mantuvieron a 37 °C con un 5 % de CO₂ y una humedad relativa (HR) constante del 95 %.

3.2.1.1.2. – Subcultivo de la línea CCD-18Co.

Las células se cultivaron a una densidad de 6000 células/cm² en frascos de 75 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca), el medio de cultivo se renovó cada 2 ó 3 días. Estas células se subcultivaron entre 5 y 7 días siguientes a la siembra, cuando alcanzaron una confluencia del 80 % o superior. Para el subcultivo, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS. Tras la retirada del PBS se adicionaron 3 mL de tripsina-EDTA al 0,25 %-0,03 %, se dejaron de 3 a 5 min a 37 °C y una vez las células se despegaron de la superficie del frasco se adicionó medio de cultivo con SBF para detener la reacción de tripsinización. Las células se centrifugaron a 125 × g durante 10 min, se resuspendieron en medio fresco, se determinó el número de células en

cámara de Neubauer (**apartado 3.2.3.1**) y se sembraron a una densidad de 6000 células/cm².

3.2.1.2.– Células endoteliales de aorta humana (HAEC).

La línea HAECs (**Figura 3.2**) son células adherentes procedentes de endotelio de aorta humana sana obtenidas de un cultivo primario de vida corta cuya senescencia se alcanza en el PDL 15.

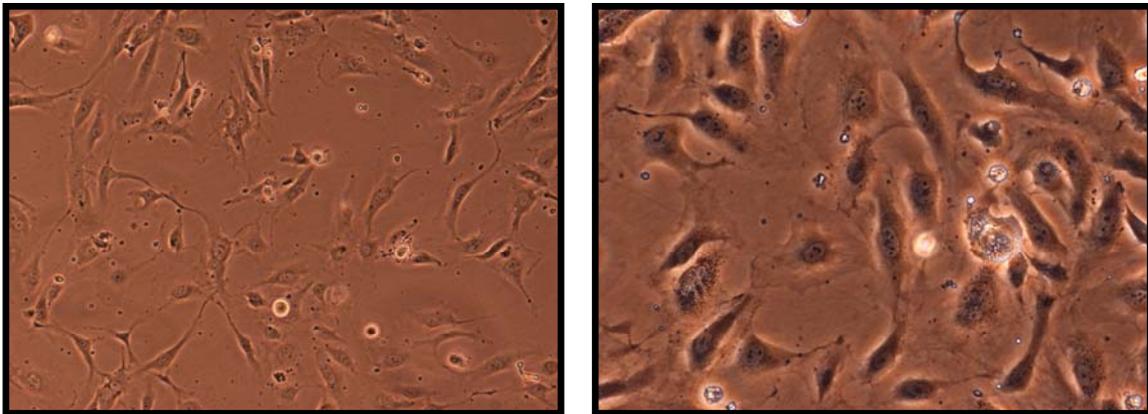


Figura 3.2. Células endoteliales de aorta humana. Representación de las células en cultivo a 10X (izquierda) y a 20X (derecha).

3.2.1.2.1. – Mantenimiento de la línea de células HAECs.

La línea HAECs se cultivó en un medio de composición definida. Tanto las células como el medio de cultivo se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (EACC, Salisbury, Reino Unido). Las células se sembraron en frascos de 25 cm², a una densidad de 1x10⁴ células/cm² y el medio de cultivo se renovó cada dos días. Las células se mantuvieron en cultivo hasta el pase 7. Las condiciones de mantenimiento son las mismas que las descritas para la línea CCD18-Co.

3.2.1.2.2. – Subcultivo de la línea HAECs.

Las células se subcultivaron al alcanzar más de un 80 % de confluencia. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron con tampón de Hank (HBSS) y se adicionó tripsina de composición definida a 37 °C controlando visualmente el proceso de tripsinización. Cuando las células adquirieron una morfología redondeada se golpeó suavemente el frasco de cultivo para favorecer la separación de las células y se adicionó una solución neutralizadora de la tripsina. Estas células se transfirieron a un tubo estéril y se centrifugaron a $220 \times g$ durante 5 min, se realizó un recuento en cámara de Neubauer (**apartado 3.2.3.1**) y se subcultivaron en un frasco de 25 cm^2 a una densidad de 1×10^4 células/ cm^2 .

3.2.1.3.– Células monocíticas de leucemia humana (THP-1).

La línea monocítica humana THP-1 (**Figura 3.3**) son células procedentes de un paciente con leucemia monocítica que crecen en suspensión. Son células que se caracterizan por su capacidad para diferenciarse a macrófagos tras ser estimuladas con varios tipos de tratamientos.



Figura 3.3. Monocitos THP-1 de leucemia humana.

3.2.1.3.1. – Mantenimiento y subcultivo de la línea THP-1.

Los monocitos THP-1 se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 2 mM, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomina (Gibco, Invitrogen S.A., Barcelona, España) y 10 % v/v SBF. Las condiciones de cultivo son las mismas que para la línea celular CCD-18Co (**apartado 3.2.2.1.1**). Las células se cultivaron a una densidad de $3-5 \times 10^5$ células/mL en frascos de 25 ó 75 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca), subcultivándose cada dos días y no dejando que su concentración en medio de cultivo superase las 8×10^5 células/mL. Una vez alcanzada esta concentración, las células se centrifugaron a $150 \times g$ durante 5 min, se resuspendieron en medio RPMI fresco y se hizo un recuento en la cámara de Neubauer (**apartado 3.2.3.1**) para volver a cultivar a la concentración de $3-5 \times 10^5$ células/mL.

3.2.1.3.2. – Tinción de monocitos THP-1 con calceína.

La calceína-AM es un éster lipofílico no fluorescente que penetra fácilmente la membrana celular. Al entrar en el citoplasma reacciona con esterasas no específicas del citosol generando calceína, la cual es un alcohol hidrofílico que queda retenido en el citosol emitiendo fluorescencia (Tenopoulou *et al.*, 2007). Los monocitos THP-1 se transfirieron a un tubo y se centrifugaron a $150 \times g$ durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2-3 mL de medio de cultivo para contarlas con la técnica del azul tripán (**apartado 3.2.3.1**). Una vez contadas, se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/mL en PBS para posteriormente incubarlas con calceína a una concentración final de 5 µM (<0,5 % DMSO v/v) a 37 °C durante 30 min. Se volvieron a centrifugar y se retiró el sobrenadante para lavar el *pellet* con PBS estéril repitiendo este proceso de centrifugación y lavado de 2 a 3 veces.

3.2.1.3.3. – Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

La exposición de monocitos a PMA induce su diferenciación a macrófagos (**Figura 3.4**) (Kohro *et al.*, 2004). En este proceso, las células se prepararon a una concentración $3,5 \times 10^5$ células/mL, se trataron con PMA a una concentración final de 100 nM (<0,5 % DMSO v/v) y se incubaron en placas de 96 pocillos, a 37 °C durante 3 días en medio de cultivo RPMI 1640.

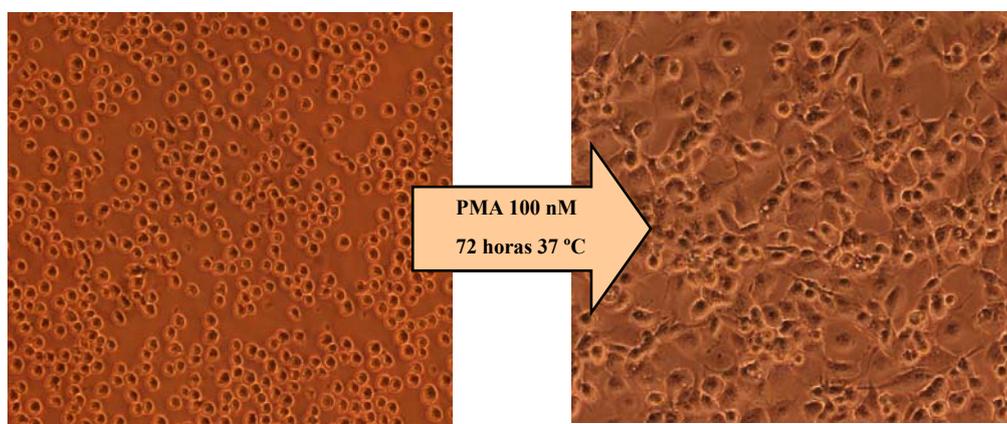


Figura 3.4. Diferenciación de monocitos a macrófagos.

Pasado ese tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS 3 veces y los macrófagos obtenidos se utilizaron en diversos ensayos.

3.2.2. – Ensayos de proliferación y viabilidad celular.

3.2.2.1. – Recuento de células vivas con azul tripán. Microscopía óptica.

El azul tripán (Sigma) es un colorante vital que tiñe las células muertas pero no las vivas, lo que permite medir tanto la viabilidad como la densidad celular. El recuento se realizó en una cámara de Neubauer, la cual contiene en el centro una cuadrícula marcada con dimensiones de 3×3 que nos permite contar las células totales (x) a partir de las cuales se obtiene la concentración de la suspensión celular.

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/mL de suspensión} = (x \times 10^4)/4$$

3.2.2.2. – Ensayo de MTT

El ensayo de MTT es una técnica basada en la reducción del MTT a cristales de formazano por la acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas. La cantidad de formazano que se produce es directamente proporcional al número de células viables. Los cristales de formazano generados, se solubilizan (en disolventes orgánicos como DMSO) y se determina el aumento o disminución de células viables mediante la medida de absorbancia a 570nm (A_{570}) tomando como referencia A_{690} (van Merlo *et al.*, 2011). Este ensayo se ha utilizado para determinar los efectos citotóxicos de los compuestos fenólicos objeto de estudio en los miofibroblastos CCD18-Co y en las células endoteliales HAECs.

3.2.3. – Ensayo de migración celular (reparación de tejidos / *wound healing*).

El ensayo de migración celular es una técnica en la que se induce un daño (rasgando la superficie confluyente) a las células en cultivo y se mide la capacidad de dichas células para moverse hacia la zona dañada y repararla. Permite evaluar la capacidad de numerosos compuestos de influenciar la migración celular. En nuestro estudio, una vez que los miofibroblastos de colon CCD18-Co o las células endoteliales HAECs alcanzaron la confluencia, se raspó horizontalmente la superficie celular con una punta de pipeta estéril.

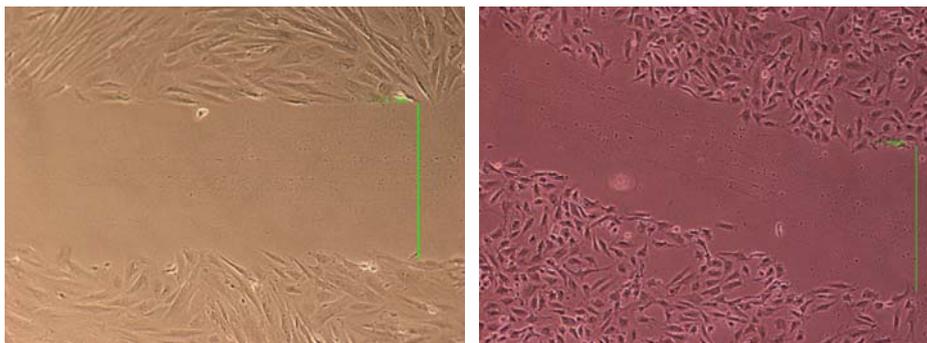


Figura 3.5. Imagen tomada a tiempo 0 de las células raspadas con una punta de pipeta. Una vez que los miofibroblastos de colon CCD18-Co (izquierda) o las células endoteliales HAECs (derecha) alcanzan la confluencia, se raspan y se estudia su capacidad para migrar.

El medio de cultivo, las células disgregadas y los restos celulares generados se aspiraron con una bomba de vacío y se lavaron dos veces con PBS (CCD18-Co) o solución de Hank (HAECs). A los miofibroblastos de colon se les adicionó medio de cultivo con los compuestos fenólicos a ensayar: i) urolitinas y/o EA; ii) extracto de naranja amarga y iii) flavanonas, en presencia o ausencia de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β o TNF- α . Las HAECs se trataron con Uro-A, Uro-B y sus respectivos glucurónidos en presencia o ausencia de TNF- α . Las concentraciones específicas utilizadas (rango μ molar) están indicadas en los capítulos correspondientes. Se tomaron fotografías a tiempo 0, 24 h y 48 h en el caso de los miofibroblastos de colon CCD18-Co, y a 4 h, 8 h y 12 h en el caso de las HAECs. De forma paralela, las células control se trataron con cantidades equivalentes de DMSO ($\leq 0,5$ % v/v). El ensayo se repitió un mínimo de 3 veces (3 réplicas biológicas en días distintos) y en cada réplica biológica, cada uno de los tratamientos se realizó por duplicado en 2 pocillos distintos como se indica en la **Figura 3.6**.

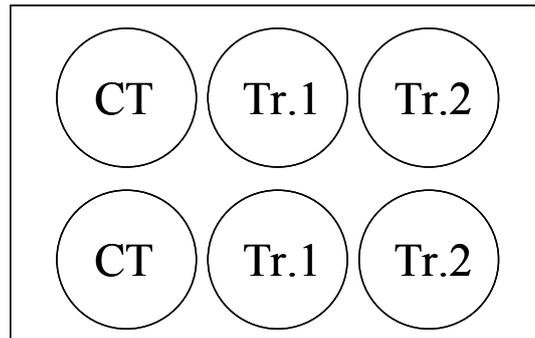


Figura 3.6. Esquema simplificado de una placa en la que se realizó el ensayo de migración celular con miofibroblastos de colon CCD18-Co o HAECs. Cada uno de los tratamientos se realizó por duplicado (2 pocillos) en cada réplica biológica. Abreviaturas: Control (CT); Tratamiento 1 (Tr. 1); Tratamiento 2 (Tr. 2).

Se tomaron 2-3 fotografías de cada pocillo con un microscopio Nikon Diaphot-TMD (Tokio, Japón). Para determinar la distancia recorrida por las células, las fotografías se analizaron con el programa de análisis de imagen MIP4 (*Consulting image digital*, Barcelona, España), tomando 10 medidas (μm) de cada fotografía y determinando la distancia que separaba a los dos grupos de células que están a ambos lados de la superficie raspada (**Figura 3.7**).

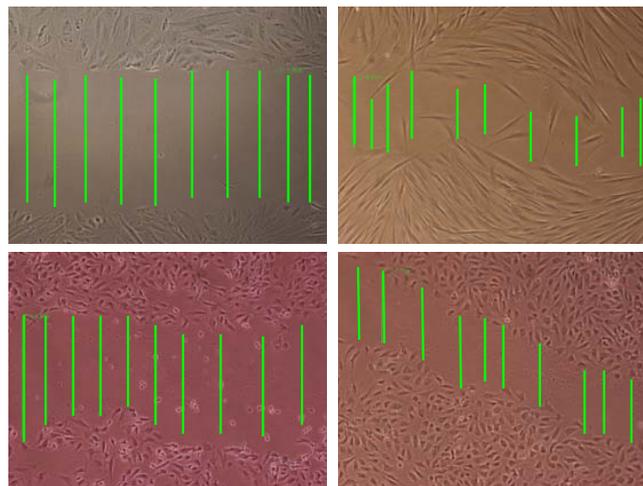


Figura 3.7. Cuantificación con el programa de análisis de imagen MIP4 de la distancia recorrida por las células. Cada fotografía corresponde a un pocillo (de cada pocillo se toman 2-3 fotos) y cada línea verde es una medida de la distancia entre los grupos de células situados a ambos lados de la superficie raspada. En la imagen se pueden ver los miofibroblastos de colon CCD18-Co (superior izquierda) y las células endoteliales HAECs (inferior izquierda) a tiempo 0. Las fotografías de la derecha corresponden a los miofibroblastos a las 48 h (superior derecha) y las HAECs a las 8 h (inferior derecha).

Una vez tomadas las medidas, se realizó la media aritmética para cada tratamiento y se restó a la media inicial (tiempo 0) de forma que se obtuvo la distancia recorrida en μm a los distintos tiempos estudiados.

$$\boxed{\bar{X}_{dt} - \bar{X}_{d0} = \text{Distancia recorrida}}$$

Figura 3.8. Fórmula utilizada para determinar la distancia recorrida por las células. Se resta la distancia recorrida a los tiempos estudiados a la distancia inicial (tiempo 0). Abreviaturas: \bar{X}_{dt} es la media aritmética de la distancia recorrida al tiempo objeto de estudio; \bar{X}_{d0} es la media aritmética de la distancia recorrida a tiempo 0.

3.2.4. – Ensayo de adhesión de monocitos.

Para el estudio de adhesión de monocitos a las células endoteliales HAECs o a miofibroblastos de colon CCD18-Co, se utilizaron los monocitos de leucemia humana (THP-1) (**apartado 3.2.2.3**) que se tiñeron con calceína (**apartado 3.2.2.3.2**). Las células endoteliales HAECs o los miofibroblastos CCD18-Co se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 y $12,5 \times 10^4$ células/pocillo, respectivamente, y se dejaron crecer hasta confluencia. Los miofibroblastos de colon CCD18-Co se trataron con los mismos compuestos y las mismas citoquinas pro-inflamatorias que se han descrito en la migración celular, mientras que las células endoteliales HAECs se trataron con Uro-A, Uro-B y sus glucurónidos en presencia de TNF- α . Las concentraciones utilizadas están especificadas en los capítulos correspondientes. Tras el tratamiento, los miofibroblastos de colon o las células endoteliales HAECs se lavaron 2 veces con PBS o HBSS y se co-incubaron con los monocitos teñidos con calceína (2×10^5 células/pocillo) en oscuridad durante 1 h a 37 °C. Los monocitos no adheridos se eliminaron mediante 2-3 lavados con PBS o HBSS y posteriormente se midió la fluorescencia en un lector de placas (Fluostar Galaxy, BMG Lab. Technologies v5.0) utilizando 492 nm como longitud de onda de excitación y 520 nm como longitud de

onda de emisión. La medida de fluorescencia es proporcional a la cantidad de monocitos adheridos.

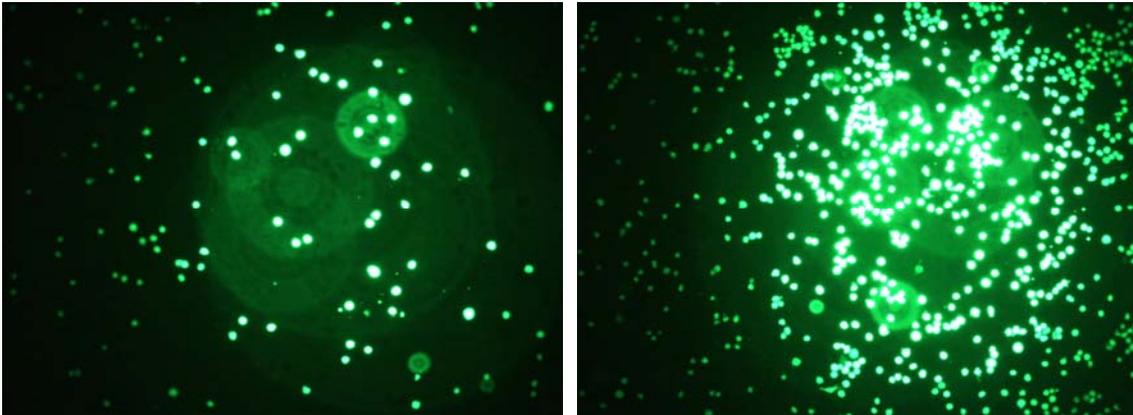


Figura 3.9. Fluorescencia emitida por los monocitos de leucemia humana (THP-1) adheridos a las células endoteliales HAECs en células control (izquierda) y en células inflamadas (derecha).

3.2.5. – Cultivos celulares procariotas.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han utilizado dos líneas de células procariotas: *Yersinia enterocolitica* (CECT 4315) y *Chromobacterium violaceum* (CECT 494) las cuales se han obtenido de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España).

- ***Y. enterocolitica.*** Microorganismo Gram-negativo enteropatógeno de humanos y roedores que causa infecciones gastrointestinales tras el consumo de alimentos contaminados (Hoffmann *et al.*, 2004).

- ***C. violaceum.*** Microorganismo Gram-negativo generalmente no patógeno que se utilizó para estudiar la actividad antimicrobiana y anti-*quorum sensing* (*QS*) de compuestos de interés (Duran *et al.*, 2010). Este microorganismo produce el pigmento violaceína en un mecanismo regulado por *QS*, lo que permite evaluar la capacidad anti-*QS* de numerosos compuestos, determinando la inhibición de la producción del pigmento por parte de éstos.

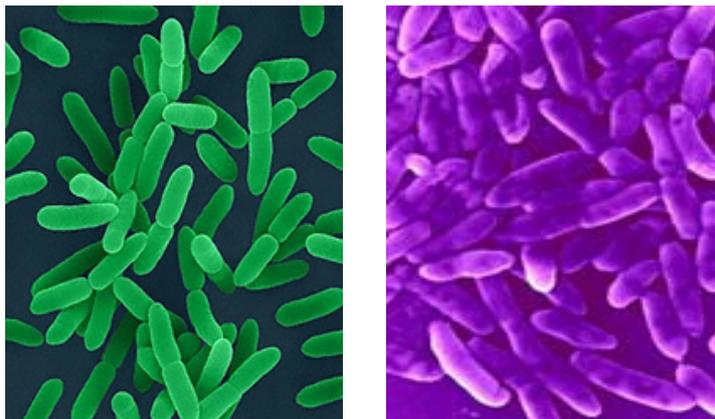


Figura 3.10. Imágenes de *Y. enterocolitica* (izquierda) y de *C. violaceum* (derecha).

3.2.5.1. – Mantenimiento de los microorganismos.

Estas cepas se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio de cultivo Luria-Bertani broth (02-385, LB broth acc. To MILLER, Scharlau Chemie, S.A., Barcelona, España) suplementado con un 30 % de glicerol. Una vez descongeladas, ambas cepas se cultivaron en medio LB a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones aeróbicas en agitación durante 24 h y con un pH entre 6,92-6,99.

3.2.5.2.– Análisis del crecimiento microbiano.

Para el análisis del crecimiento bacteriano, *Y. enterocolitica* se diluyó en agua de peptona (Scharlau Chemie, S.A.) hasta una concentración de 10^2 - 10^3 unidades formadoras de colonias (UCF)/mL que se corresponde con una densidad óptica de 0,08 medida a 600nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$). La bacteria se incubó en una placa de 96 pocillos estéril (Nalge, Nunc International, Rochester, NY, EEUU) y se dejó crecer en un volumen final de 200 μL /pocillo. Las placas se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y/o $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación continua y se midió la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ cada hora durante 48 h utilizando un lector de placas Infinite® M200 (Tecan, Grödig, Austria). La curva de crecimiento se obtuvo representando los valores de densidad óptica respecto al tiempo y a partir de la curva se determinó la fase de adaptación, la fase exponencial y la fase de latencia.

3.2.5.3.– Ensayo de inhibición del crecimiento microbiano.

La actividad antimicrobiana de las urolitinas frente a *Y. enterocolitica* se evaluó inoculado con 10µL de medio de cultivo con la bacteria (10^8 - 10^9) en 10 mL de medio LB, en ausencia o presencia de las urolitinas (4µM) durante 24h. Se tomó 1 mL de medio de cultivo con la bacteria y se diluyó (1:10) en agua de peptona estéril tamponada al 1 % (Laboratorios AES, Combourg, Francia). Posteriormente, las muestras diluidas en agua de peptona se sembraron en placas de agar LB (1 %) a las diluciones adecuadas para realizar los recuentos.

3.2.5.4. – Subcultivo de los microorganismos.

Tras 24 horas en las condiciones descritas en el **apartado 3.2.1.1** y, una vez que las células alcanzaron una concentración de 10^8 - 10^9 UFC/mL, se subcultivaron con un asa de siembra poniendo un volumen de 10 µL en 5 mL de medio de cultivo LB, obteniendo una concentración inicial de 10^2 - 10^3 UFC/mL.

3.2.5.5. – Ensayo de violaceína.

Para determinar el posible efecto anti-*QS* de los compuestos y extractos estudiados (urolitinas, flavanonas y extracto de naranja amarga), se estudió la capacidad de estos compuestos para reducir la producción de violaceína por *C. violaceum* (Truchado *et al.*, 2009b). Los *stocks* de Uro-A, Uro-B, flavanonas (DMSO) y extracto de naranja (H₂O:DMSO, 4:1) se filtraron utilizando filtros estériles Millex-GP de 0,22 µm (Millipore Corp., EEUU) y se adicionaron al medio de cultivo para obtener las concentraciones deseadas, siendo la concentración de DMSO <0,5 % (v/v) en todos los ensayos. Posteriormente, se tomaron 10 mL de medio LB, se inocularon con 10 µL de *C. violaceum* después de 24 h en cultivo y se incubaron con los compuestos de interés

durante 24 h. Después, se centrifugó 1 mL de medio de cultivo a $19314 \times g$ durante 10 min (Centrífuga Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para precipitar la violaceína insoluble. Se descartó el sobrenadante, se adicionó 1 mL de DMSO y se agitó vigorosamente en vórtex para disolver el pigmento. Por último, se eliminaron las células por centrifugación ($19314 \times g$ durante 10 min) y se cuantificó la violaceína a una DO_{585} utilizando un espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV-visible) (Shimadzu, UV-1603, Tokyo, Japón).

3.2.5.6. – Formación de biopelículas.

El efecto de urolitinas, flavanonas y extracto de naranja amarga en la formación de biopelículas por *Y. enterocolitica* se evaluó utilizando el ensayo de cristal violeta (Girenavar *et al.*, 2008) con algunas modificaciones (Truchado *et al.*, 2009b). En una placa estéril de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo (Nalge Nunc Internacional, Rochester, NY, EEUU) se adicionaron 160 μL de medio LB con 20 μL de nuestros compuestos (a la concentración final deseada) y otros 20 μL de *Y. enterocolitica* (10^6 UFC/mL) diluida en agua de peptona tamponada. En los controles positivos se adicionaron 20 μL de agua estéril con una cantidad equivalente de DMSO (<0,5 %) en lugar de los compuestos, mientras que en los negativos se añadieron 40 μL de agua estéril. Tras 24 h de incubación, se extrajo el medio de los pocillos y se lavaron 3 veces con agua estéril. La biopelícula formada se fijó con 200 μL de MeOH acidificado (33 % de ácido acético v/v) durante 15 min. Una vez fijada, se retiró el MeOH acidificado y se adicionaron 125 μL de cristal violeta durante 15 min que se solubilizaron con 200 μL de EtOH al 95 % midiendo la DO_{570} en un espectrofotómetro (Synoptics, Cambrige, UK) (Truchado *et al.*, 2009a).

3.2.5.7. – Motilidad bacteriana: Tipo natación y tipo emjambre.

El desplazamiento de las bacterias sobre los medios de cultivo sólidos puede tener lugar por diversos mecanismos, entre los cuales se incluyen la migración “tipo natación” (en inglés se conoce como *swimming*) y tipo “emjambre” (*swarming*). Para medir la migración de *Y. enterocolitica* por estos dos procesos, se siguió el método publicado por Atkinson *et al.* en **2006(a)** con algunas modificaciones. Placas de agar LB semisólido (1 % triptona; 10 mM de glucosa) con un 0,3 % de Bacto agar (Difco, Detroit, MI, EEUU) para la motilidad tipo natación y un 0,35 % para el tipo emjambre, se inocularon poniendo 1 μ L de cultivo de *Y. enterocolitica* (10^8 - 10^9 UFC/mL) en el centro de cada placa, penetrando levemente la superficie en el caso del tipo natación y dejando el inóculo en la superficie en el caso del tipo emjambre. Las placas se incubaron en presencia y ausencia de los compuestos fenólicos a 25 °C durante 24 h y al final del período de incubación, la distancia recorrida se determinó utilizando un sistema de imagen de cámara de contraste (Synoptics, Cambridge, Reino Unido).

3.2.5.8. – Análisis de las AHLs producidas por *Y. enterocolitica*. Efectos inhibitorios de los compuestos fenólicos.

Para determinar el efecto inhibitorio específico de urolitinas, flavanonas y extracto de naranja amarga sobre la producción de AHLs en *Y. enterocolitica*, se inocularon 50 mL de medio LB con 100 μ L de *Y. enterocolitica*, (10^8 - 10^9 UFC/mL) tanto en presencia como en ausencia de los compuestos fenólicos y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Tras la incubación, las bacterias se eliminaron por centrifugación ($9632 \times g$ durante 15 min a 4 °C), el sobrenadante se filtró (0,22 μ m) y se extrajo dos veces con 50 mL de acetato de etilo acidificado (0,5 % de ácido fórmico v/v). La fase orgánica se evaporó en condiciones de presión reducida a 35 °C y finalmente el residuo se

resuspendió en 2 mL de MeOH, el cual se evaporó en un concentrador Speedvac® (Savant SPD 121P, Waltham, MA, EEUU) quedando un residuo que se resuspendió en 400 µL de MeOH. Esta última disolución se filtró (0,45 µm) y se congeló a -20 °C hasta su análisis por HPLC-MS/MS en las condiciones indicadas en el **apartado 3.5.3.1** (Morin *et al.*, 2003; Truchado *et al.*, 2009a) para determinar los niveles de las AHLs.

3.3. – Modelos animales.

3.3.1. – Mantenimiento de los animales de laboratorio.

En la presente Tesis Doctoral, todos los ensayos con animales se ajustaron a las directrices y normas marcadas por La Unión Europea en materia de investigación con animales de experimentación (Directiva del Consejo Europeo 86/609/EC). Además, el Comité Ético y el Gobierno Local aprobaron todos los protocolos utilizados.

Los animales se obtuvieron de Harlan Ibérica S.A. (Barcelona, España) y se mantuvieron en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia (España) en condiciones óptimas de temperatura controlada (22 ± 2 °C), humedad relativa (55 ± 10 %) y ciclos controlados de luz-oscuridad (12 h luz/oscuridad). Se alimentaron con una dieta estándar para roedores (Panlab, Barcelona, España) cuya composición es: 14,5 % de proteínas, 63,9 % de hidratos de carbono y un 4 % de grasas. Tanto la dieta sólida como el agua se administraron *ad libitum*. Para los ensayos se utilizan animales de especie y calidad apropiadas utilizándose el número mínimo requerido para obtener resultados estadísticamente válidos. Los dos modelos de rata que se utilizaron en nuestros estudios son:

Ratas Sprague-Dawley (S-D): ratas albinas no consanguíneas por lo que genéticamente presentan cierta heterogeneidad. Son un modelo general muy utilizado

por su fácil manejo y docilidad. Son un excelente modelo para estudios toxicológicos, reproducción, farmacología, etc.

Ratas Fisher F344: ratas albinas que, a diferencia de otras especies, carecen de zonas parduscas en espalda, región genital o cola. Son ratas consanguíneas por lo que genéticamente presentan homogeneidad. Es un modelo muy utilizado para estudios sobre envejecimiento, cáncer y estudios toxicológicos.

3.4. – Estudios moleculares.

3.4.1. – Expresión génica.

3.4.1.1.– Extracción y purificación de ARN en cultivos celulares y mucosa de colon de rata.

La extracción y purificación del ARN se llevó a cabo utilizando 2 kits comerciales: i) kit de homogenización *QIAshredder* (Qiagen) y ii) kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). El primero homogeniza la muestra mediante un biopolímero situado en una microcolumna que tritura la muestra y retiene el ARN. Con el segundo kit se consigue que las cadenas de ARN queden retenidas de forma selectiva en una membrana con base de silica-gel separándose del resto de componentes celulares mediante elución con una serie de tampones de alta concentración en sales. Para la extracción del material genético de mucosa de colon se utilizaron unos 20 mg de mucosa.

3.4.1.2.– Extracción y purificación de ARN en microorganismos.

La extracción y purificación de ARN de microorganismos se llevó a cabo utilizando el kit RiboPureTM-Bacteria siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica es un método que combina la ruptura de la pared celular bacteriana usando bolas

de Zirconia, una extracción con fenol del lisado celular y una purificación del ARN gracias al uso de filtros de fibra de vidrio.

3.4.1.3.– Cuantificación y evaluación de la calidad del ARN.

Una vez concluido el proceso de extracción y purificación del ARN, su concentración y pureza se determinó en un espectrofotómetro de alta sensibilidad (NanoDrop® ND-1000 v3.3.0) y/o un lector de placas Infinite M200 Tecan (Grodig, Austria), capaces de cuantificar ARN a partir de 2 µL de volumen de muestra, registrando los espectros comprendidos entre 200 y 400nm (**Figura 3.14**).

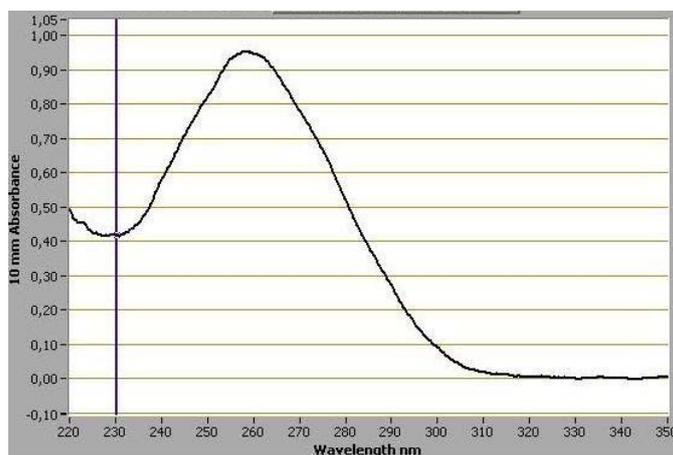


Figura 3.11. Perfil de una muestra de ARN medida en el NanoDrop® ND-1000 v3.3.0. La A_{260} nos informa acerca de la concentración de ARN de la solución y la relación de este parámetro con el valor de A_{280} nos indica la pureza del ARN de la muestra.

La relación A_{260}/A_{280} nos indica la pureza del ARN de la muestra, estando los valores aceptables comprendidos entre 1,8 y 2,1. Además, la relación A_{260}/A_{230} es indicativa de la presencia de contaminaciones en la muestra. Por otro lado, la integridad total del ARN se evaluó mediante un bioanalizador Agilent 2100 que consiste en un sistema de microelectroforesis mediante el uso de nanocapilares que separa los componentes de la muestra mediante electroforesis y nos permite obtener un algoritmo denominado RIN (*RNA Integrity Number*) que permite determinar la calidad de las

muestras de ARN en base a un rango numérico del 1 al 10, siendo 1 el valor para una muestra con ARN totalmente degradado y 10 el valor obtenido para una muestra intacta.

3.4.1.4.– Cuantificación de la pureza del ARNm por geles de agarosa.

La pureza del ARN se puede cuantificar en gel de agarosa al 1 % en tampón Tris-acetato/EDTA (TAE) 1X. Las muestras de ARN se cargaron en los pocillos del gel previamente mezcladas con un 1 % de tampón de carga de electroforesis que contenía TrisHCl/EDTA, azul de bromofenol y glicerol. El gel se desarrolló a 90 V durante 45 min y el revelado se realizó sumergiendo el gel durante 15 min en una solución de bromuro de etidio. Las imágenes se captaron en la estación de imagen *Chemidoc XRS* de BioRad.

3.4.2. – Microarrays (Affymetrix).

El análisis de cambios en los niveles de expresión génica múltiple en los miofibroblastos de colon CCD18Co se realizó utilizando la tecnología de *microarrays* que permite la determinación simultánea de los niveles de expresión de cientos a miles de genes (incluso genoma completo) en células o tejidos en condiciones y tiempos determinados (Katagiri & Glazebrook, **2004**). El ARN purificado y caracterizado se analizó en la Unidad de Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid) para el procesamiento y desarrollo de los microarrays. La hibridación, procesamiento y análisis de imagen se llevó a cabo siguiendo la metodología de *Affymetrix*. Brevemente: a partir de 5 µg de ARN total se generó ARNc biotinilado siguiendo el protocolo de marcaje One-Cycle target IVT (*Expression Analysis Technical Manual*, 2004, *Affymetrix*). Posteriormente el ARNc se fragmentó, se determinó la calidad de los fragmentos y se hibridó durante 16 horas a

45 °C en rotación constante a 60 rpm con el chip *human GeneChip Affimetrix microarray HG U133 Plus 2.0*. Los microarrays se escanearon, la intensidad de fluorescencia para cada chip se adquirió con un láser (GeneChip® Scanner 3000) y se cuantificó con los programas *Affimetrix Gene Chip Operative* y *Expression Default Settings*.

Para eliminar la variabilidad debida al error experimental, los datos crudos se normalizaron mediante la aplicación del algoritmo matemático RMA (*Robust Multi-array Average*) (Breitling, 2006). Los datos normalizados se guardaron en un archivo de Excel para su posterior análisis de expresión diferencial y funcional. Para este análisis se aplicó el “test de la *t*” de Benjamín-Hochberg (Benjamín y Hochberg, 1995) con corrección para la proporción de falsos positivos (FDR, *False Discovery Rate*) utilizando el software GEPAS (Gene Expression Pattern Analysis Suite, <http://gepas.bioinfo.cipf.es/>). Las sondas (transcritos o genes) seleccionadas se utilizaron posteriormente para el análisis funcional y biológico mediante la aplicación del software *Ingenuity Pathway Analysis*, (www.ingenuity.com).

3.4.3. – Expresión génica. RT-PCR a tiempo real.

3.4.3.1.– Equipo para RT-PCR a tiempo real.

El termociclador *7500 Real-Time PCR System* de *Applied Biosystem* permite cuantificar la amplificación de genes en tiempo real.



Figura 3.12. Termociclador 7500 Real-Time PCR System de Applied Biosystem.

La RT-PCR (*Real Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) es una técnica muy sensible y fiable para la detección y cuantificación de los niveles de ácidos nucleicos específicos. La reacción de la RT-PCR mide el momento exacto durante la PCR en el que se detecta por primera vez la amplificación del producto, y no la cantidad final de producto acumulada tras un número concreto de ciclos, como en otras técnicas de reacción en cadena de la polimerasa. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, a partir de ARN total puro extraído de líneas celulares, de mucosa de colon de rata y/o de microorganismos.

Cada gen estudiado se analizó por cuantificación absoluta o relativa (dependiendo de las eficiencias de los genes objeto de estudio respecto al gen endógeno), determinando en paralelo la expresión de un gen endógeno, como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) o β -actina, para normalizar los datos obtenidos para el gen objeto de estudio. En cada reacción (pocillo) se utilizaron 25 μ L de mezcla de reacción compuesta por los reactivos proporcionados por *Applied Biosystem*, se realizaron 3 lecturas de cada muestra (3 pocillos de cada muestra), que provenían de al menos 3 réplicas biológicas independientes (en días distintos).

La reacción de RT-PCR transcurre en 2 etapas: i) Transcripción inversa (RT; *reverse transcription*) del ARN de partida a su ADNc; ii) Reacción en cadena de la

polimerasa a través de la cual se amplifican las copias de la secuencia de ADNc diana. Los parámetros Temperatura/Tiempo fijados para que transcurra la reacción son: i) transcripción reversa (RT) a 48 °C durante 30 min; ii) activación de la *Taq polimerasa* durante 10 min a 95 °C; iii) repetición de 40 ciclos de 15 s a 95 °C (etapa de desnaturalización) seguido de 1 min a 60 °C (etapa de hibridación) tomándose en este último punto la lectura de emisión de fluorescencia.

3.4.3.1.1. – Análisis de los resultados por el método de la curva estándar

Para el análisis de los datos se deben tener en cuenta dos parámetros: la línea base (*baseline*) que nos permite determinar el ciclo en el cual la amplificación de la señal empieza a distinguirse del ruido y el nivel umbral (*threshold*) que es la línea cuya intersección con la curva define el momento de la reacción donde se establecerá el *Ct* (Ciclo umbral o *Crossing Point*) que marca el inicio de la fase exponencial de la amplificación que está directamente relacionado con la cantidad de ADN molde inicial. El *Ct* coincide con el primer ciclo a partir del cual la fluorescencia para un determinado punto empieza a ser apreciable. Los valores adecuados de *Ct* son los comprendidos entre los ciclos 8 y 35 de la PCR. Fuera de este rango la variabilidad de los resultados es muy grande.

Una vez que estos parámetros se fijan se realiza el análisis obteniendo la curva estándar y los resultados. La curva estándar se considera aceptable para el análisis cuando la pendiente es aproximadamente -3,3 (100 % de eficiencia) y la correlación (R^2) se encuentra entre 0,978 y 0,999. Los valores de *Ct* obtenidos para las muestras de ARN control (C) y tratado (T) se transforman en concentración de ARN total para el gen estudiado mediante la curva patrón. El valor final obtenido de concentración para

cada muestra se normaliza con los valores obtenidos simultáneamente para el gen endógeno (*GAPDH* o *β-actina*) a partir de las mismas muestras de ARN C y T. Con esta normalización se corrigen los posibles errores metodológicos y de dilución de muestras. El valor final que indica el posible cambio de expresión entre muestra C y T se calcula como la razón entre ambas según la ecuación:

$$\text{Ratio} = T/C = [\text{Gen (T)}/\text{Gen Endógeno (T)}] / [\text{Gen (C)}/\text{Gen Endógeno (C)}]$$

3.4.3.1.2. – Análisis de los resultados por el método del *Ct*.

Cuantificación Relativa.

El método comparativo del *Ct* es similar al de la curva estándar descrito anteriormente. Sin embargo, este método utiliza fórmulas aritméticas para conseguir el mismo resultado y omite el uso de la recta patrón. Para poder utilizar este método se requiere de una validación previa en la cual las eficiencias del gen objeto de estudio y del gen endógeno deben ser equivalentes. Para ello se realiza una recta patrón utilizando concentraciones crecientes de ARN, con un mínimo de 4 puntos (por triplicado) representando en una gráfica los ΔCt (*Ct* del gen objeto de estudio - *Ct* del gen endógeno para cada concentración) en el eje ordenadas y el \log_{10} de la cantidad total de ARN en el eje de abscisas. Para que el método sea válido y pueda ser utilizado, es necesario que el valor absoluto de la pendiente de la recta que se represente sea inferior a 0,1 y por lo tanto las eficiencias sean equivalentes. En caso contrario se deberá utilizar el método de la curva estándar o buscar otro gen endógeno que cumpla con este requisito. La variación de la expresión de un gen objeto de estudio, normalizado a un gen endógeno y relativo a un calibrador vendrá determinado por la fórmula $2^{\Delta\Delta-Ct}$.

3.4.4. – Identificación y cuantificación de proteínas.

3.4.4.1.– Cuantificación de proteína.

Método de Bradford. Este método utiliza un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tiene un color pardo. Al entrar en contacto con una proteína se produce un color azul intenso que se puede medir fácilmente a 595 nm (Bradford, **1976**). Es un método rápido, fácil de utilizar pero es relativamente sensible a la presencia de otros contaminantes como restos de detergentes y líquidos orgánicos como el MeOH. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se utiliza una recta patrón de BSA.

Kit comercial DC Protein (BioRad, Barcelona, España). Este kit permite determinar la concentración de proteína mediante un ensayo colorimétrico similar al ensayo de Lowry (Lowry *et al*, **1951**) pero con algunas mejoras ya que evita la interferencia de detergentes en la lectura. Para la cuantificación de la proteína se realiza una recta patrón de BSA.

3.4.4.2.– Extracción de proteína.

Para la extracción de proteína de las células se utilizó un tampón de lisis compuesto por tampón RIPA (Tris-HCl 25 mM pH = 7,4; NaCl 150mM; 0,12 % TritonX-100; 0,5 % deoxicolato sódico; 0,1 % sodio dodecil sulfato (SDS; *sodium dodecyl sulphate*), y una mezcla de inhibidores de fosfatasa (*o*-vanadato sódico 1 mM; fluoruro sódico 1 mM) y proteasas (Roche, Manheim, Alemania) que protegen a la proteína extraída de procesos de degradación. Tras los diferentes tratamientos, el medio se retiró y las células se lavaron 2 veces con PBS frío, se adicionó el tampón de lisis, se raspó la superficie celular para favorecer la rotura de las células y el contenido se transfirió a tubos eppendorf que se dejaron durante 30 min en hielo. Pasado ese tiempo,

las muestras se centrifugaron a $23200 \times g$ durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes se guardaron a -80 °C.

3.4.4.3.– Electroforesis en gel de electroforesis de poliacrilamida (PAGE) y Western Blot.

El ensayo de Western Blot permite identificar y determinar la expresión relativa de proteínas presentes en muestras biológicas. Inicialmente se lleva a cabo una electroforesis en gel utilizando un agente desnaturalizante (como la temperatura) que hace que la proteína pierda la estructura tridimensional característica de su función biológica.

Tras realizar los diferentes ensayos y tratamientos, las proteínas de interés se cuantificaron utilizando el método de Bradford (**apartado 3.4.4.1**). El proceso de electroforesis se inició disolviendo la proteína en tampón de carga y poniendo posteriormente de 10–60 µg de proteína en geles 10–15 % de acrilamida. Estos geles se introdujeron en tampón de electroforesis y se sometieron a una carga eléctrica durante 90 min a temperatura ambiente. En el proceso de transferencia se utilizaron membranas “Hybond-P” de fluoruro de polivinilideno (PVDF; GE Healthcare-Amersham, New Jersey, EEUU), las cuales se activaron con MeOH (10 s a temperatura ambiente) y posteriormente se lavaron con agua. Después, la membrana se adhirió al gel de poliacrilamida que contenía las proteínas y se llevó a cabo la transferencia durante 90 min a 4 °C. Finalizada esta etapa, las membranas se bloquearon durante 2 h con tampón Tris salino Tween 20 al 0,1 % (TTBS; *Tween Tris-Buffered saline*) y 5 % de BSA y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína estudiada. A continuación, tras realizar lavados con TTBS durante 1 h, se adicionó el anticuerpo secundario adecuado (anti-conejo, anti-ratón o anti-cabra) (Sigma Aldrich

Química S.A., Madrid, España) y se incubó durante 2 h. El proceso de detección y revelado de las membranas se llevó a cabo mediante fluorescencia, utilizando el kit ECLTM Plus (GE Healthcare-Amersham, Reino Unido) y un escáner (Thypon 9410 Scanner Control v5.0) acoplado a un software que permite la cuantificación de las bandas por densitometría (ImageQuant TL v2005, Amersham Bioscience). En todos los experimentos realizados, se usó GAPDH (Affinity BioreagentsTM, EEUU) como control de carga proteica.

3.4.4.4.– Antibody array.

Las membranas de *antibody array*, son un sistema que permite la detección en paralelo de múltiples proteínas en pequeños volúmenes de muestra, lo que supone una gran ventaja frente a otras técnicas como el ELISA (Pang *et al.*, 2005). Consiste en unas membranas que contienen anticuerpos específicos para un grupo de proteínas seleccionadas que se agrupan, por ejemplo, por su relación con procesos biológicos o enfermedades específicas. Utilizando esta herramienta, podemos investigar si los niveles de expresión de algunas de estas proteínas se alteran en respuesta a un estímulo determinado, lo cual puede ser indicativo de regulación o alteración del proceso biológico en el que estas proteínas están implicadas (**Figura 3.16**). Los ensayos tienen una buena reproducibilidad, alta sensibilidad y exactitud cuantitativa sobre grandes rangos de concentración, sin embargo todavía quedan retos por resolver en la utilización de esta técnica (Sánchez-Carbayo, 2007).

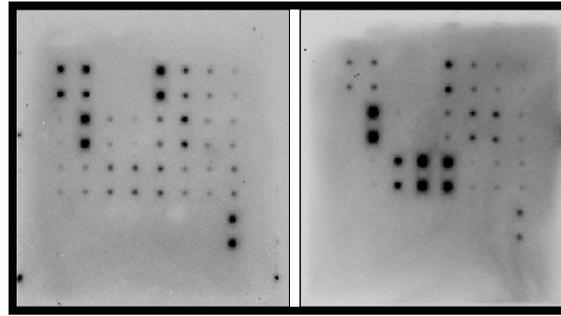


Figura 3.13. La comparación de las intensidades de las señales obtenidas, permite determinar los niveles de expresión relativa de las proteínas. Los anticuerpos agrupados en forma de *spot* incrementan la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados. Entre los *spots* también se incluyen controles positivos, negativos y blancos.

Para el desarrollo del array la muestra se incubó con una membrana que contenía anticuerpos específicos de las proteínas objeto de estudio. Tras la incubación, una vez que las proteínas de la muestra se unieron al anticuerpo, después de una serie de lavados, las membranas se incubaron con un anticuerpo primario y otro secundario que nos permitió la posterior detección por quimioluminiscencia. Para la adquisición de imágenes se utilizó una cámara CCD (*Charge-Coupled Device*) instalada en una estación de imagen *Chemidoc XRS* de BioRad, con el programa *Quantity One* (versión 4.5.2). La imagen de la membrana se ajustó, intentando conseguir el mejor rango dinámico de intensidad lumínica, evitando la saturación de los *spots* y obteniendo imágenes con la mayor sensibilidad posible para detectar aquellos *spots* de menor intensidad de señal. La imagen tomada de cada membrana se convirtió a un archivo TIFF con el programa *Quantity One* y se analizó con el programa *ScanAlyze*, que transformaba la cantidad de intensidad de luz emitida por cada *spot* en un dato numérico (**Figura 3.17**). Los resultados de intensidad lumínica se exportaron a un archivo *Excel* para su análisis.

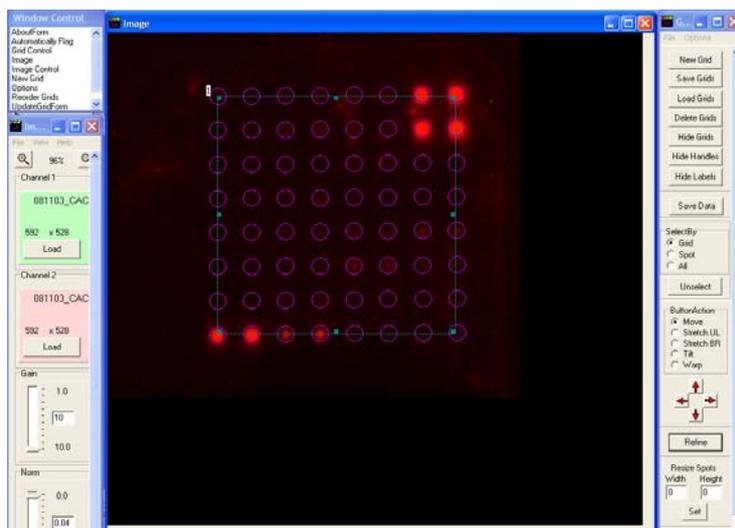


Figura 3.14. Interfaz del programa ScanAlyze. La imagen se carga en el canal 1 (*Channel 1*) y en el 2 (*Channel 2*) y se manipula los parámetros de ganancia (*Gain*) y normalización (*Norm*) hasta obtener una imagen nítida y clara. Se crea una gradilla y se ajusta a la imagen obteniendo los valores de intensidad lumínica de cada punto de luz.

Para determinar la intensidad total se eliminó el valor de *background* de cada *spot* y se sumaron las intensidades obtenidas para cada canal (canal 1 y 2). Estos valores se normalizaron respecto a los valores obtenidos en los *spots* positivos y se compararon tratados (T) frente a controles (Ct) según la fórmula:

$$\left(\frac{(I_{s_{t1}} - B_{s_{t1}}) + (I_{s_{t2}} - B_{s_{t2}})}{(I_{s_{+1}} - B_{s_{+1}}) + (I_{s_{+2}} - B_{s_{+2}})} \right) / \left(\frac{(I_{s_{ct1}} - B_{s_{ct1}}) + (I_{s_{ct2}} - B_{s_{ct2}})}{(I_{s_{+1}} - B_{s_{+1}}) + (I_{s_{+2}} - B_{s_{+2}})} \right) = \text{Expresión relativa}$$

Para el estudio de factores de crecimiento tanto en los miofibroblastos de colon CCD18-Co como en las células endoteliales HAECs, se utilizaron las membranas del *antibody array RayBio Human Growth Factor Array*. (Tabla 3.1), mientras que para el estudio de proteínas de adhesión en ambas líneas celulares se utilizaron las membranas diseñadas con 20 marcadores de adhesión (RayBiotech, Inc. Norcross, GA, EEUU).

Tabla 3.1. Membrana de *antibody array* que contiene anticuerpos específicos para los factores de crecimiento. Cada recuadro representa las posiciones en las que se encuentran los anticuerpos a los que se adhieren las proteínas específicamente.

POS	POS	NEG	NEG	AR	bFGF	bNGF	EGF	EGFR	FGF-4	FGF-6	FGF-7
POS	POS	NEG	NEG	AR	bFGF	bNGF	EGF	EGFR	FGF-4	FGF-6	FGF-7
G-CSF	GDNF	GM-CSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	IGF-1	IGF-1 SR
G-CSF	GDNF	GM-CSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	IGF-1	IGF-1 SR
IGF-II	M-CSF	MCSFR	NT-3	NT-4	PDGFR α	PDGFR β	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	PIGF	SCF
IGF-II	M-CSF	MCSFR	NT-3	NT-4	PDGF R α	PDGF R β	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	PIGF	SCF
SCFR	TGF- α	TGF- β	TGF- β 2	TGF- β 3	VEGF	VEGFR2	VEGFR3	VEGFD	Blanco	Blanco	POS
SCFR	TGF- α	TGF- β	TGF- β 2	TGF- β 3	VEGF	VEGFR2	VEGFR3	VEGFD	Blanco	Blanco	POS

Tabla 3.2. Membrana de *antibody array* que contiene anticuerpos específicos para las proteínas de adhesión. Cada recuadro representa las posiciones en las que se encuentran los anticuerpos a los que se adhieren las proteínas específicamente.

POS	POS	NEG	NEG	ALCAM	BCAM	CEACAM-1	E-Cadherin
POS	POS	NEG	NEG	ALCAM	BCAM	CEACAM-1	E-Cadherin
EpCAM	ICAM-1	ICAM-2	ICAM-3	P-Cadherin	PECAM-1	VCAM-1	VE-Cadherin
EpCAM	ICAM-1	ICAM-2	ICAM-3	P-Cadherin	PECAM-1	VCAM-1	VE-Cadherin
VEGF-C	CD 14	E-selectin	IL-8	CCL2	PF-4	P-selectin	L-selectin
VEGF-C	CD 14	E-selectin	IL-8	CCL2	PF-4	P-selectin	L-selectin
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	NEG	POS
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	NEG	POS

3.4.4.5.– Ensayo de ELISA.

La técnica de ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, se puede medir espectrofotométricamente.

Análisis de citoquinas, factores quimiotácticos, GFs y proteínas de adhesión.

En la presente Tesis Doctoral se han estudiado las concentraciones de: IL-6, TNF- α , PAI-1, y de los factores quimiotácticos IL-8 y CCL-2 con el kit comercial Peptotech (Rocky Hill, NJ, EEUU), siendo los niveles mínimos de detección de 23 pg/mL en el caso de PAI-1, 32 pg/mL para IL-6 y 8 pg/mL para TNF- α , IL-8 y CCL-2. También se han determinado los niveles de expresión de PDGF-BB y su receptor PGFB-R- β utilizando los kit comerciales de Peptotech (Rocky Hill, NJ, EEUU) y Sino Biological (Schilde, Bélgica), respectivamente, con niveles mínimos de detección de 62 ng/mL para PDGF-BB y 62,5 ng/mL para PDGF-R- β . En el caso de las proteínas de adhesión sICAM-1 y VCAM-1, se utilizaron los kits comerciales Bender MedSystem (Viena, Austria) y Gen-Probe (San Diego, CA, EEUU) respectivamente, siendo los niveles mínimos de detección de 6,25 ng/mL para sICAM-1 y de 0,6 ng/mL para VCAM-1. Antes de analizar las muestras, se realizó una prueba de dilución de muestras control y tratadas, para que los niveles de quimioluminiscencia se encontrasen siempre dentro de los valores de la recta patrón utilizada para la cuantificación de las moléculas.

Análisis de prostaglandina E₂ (PGE₂)

Para el análisis de PGE₂ se utilizó un kit comercial (Prostaglandin E2 EIA kit – Monoclonal, Cayman Chemical, San Diego, CA, EEUU) que permitió su cuantificación gracias a su conversión en un metabolito estable que se puede medir fácilmente por

ELISA. Este kit se basa en la medida de la competición entre PGE₂ producida por el tratamiento y la PGE₂-acetilcolinesterasa conjugada del kit para una cantidad limitada de anticuerpo monoclonal anti-PGE₂. Así, la concentración de PGE₂-acetilcolinesterasa conjugada es constante mientras que la de la PGE₂, inducida en nuestro ensayo, es variable por lo que la cantidad de PGE₂-acetilcolinesterasa conjugada que se unirá al anticuerpo monoclonal será inversamente proporcional a la cantidad de PGE₂ presente en el medio. Tras la incubación, se añadió el sustrato de la acetilcolinesterasa (reactivo de *Ellman's*) que produce color amarillo cuya absorbancia se midió entre 405-420nm, obteniendo una mayor absorbancia a menor concentración de PGE₂ que se cuantificó gracias a una recta patrón con concentraciones conocidas de la prostaglandina. Este ensayo permitió determinar los niveles de PGE₂ en la mucosa de rata y en medio de cultivo de fibroblastos de colon CCD18-Co.

3.5. – Análisis por cromatografía.

3.5.1. – GC-MS/MS. Determinación de SCFAs en muestras de heces de rata.

El sistema GS-MS/MS consiste en un Agilent 7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, EEUU), equipado con un muestreador automático (MPS2) (Gerstel, Mülheim, Alemania) acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5975C. Para la adquisición de datos se utiliza el software Chemstation (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EEUU).

La separación cromatográfica se realizó una columna capilar de sílice DB-WAXetr (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm de grosor) utilizando helio, a un flujo de 1 mL/min, como fase móvil. Para el análisis de SCFAs, se inyectó 1 µL de volumen en modo sin división de flujo (*splitless*) siendo la temperatura del inyector de 250 °C. Para

evitar contaminaciones de la columna con el material fecal no volátil se utilizó un revestimiento de vidrio con tapón de lana de vidrio. Se realizaron más de 400 inyecciones de muestras fecales con el mismo *liner* sin obtener pico de cola. Cada 5 muestras inyectadas, se realizó un pinchazo con hexano para comprobar los “efectos memoria”. La temperatura inicial de la columna fue de 90 °C que aumentó hasta 150 °C a razón de 15 °C/min y continuó aumentando a razón de 5 °C/min hasta alcanzar los 170 °C. A partir de ahí, subió hasta los 250 °C a razón de 20 °C/min manteniéndose durante 2 min, siendo el tiempo de elución del disolvente de 3,5 min. El detector operó en modo ionización por impacto de electrón (energía de electrón 70 eV) y el rango de barrido de masas fue de 30-250 *m/z*. La temperatura de la fuente de ionización fue de 230 °C, la del cuadrupolo 150 °C y la interfase 280 °C. La identificación de los SCFAs se basó tanto en el tiempo de retención de los compuestos estándar como en las bibliotecas NIST08 y Wiley 7n.



Figura 3.15. Cromatógrafo de gases Agilent 7890 acoplado a un detector de masas Agilent 5975C.

3.5.2. – HPLC-DAD-UV-Vis.

Para la realización del ensayo de MDA se utilizó un HPLC Elite LaChrom-Hitachi (**Figura 3.19**). Este sistema está acoplado a una bomba modelo 2200 (VWE-Hitachi, Barcelona). La separación cromatográfica de las muestras se realizó en una columna C₁₈ 100A Phenomenex, 250 x 4,6 mm id, 3 μm (Phenomenex[®], Torrance, CA,

EEUU) usando las fases móviles agua:ácido acético (99:1 v/v) (A) y acetonitrilo (B) a una velocidad de flujo de 0,6 mL/min. Se utilizaron condiciones isocráticas, 38 % de B en A durante 20 min pasando a un 90 % de B a los 21 min que se mantuvo durante 5 min para volver a las condiciones iniciales. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 310 nm.



Figura 3.16. Equipo HPLC Elite LaChrom-Hitachi.

3.5.3. – HPLC-DAD-MS/MS.

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y sus derivados se llevó a cabo en un HPLC acoplado a un espectrofotómetro de masas con trampa de iones. En la presente Tesis Doctoral se utilizaron dos equipos (**Figura 3.20**).



Figura 3.17. HPLC-DAD-MS/MS 1100 series (Izquierda) y 1200 series (Derecha).

3.5.3.1.– HPLC-DAD-MS/MS (1100 series).

El sistema consta de un HPLC con bomba binaria (G1312A), un inyector automático (G1313A), un desgasificador (G1322A) y un detector de diodos en serie (G1315B) controlado por el programa de *Agilent Technologies* (v. A08.03). Este HPLC se encuentra acoplado a un detector de masas que consta de un espectrofotómetro de masas equipado con una trampa de iones (G2425A) y un sistema de ionización de *electrospray* (ESI) controlado por otro programa *Agilent Technologies* (v. 1.4). Todos los módulos mencionados anteriormente son de *Agilent Technologies* (Waldbronn, Alemania). La temperatura y el voltaje capilar para el sistema ESI se establecieron en 350 °C y 4 kilovoltios (kv) respectivamente. Para los análisis por HPLC-DAD-MS/MS, el rango de barrido de masas tanto para el barrido total (MS) como para los correspondientes fragmentos o iones hijos (MS-MS), se fijó en m/z de 200 hasta 2200 en el caso de las flavanonas y compuestos fenólicos derivados del consumo de granada, mientras que para las lactonas en m/z de 95 hasta 250. Los datos de espectrometría de masas se registraron simultáneamente en modo negativo de ionización para flavanonas y compuestos fenólicos derivados de la granada y en modo positivo en el caso de las lactonas. Los parámetros de la fragmentación de iones mediante colisión inducida se realizó en el interior de la trampa utilizando He como gas de colisión.

Para el análisis de flavanonas, las separaciones cromatográficas se realizaron en un columna 250 x 4 mm i.d., 5 μ m, C₁₈ Mediterranean Sea (Teknokroma, Barcelona, España), utilizando como fase móvil agua: ácido fórmico (99:1, v/v) (A) y acetonitrilo (B) siendo el flujo 1 mL/min. El gradiente comenzó con un 7 % de solvente B en solvente A alcanzando un 30 % de B a los 25 min y manteniéndose así hasta los 30 min. A los 36 min el gradiente alcanzó un 60 % de B llegando hasta el 90 % a los 37 min y

manteniéndose hasta los 42 min volviendo a partir de aquí a las condiciones iniciales y manteniéndose en condiciones isocráticas hasta los 50 min.

La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos (urolitinas y EA) derivados del consumo de granada, en heces y orina de rata, se realizó en una columna C₁₈ 100A Phenomenex, 250 x 4,6 mm id, 3 µm (Phenomenex[®], Torrance, CA, EEUU). La fase móvil que se utilizó fue ácido fórmico 1 % (v/v) (A) y ACN (B) siendo la composición inicial de un 5 % de B en A, alcanzando un 60 % de B a los 25 min y un 90 % a los 26 min, manteniéndose hasta los 31 min y bajando hasta el 1 % de B a los 31,1 min manteniéndose hasta los 38 min.

Para el análisis de lactonas se utilizó una columna 250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm, Li-Chrospher 100 RP-18, a la que se acopló una pre-columna 4 mm x 4 mm i.d. del mismo material (Merck, Darmstadt, Alemania) siendo el flujo de 0,4 mL/min. Se realizó un pinchazo post-columna de una mezcla de acetato amónico 5 mM y ácido trifluoroacético (0,03 %) en MeOH:H₂O con una jeringuilla de 500 µL a un flujo de 150 µL/h con el fin de mejorar la ionización. La fase móvil que se utilizó fue agua (A) y MeOH (B), siendo las condiciones iniciales de un 50 % de B en A que se mantvieron durante 10 min, se alcanzó un 60 % de B a los 10,1 min, 80 % de B a los 15 min y un 90 % de B en A a los 18 min, seguido por condiciones isocráticas hasta los 30 min.

3.5.3.2.– HPLC-DAD-MS/MS (1200 series).

El sistema consta de un HPLC con bomba binaria (G1376A), un microinyector automático (G1377A), un desgasificador (G1379A) y un detector de diodos en serie (G1315D) controlado por el programa de *Agilent Technologies* (v. A08.03). Todos los módulos mencionados anteriormente son de *Agilent Technologies*. Este HPLC se encuentra acoplado a un detector de masas que consta de un espectrómetro de masas en

serie (HTC Ultra mass detector; Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con una trampa de iones (G2425A) y un sistema de ionización de electrospray (ESI) controlado por otro programa *Agilent Technologies* (v. 4.1). La temperatura y el voltaje capilar para el sistema ESI se fijó en 350 °C y 4 kilovoltios (kv), respectivamente. Para los análisis por HPLC-DAD-MS/MS, el rango de barrido de masas tanto para el barrido total (MS) como para los correspondientes fragmentos o *iones hijos* (MS-MS) se fijó en m/z de 100 hasta 1200 (usando el modo Ultra Scan Mode a 26000 m/z por segundo) y los datos de espectrometría de masas se registraron en modo negativo (ESI) de ionización. Los parámetros de la fragmentación de iones mediante colisión inducida se realizaron en el interior de la trampa utilizando He como gas de colisión y ajustando al 75 % la energía de colisión.

Para la separación cromatográfica de las urolitinas y sus glucurónidos, se utilizó una columna en fase reversa (150 x 0,5 mm i.d., 5 μ m) ZORBAX SB-C18 de Agilent (Madrid, España). Las fases móviles utilizadas fueron agua:ácido fórmico (99:1 v/v) (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 10 μ L/min. El gradiente comenzó con un 1 % de B en A alcanzando un 60 % a los 30 min y un 90 % a los 31 min que se mantuvieron hasta los 36 min. El retorno a las condiciones iniciales se produjo a los 36,5 min y se mantuvieron hasta el final del análisis.

3.5.3.3.– UPLC-QqQ-MS/MS.

Este equipo consiste por un UHPLC 1290 Infinity (Agilent) equipado con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo serie 6460 (Agilent) (**Figura 3.21**). La separación cromatográfica se realizó a temperatura ambiente en una columna C18 Poroshell 120 (10 cm x 0,3 mm 2,7 μ m, Agilent). La fuente de ionización es del tipo *Jet Stream* a una temperatura de 400 °C. Se utilizó N₂ como gas de nebulización a

un flujo de 8 L/min, presión de 35 psi y 350 °C, siendo el voltaje del capilar -3500 V. Los datos de MS se obtuvieron en el modo monitorización de reacciones múltiples (MRM) y se monitorizaron las transiciones de los iones padres e hijos para cada metabolito: Uro-A, EA, pentahidroxi-urolitina, tetrahidroxi-urolitina, Uro-C, trihidroxi-urolitina.



Figura 3.18. Equipo de UHPLC 1290 Infinity acoplado al 6460 QqQ (Agilent).

3.6. – Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre los parámetros de cada experimento se evaluaron mediante el “test de la *t* de student” usando el software PASW statistic 18,0 (SPSS Inc., Chicago, IL, E.E.U.U.). Los resultados con valores $p < 0,001$, $< 0,01$ o $< 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. También se incluyeron valores $p < 0,2$ y $p < 0,1$ para indicar tendencias. Los resultados se presentaron como la media aritmética \pm DE (barras de error) y las diferencias significativas se indicaron mediante símbolos o letras.

Para la representación de todas las gráficas se utilizó el software Sigma Plot para Windows versión 12.0.

CAPÍTULO 4

**Los metabolitos derivados de elagitaninos,
urolitina-A glucurónido y su aglicona urolitina-A,
reducen los procesos inflamatorios inducidos por
TNF- α en células endoteliales de aorta humana y
modulan algunos de los marcadores moleculares
asociados**

Giménez-Bastida, J.A., *et al.*, “Ellagitannin metabolites, urolitin A glucuronide and its aglycone urolitihin A, ameliorate TNF-a-induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endotelial cells”, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2012**, 56, 784-796

Los metabolitos derivados de elagitaninos, urolitina-A glucurónido y su aglicona urolitina-A, reducen los procesos inflamatorios inducidos por TNF- α en células endoteliales de aorta humana y modulan algunos de los marcadores moleculares asociados.

RESUMEN

Numerosas investigaciones *in vitro* e *in vivo* indican que los elagitaninos (ETs) exhiben actividad anti-inflamatoria, anti-aterosclerótica y anti-angiogénica, lo que sugiere que estos compuestos tienen un potencial efecto preventivo frente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV). Los ETs, abundantes en frutas como la granada, tienen una baja biodisponibilidad como tales y en el intestino se hidrolizan para formar ácido elágico (EA). El EA, a su vez, se transforma en urolitina-A (Uro-A) y urolitina-B (Uro-B) por acción de la microbiota. Los derivados glucurónidos de estas urolitinas son los metabolitos mayoritarios detectados en plasma, normalmente a concentraciones en el rango nM a μ M. En este capítulo se ha investigado el efecto de los glucurónidos de Uro-A (Uro-A-gluc) y Uro-B (Uro-B-gluc), así como el de sus respectivas agliconas, sobre la respuesta de un modelo celular de endotelio arterial humano frente a la inflamación inducida por la citoquina inflamatoria TNF- α .

Las células endoteliales de aorta humana (HAECs) fueron tratadas con TNF- α y Uro-A-gluc, Uro-B-gluc o sus correspondientes agliconas a concentraciones en el rango μ M para determinar sus posibles efectos sobre: i) la adhesión de monocitos al endotelio y ii) la capacidad de migración de las células endoteliales. Además, se midieron los niveles de varias citoquinas implicadas en estos procesos. Los resultados muestran que Uro-A-

gluc (~5 – 15 μ M) es capaz de inhibir significativamente la adhesión de monocitos a las células endoteliales así como la capacidad migratoria de estas células. A su vez, observamos que este metabolito reduce también de forma significativa los niveles de la quimioquina ligando CCL2 y del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). La aglicona correspondiente, Uro-A, también inhibe la migración de las células endoteliales y reduce los niveles de CCL2 y de IL-8. Uro-B-gluc y su aglicona fueron menos activos a concentraciones similares.

Estos resultados sugieren que Uro-A-gluc y su aglicona podrían estar implicados, al menos en parte, en los efectos anti-inflamatorios y anti-ateroscleróticos atribuidos a los ETs y por lo tanto podrían contribuir al retraso o prevención de las ECVs.

1. – INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis va precedida normalmente de la alteración de las funciones del endotelio ('disfunción endotelial') acompañada de inflamación crónica de la pared de los vasos sanguíneos lo cual puede conducir a su estrechamiento y obstrucción (Villablanca *et al.*, 2010). El proceso *aterosclerótico* está regulado por un complejo mecanismo en el que las células inflamatorias del sistema inmune interactúan con las de la pared vascular mediante una intrincada red de moléculas de señalización y moduladoras (Libby *et al.*, 2011). Las células endoteliales que recubren el interior de los vasos sanguíneos juegan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis vascular regulando la respuesta inflamatoria, la angiogénesis y actuando como barrera (Esper *et al.*, 2006). La disfunción endotelial y la pérdida de integridad de las células endoteliales, etapas iniciales clave en el desarrollo de la aterosclerosis, se caracterizan por la sobre-expresión de moléculas pro-inflamatorias y de adhesión, además de la liberación de factores de crecimiento (Becker *et al.*, 2000; Sprague *et al.*, 2009). El

factor de necrosis tumoral TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria producida por linfocitos, monocitos y macrófagos activados, que juega un papel esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria de las células endoteliales. El TNF- α parece ser una molécula clave en el desarrollo de la patología vascular asociada con aterosclerosis y otras ECVs (Bradley, **2008**). Entre otras funciones, TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión incluyendo ICAM1, VCAM1, E-selectina, y CCL2, las cuales están implicados en el proceso de atracción de los monocitos hacia el endotelio vascular y su posterior migración hacia el interior del vaso (Zhang *et al.*, **2009**).

La migración de las células endoteliales es un proceso esencial para: i) los procesos de reparación de tejidos (*wound healing*) que regeneran la integridad de la capa de las células endoteliales y ii) la angiogénesis, proceso de proliferación y crecimiento de los vasos sanguíneos, importante en el proceso aterosclerótico (Zagorchev y Mulligan-Keboe, **2011**). Durante la regeneración y proliferación del endotelio se generan multitud de factores de crecimiento que constituyen un complejo sistema de señalización regulador del proceso de angiogénesis y de reparación de tejidos. Entre estos factores de crecimiento, son de gran importancia la familia del factor de crecimiento endotelial (EGF), los factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y los factores de crecimiento transformante (TGF β) (Yoshida *et al.*, **1997**). El TNF- α también puede actuar como una molécula pro-angiogénica, a la vez que puede afectar a la proliferación y migración de las células endoteliales (Szekanecz *et al.*, **1994**).

La disfunción endotelial es un proceso reversible que podría prevenirse o reducirse, entre otras posibilidades, mediante el consumo regular de determinados compuestos antioxidantes presentes en la dieta. Algunos de estos compuestos son capaces de inhibir o reducir la producción de TNF- α y/o las respuestas reguladas por

TNF- α (como inflamación y angiogénesis), y podrían revertir el proceso aterosclerótico (Zhang *et al.*, **2009**). Los compuestos fenólicos, abundantes en los alimentos vegetales y bebidas derivadas, exhiben propiedades antioxidantes y pueden contribuir de forma importante al mantenimiento y mejora de la salud vascular (Schiffrin, **2010**). Alimentos como las nueces y la granada, ricos en ETs, se asocian con efectos cardioprotectores aunque los estudios *in vivo* en modelos animales o los estudios de intervención en humanos son aún escasos. Numerosos estudios *in vitro* indican que ETs y EA tienen un papel anti-aterogénico, anti-inflamatorio y anti-angiogénico en diversos modelos celulares del sistema vascular. Sin embargo, como se indica en la revisión bibliográfica publicada por Larrosa *et al.* (**2010a**), muchos de estos estudios no se han desarrollado adecuadamente ya que, en la mayoría de los casos, las células se exponen a extractos vegetales complejos o a concentraciones muy elevadas (no fisiológicas) de los compuestos estudiados. Para llevar a cabo los estudios de una forma más correcta, las células del sistema vascular deberían exponerse a los metabolitos derivados de los compuestos originales presentes en los alimentos o extractos vegetales y que se generan durante la digestión gastrointestinal, metabolismo microbiano o metabolismo de fase I y fase II (Cerdá *et al.*, **2004**; Espín *et al.*, **2007b**; Azorín-Ortuño *et al.*, **2011a**; Azorín-Ortuño *et al.*, **2011c**; Kaway, **2011**). En concreto, ETs y EA se absorben muy poco y se metabolizan por acción de la microbiota colónica para formar Uro-B y mayoritariamente Uro-A, además de otros metabolitos minoritarios (Espín *et al.*, **2007b**). Los principales metabolitos detectados en plasma de humanos tras el consumo de alimentos que contienen ETs son los glucurónidos de Uro-A, Uro-B y Uro-C a concentraciones totales que van desde $\sim 0,2 \mu\text{M}$ hasta $\sim 18,6 \mu\text{M}$ indicando una gran variabilidad entre individuos e incluso entre días. Entre los valores más altos detectados, en un voluntario se llegaron a medir valores en plasma de Uro-B-gluc y Uro-A-gluc de

10,8 μM y 6,7 μM , respectivamente (Cerdá *et al.*, 2004; González-Sarrías *et al.*, 2010b). Estudios previos, tanto *in vivo* como *in vitro*, demuestran que Uro-A ejerce efectos anti-inflamatorios (Larrosa *et al.*, 2010b; González-Sarrías *et al.*, 2010a), lo que nos llevó a plantear la hipótesis de que los glucurónidos de las urolitinas podrían ejercer también efectos anti-inflamatorios y que podrían ser, al menos en parte, las moléculas responsables de algunos de los efectos beneficiosos frente a las ECVs que se han atribuido a los ETs (Cerdá *et al.*, 2005b).

Objetivos. Con el fin de contribuir a esclarecer algunos de los posibles mecanismos por los que los ETs de la dieta pueden proteger frente al desarrollo de aterosclerosis y los procesos inflamatorios iniciales asociados, en este capítulo nos planteamos investigar los posibles efectos de Uro-A-gluc y Uro-B-gluc sobre células endoteliales de aorta humana (HAECs) estimuladas con TNF- α . En concreto, se examinaron los efectos de estos metabolitos sobre: i) la adhesión de monocitos a células endoteliales, ii) la capacidad de migración de las células endoteliales y iii) los niveles de varios marcadores moleculares implicados en el proceso de adhesión y migración (proteínas de adhesión y factores de crecimiento). Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando concentraciones de los metabolitos en el rango μM (representativo de los niveles encontrados en plasma). Además, se estudió la estabilidad de los metabolitos en las condiciones de ensayo en los cultivos. En paralelo se ensayaron también las agliconas para comparar la actividad de las moléculas.

2. – MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. – Materiales.

En este estudio se utilizaron los metabolitos Uro-B-gluc, Uro-B y Uro-A descritos en el capítulo 3 (**apartado 3.1**). Los reactivos de uso general están también

descritos en el **apartado 3.1** de la sección general del MATERIALES y Métodos. Los metabolitos utilizados se disolvieron en DMSO (solución stock de 3 mM) y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

2.2. – Síntesis enzimática de Uro-A-gluc.

La enzima recombinante humana UDP glucuronosil transferasa 1, polipéptido A1 (UGT1A1) se obtuvo de BD Gentest (Woburn, MA) mientras que la sal disódica del difosfato de uridina-5 (UDP), de Sigma Aldrich (San Louis, MO, EEUU).

La síntesis de Uro-A-gluc se realizó en tubos eppendorf a 37° C durante 24 horas utilizando la mezcla de reacción indicada en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Reactivos utilizados en la síntesis de Uro-A-gluc.

REACTIVO	(μ L)	Concentración final
PBS (pH = 7,4)	422,5*	
Enzima UGT1A1	50*	0,5 mg/mL
UDP	25	1 mM
Uro-A	2,5	40 μ M
TOTAL	500	

En cada uno de los ensayos de síntesis de este compuesto, había un control negativo que no contenía enzima. * indica que estos volúmenes podían variar en función de la concentración de enzima recuperada en cada ciclo de síntesis.

Al finalizar la incubación, la mezcla de reacción se filtró y centrifugó en filtros Amicon® Ultra-4 de Millipore (Billerica, MA, EEUU) a $4000 \times g$ para recuperar la enzima activa. La enzima retenida en la membrana del filtro se resuspendió en PBS mediante agitación en vórtex, repitiendo el proceso 3 veces. La concentración de proteína recuperada se cuantificó utilizando el kit *DC Protein* (BioRad, Barcelona, España) (capítulo 3, **apartado 3.4.4.1**). Este proceso permitió reutilizar la enzima al menos 4 veces, antes de perder la actividad.

Para la extracción de Uro-A-gluc, el filtrado obtenido se acidificó con ácido fórmico (1,5% v/v), se le adicionó 250 μ L de agua milliQ y 2 mL de dietil-éter por cada 500 μ L, se mezcló vigorosamente mediante vórtex (30 s) y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Mediante centrifugación a $2894 \times g$ durante 5 min se separó la fase etérea (que contenía Uro-A no conjugada) de la acuosa (contiene el derivado glucurónido). La extracción con dietil-éter se repitió dos veces más para eliminar toda la Uro-A no conjugada. La fase acuosa acidificada (10 mL como máximo) se filtró por cartuchos de fase reversa C18 SEP-PAK (Waters, Millipore, EEUU) pre-activados. El Uro-A-gluc retenido en los cartuchos se eluyó en 1 mL de MeOH, se evaporó en un concentrador Speedvac® (Savant SPD 121P) y el residuo se re-suspendió en 50 μ L de DMSO.

2.3. – Análisis por HPLC-MS/MS (1200 series).

Los derivados glucurónidos de las urolitinas y las agliconas se analizaron utilizando un equipo de HPLC-DAD-MS/MS (1200 series, Agilent Technologies) como se describe en el capítulo 3 (**apartado 3.5.3.2**). Antes de la inyección, las soluciones stock de los compuestos se diluyeron en H₂O:MeOH (90:10) y se filtraron (0,45 μ m). En este estudio, se determinaron los siguientes parámetros de las funciones de calibración: rango de calibración, linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y % de recuperación. Todas las rectas de calibrado mostraron una buena correlación ($R^2=0,997$) en un amplio rango de concentraciones ($\sim 0,1 - 20 \mu$ M). El LD presentó unos valores entre 0,11 – 0,21 μ M mientras que el LC fue de 0,53 – 0,70 μ M. El porcentaje de recuperación para cada metabolito estuvo entre 89,9% y 109,8% indicando una buena recuperación de los metabolitos en el medio de cultivo. Además, el método utilizado tenía una buena variabilidad tanto intra-día [desviación

estándar relativa (DER de 0,19 a 7,95%)] como inter-día (DER de 0,13 hasta 14,91). Los resultados se presentan en la **Tabla 4.2**:

Tabla 4.2. Parámetros de calibración determinados por HPLC-MS/MS.

Compuesto	Rt (min)	Recta patrón	Correlación	LD (µM)	LC (µM)	Recuperación (%)
Uro-A-gluc	17.64	$y = 139.08x - 5.7741$	$R^2 = 0.9979$	0.210	0.70	95.25% ± 0.36
Uro-A	23.53	$y = 150.70x - 25.057$	$R^2 = 0.9970$	0.115	0.38	89.96% ± 0.85
Uro-B-gluc	21.73	$y = 53.568x - 37.145$	$R^2 = 0.9972$	0.158	0.53	109.8% ± 2.17
Uro-B	28.64	$y = 102.74x - 24.157$	$R^2 = 0.9973$	0.160	0.53	89.67% ± 0.69

Para todos los compuestos el rango de linealidad se encontró entre LC y 20 µM Abreviaturas: Tiempo de retención (Rt); límite de detección (LD); límite de cuantificación (LC).

Para comprobar la estabilidad de los glucurónidos y sus agliconas durante los tratamientos, el medio de cultivo se congeló a -20° C al final de cada experimento y posteriormente se analizó la presencia y concentración de los compuestos. Para la preparación de las muestras, se adicionaron 250 µL de ACN por cada 100 µL de medio de cultivo, se agitó en vórtex y se centrifugó a 16435 × g durante 10 min. El sobrenadante se concentró en un SpeedVac® (Savant SPD 121P) y el residuo resultante se resuspendió en MeOH, se diluyó en agua 1:1 y se filtró (0,45 µm) antes del análisis por HPLC-MS/MS utilizando las condiciones descritas en el capítulo 3 (**apartado 3.5.3.2**).

2.4. – Cultivo de las células.

El cultivo y mantenimiento de las HAECs se ha descrito en el capítulo 3, apartados 3.2.1.2 y 3.2.1.2.1. Las células utilizadas para este ensayo se encontraban entre los pases 3 – 7. Los monocitos de leucemia humana (THP-1) se cultivaron y mantuvieron como se describe en los **apartados 3.2.1.3 y 3.2.1.3.1** del capítulo 3. Se utilizaron células THP-1 entre los pases 15 – 30.

2.5. – Ensayo de adhesión.

El ensayo de adhesión está descrito en el capítulo 3, **apartado 3.2.4**. Los monocitos THP-1 se tiñeron con calceína como se describe en el capítulo 3, **apartado 3.2.1.3.2**. Las HAECs se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10^4 células/pocillo y se dejaron crecer hasta confluencia. Se realizó un ensayo preliminar para determinar el tiempo de tratamiento y la concentración de TNF- α más adecuados para llevar a cabo este ensayo. Se utilizaron dos concentraciones de TNF- α (10 y 50 ng/mL) y se trataron durante distintos períodos de tiempo (2, 4 y 8 h) y se determinó que las condiciones óptimas del ensayo eran 4 h de tratamiento con TNF- α a una concentración de 50 ng/mL. En los tratamientos con los metabolitos, la concentración de cada uno de ellos se determinó tras la adición al medio de cultivo utilizando el HPLC. Las concentraciones fueron: $12,3 \pm 0,3$ μ M de Uro-A-gluc; $20,4 \pm 2,6$ μ M de Uro-B-gluc; $18,5 \pm 1,1$ μ M de Uro-A; $14,9 \pm 0,5$ μ M de Uro-B. Para determinar posibles efectos dosis-respuesta, también se ensayaron dos concentraciones más bajas, $\sim 1,0$ y $\sim 5,0$ μ M. Las células control se trataron con cantidades equivalentes de DMSO ($\leq 0,5\%$). Los resultados se presentan como la media aritmética \pm desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes ($n = 3$; 6 pocillos por experimento).

2.6. – Ensayo de migración.

El desarrollo del ensayo y el análisis de los resultados están descritos en el capítulo 3, **apartado 3.2.3**. Las HAECs se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad inicial de 10^4 células/cm² y se dejaron crecer hasta confluencia. Las células se trataron adicionando medio de cultivo fresco con los compuestos de interés a las mismas concentraciones descritas para el ensayo de adhesión en presencia o ausencia de TNF- α (50 ng/mL). Las células control se trataron con cantidades equivalentes de

DMSO (<0,5%). Los resultados se presentan como la media aritmética \pm DE de un mínimo de 3 experimentos independientes ($n = 3 - 5$; 2 pocillos por experimento).

2.7. – Ensayo de viabilidad celular.

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT (capítulo 3, **apartado 3.2.2.2**). Las HAECs se cultivaron y se trataron en las mismas condiciones descritas para el ensayo de migración con un tiempo de incubación de 12 h. Al finalizar la incubación, el medio de cultivo se reemplazó por 1 mL de solución MTT (1,0 mg/mL en medio de cultivo libre de suplemento) y se incubó durante 3 h. Los cristales de formazano que se generaron por acción de las células viables se solubilizaron con DMSO (625 μ L) y se midió la A_{570} utilizando como referencia A_{670} . Los resultados se presentan como la media aritmética \pm DE de un mínimo de 3 experimentos independientes ($n = 3 - 6$; 2 pocillos por experimento).

2.8. – *Antibody arrays*.

Los cambios en los niveles de expresión de proteínas implicadas en la adhesión celular y en la migración se estudiaron utilizando los *antibody arrays* especificados en el capítulo 3, **apartado 3.4.4.4**. En este ensayo, las células se cultivaron en placas de 6 cm de diámetro a una densidad de 10^4 células/cm² y se dejaron crecer hasta confluencia. Una vez alcanzada la confluencia, las células se trataron con los mismos compuestos y a las mismas concentraciones que las descritas para migración y adhesión. Tras el tratamiento, se extrajo la proteína (capítulo 3, **apartado 3.4.4.2**) y se procedió a su hibridación sobre los *arrays* como se indica en el capítulo 3 (**apartado 3.4.4.4**).

Considerando que cambios moderados de expresión pueden tener una gran relevancia biológica, se estableció como criterio de corte para seleccionar las proteínas

con expresión alterada por los tratamientos, aquellas que mostraron cambios entre los grupos experimentales $\geq 1,3$ (sobre-expresión) o $\leq -1,3$ (represión). Los ensayos se realizaron con lisados celulares obtenidos de 2 placas de cultivo que se mezclaron e hibridaron sobre cada *array*. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE de 2 experimentos independientes (cada experimento se realizó con un lisado celular que provenía de la mezcla de 2 lisados celulares, cada uno de ellos obtenidos en 1 experimento independiente; n = 4).

2.9. – Determinación de moléculas de adhesión, factores de crecimientos y citoquinas mediante ELISA.

Las HAECs se trataron con TNF- α y los metabolitos objeto de estudio a las concentraciones indicadas anteriormente durante 4 h (adhesión) y/o 12 h (migración) tras el tratamiento las células se lisaron, se obtuvo la proteína celular (capítulo 3, **apartado 3.4.4.2**) y se congeló a -80° C. La concentración de proteína se determinó utilizando el kit comercial *DC protein* (capítulo 3, **apartado 3.4.4.1**). Las proteínas específicas que se analizaron en los lisados celulares fueron: s-ICAM-1, VCAM-1, PDGF-BB y PDGF-R- β . Los resultados se presentan como la media aritmética \pm DE de 2 ensayos independientes (cada experimento se realizó con un lisado celular que provenía de la mezcla de 2 lisados celulares, cada uno de ellos obtenidos en 1 experimento independiente; n = 4).

Para el análisis de IL-8, CCL-2 y PAI-1, las células se cultivaron a una densidad de 10^4 células/pocillo (en placas de 96 pocillos) y una vez alcanzada la confluencia, se mantuvieron 12 h en medio sin suero. Las células se trataron con TNF- α y los metabolitos objeto de estudio (a las concentraciones indicadas anteriormente) durante 4 h. Finalizado el tratamiento, el medio de cultivo se guardó a

-80° C hasta el análisis de las citoquinas. Los kit comerciales de ELISA utilizados están descritos en el capítulo 3, **apartado 3.4.4.5**. Este ensayo se realizó por triplicado (n = 3; 6 pocillos por experimento) y los resultados se presentan como la media aritmética ± DE.

2.10. – Análisis estadístico.

El análisis estadístico realizado en los distintos ensayos de este estudio está descrito en el **apartado 3.6** de la sección general de MATERIALES y Métodos.

3. – RESULTADOS.

3.1. – Síntesis enzimática de Uro-A-gluc.

En la **Figura 4.1** se presenta el análisis por HPLC del producto de reacción obtenido tras la incubación de Uro-A con la enzima UGT1A1 en presencia de UDPGA durante 24 h. El pico 1 (Uro-A) se convierte principalmente en un producto único más polar (pico 2). El análisis por LC-MS mostró que este pico 2 tenía una relación m/z^- de 403 y generaba 2 fragmentos con relación m/z^- de 227,1 y 175,2. El análisis por UV mostró además un espectro con tres picos de absorción a 348, 304 y 278 nm. Estos resultados confirmaban la conversión de Uro-A en el monoglucurónido derivado Uro-A-gluc. No se detectó aglicona en el producto final de la reacción o en la fase orgánica (extraída con dietil-éter) con lo que la conversión fue prácticamente total. Aproximadamente, un 10% de Uro-A-gluc se perdía en la fase orgánica. En el cromatograma no se detectó ningún otro monoglucurónido. Sin embargo, sí que se detectó un pequeño pico cuya masa correspondía a la de un diglucurónido (pico 3; Rt: 12,8 min; m/z^- 579,2, 402,9). Basándonos en el espectro de absorción UV, el porcentaje relativo del contenido de diglucurónido en la mezcla fue del 2,5% en relación al

monoglucurónido. En los controles negativos, en ausencia de enzima, en la fracción con dietil-éter se recuperó la totalidad de Uro-A.

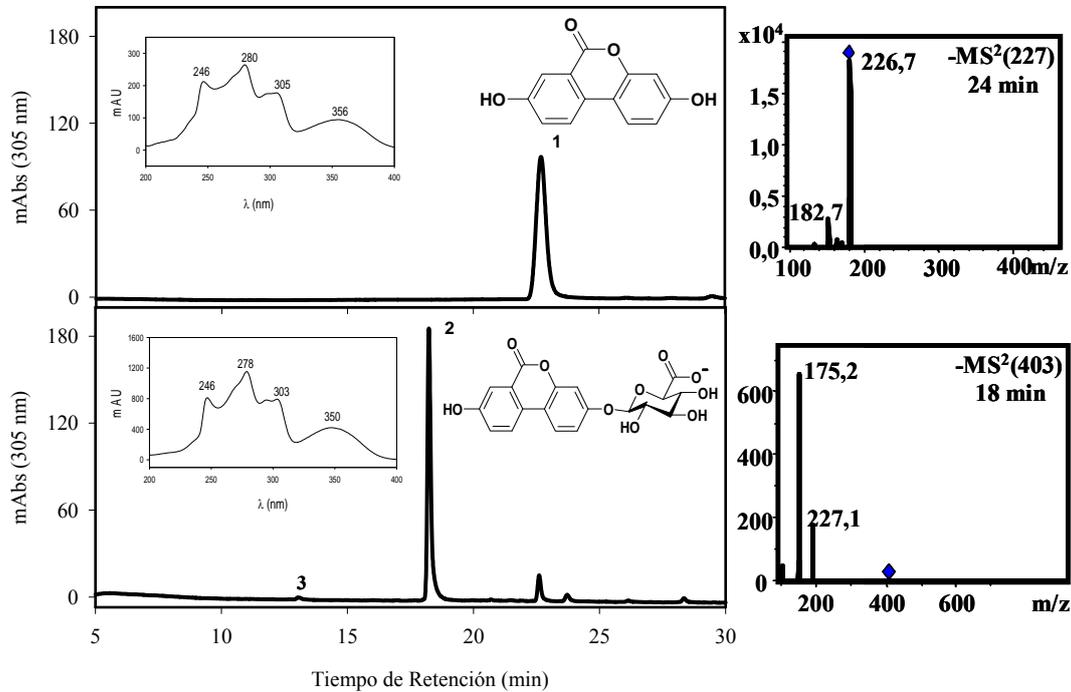


Figura 4.1. Perfil HPLC (305 nm), estructura, espectro de absorción UV y propiedades espectrales de masas de Uro-A (Pico 1; m/z 227) y de Uro-A-gluc (Pico 2; m/z 403; MS-MS m/z 227,1, 175,2). El pico 3 indicó la presencia de una pequeña cantidad de Urolitina-A diglucurónido (Pico 3; m/z 579,2; MS-MS m/z 402,9, 175,0).

La estabilidad de los glucurónidos y de sus agliconas en el medio de cultivo tras 4 y 12 h de incubación se determinó mediante análisis por HPLC-MS/MS del medio de cultivo. Las concentraciones determinadas antes y después de los tratamientos (4 y 12 h) vienen recogidos en la **Tabla 4.3**. Todos los metabolitos resultaron estables en las condiciones experimentales. No se detectó hidrólisis de los glucurónidos a agliconas.

Tabla 4.3. Concentración de agliconas y glucurónidos (μM) en el medio de cultivo de las HAECs a los distintos tiempos de tratamiento.

Metabolito	Horas de tratamiento		
	0h	4h	12h
Uro-A	18,5 \pm 1,1	11,6 \pm 3,1	10,6 \pm 4,0
Uro-A-gluc	12,3 \pm 0,3	16,7 \pm 2,3	15,8 \pm 1,9
Uro-B	14,9 \pm 0,5	18,9 \pm 3,6	17,9 \pm 2,8
Uro-B-gluc	20,4 \pm 2,6	18,4 \pm 3,4	21,7 \pm 0,9

Los resultados se presentan como media aritmética \pm DE de 3 ensayos distintos ($n = 3$).

3.2. – Efecto de los glucurónidos y sus agliconas en la adhesión de monocitos a HAECs activadas con TNF- α .

Para determinar si los glucurónidos y/o sus agliconas presentaban efectos anti-inflamatorios sobre el endotelio vascular, inicialmente estudiamos los efectos de estos metabolitos sobre la adhesión de monocitos THP-1 a las HAECs expuestas a la citoquina inflamatoria TNF- α . La **Figura 4.2** muestra que la incubación de las HAECs con TNF- α (50 ng/mL, 4 h) aumenta significativamente la adhesión de monocitos (incremento del 52%, $p < 0,05$). Solo el metabolito Uro-A-gluc, a la concentración de $\sim 15 \mu\text{M}$, mostró un efecto inhibitor significativo sobre la adhesión de monocitos (inhibición de $\sim 30\%$, $p < 0,05$). Este metabolito no mostró efecto alguno a concentraciones más bajas ($\sim 5 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$).

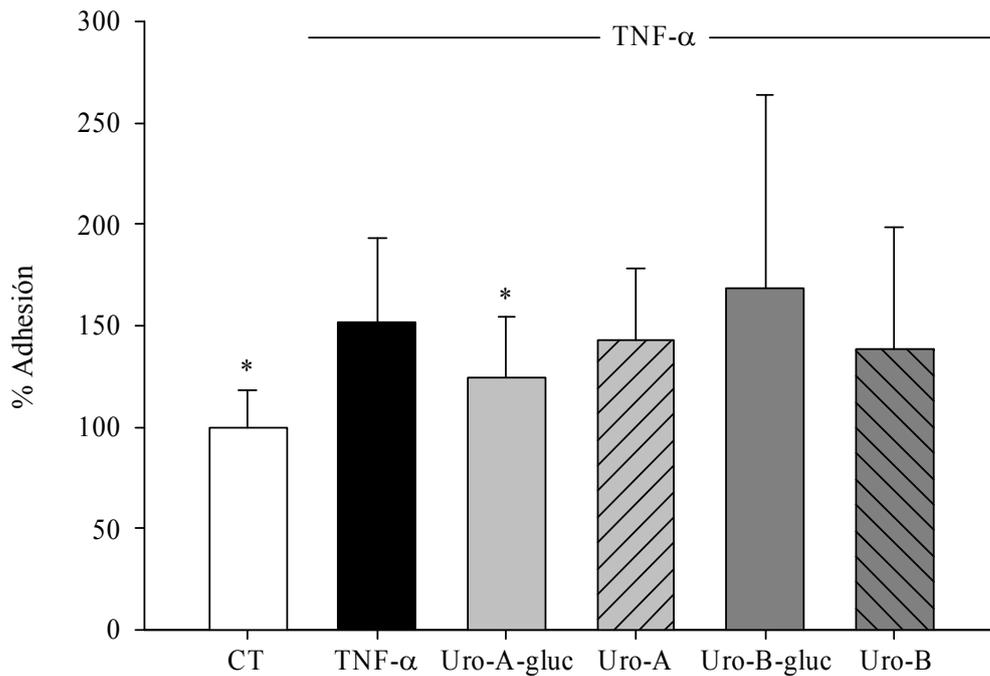
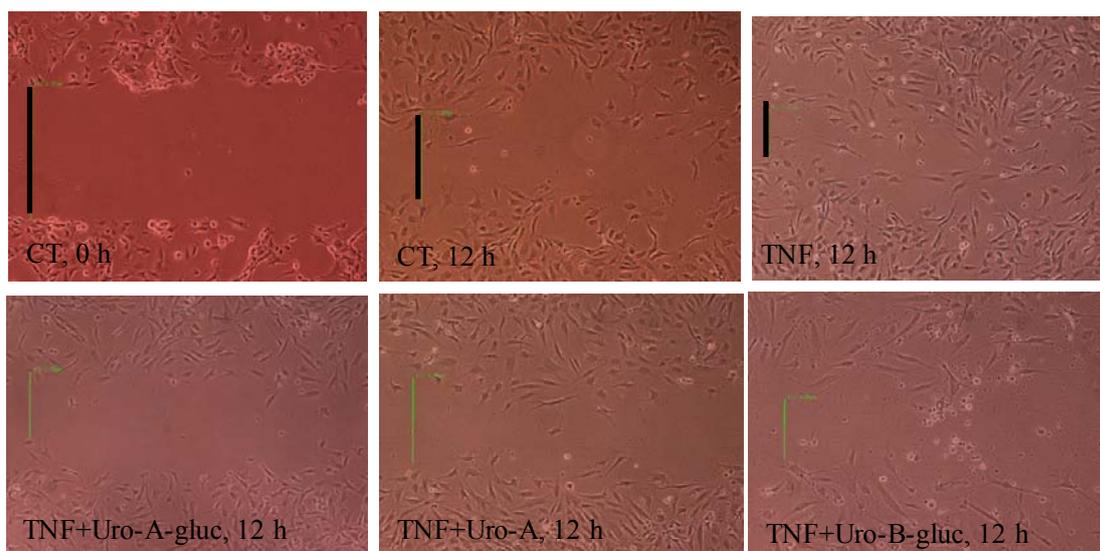


Figura 4.2. Efectos de Uro-A-gluc, Uro-B-gluc y sus respectivas agliconas sobre la adhesión de monocitos sobre las HAECs estimuladas con TNF- α (50 ng/mL). Se llevó a cabo un co-tratamiento con la citoquina pro-inflamatoria y cada uno de los metabolitos (Tabla 4.1) durante 4 h y posteriormente se determinó la adhesión de los monocitos. Los resultados se presentan como la media aritmética \pm DE de 3 experimentos independientes ($n = 3$; 6 pocillos por ensayo). Los símbolos indican diferencias respecto de las muestras tratadas con TNF- α , * $p < 0,05$.

3.3. – Efecto de los glucurónidos y sus agliconas sobre la migración celular de HAECs activadas.

El efecto del TNF- α y de los glucurónidos y sus agliconas sobre la migración de HAECs se muestra en la **Figura 4.3.a y 4.3.b**. La migración de estas células se indujo de forma moderada tras el tratamiento con TNF- α durante 12 h (inducción de $\sim 20\%$, $p < 0,01$) (**Figura 4.3.b**). El co-tratamiento de las células con TNF- α y los metabolitos ($\sim 15 \mu\text{M}$) disminuyó la distancia recorrida por las células respecto del grupo control aunque esta disminución fue más significativa con Uro-A-gluc y Uro-A ($p < 0,05$) que con Uro-B-gluc ($p < 0,1$), mientras que Uro-B no mostró efecto sobre la migración.

a)



b)

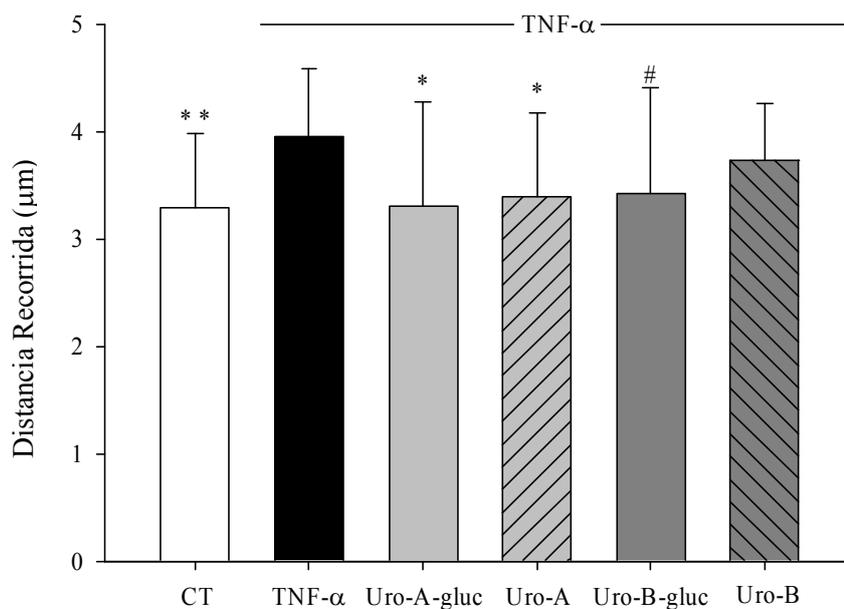


Figura 4.3. Efectos de Uro-A-gluc, Uro-B-gluc y sus respectivas agliconas sobre la migración de HAECs estimuladas con TNF- α (50 ng/mL). Se llevó a cabo un co-tratamiento con la citoquina pro-inflamatoria y cada uno de los metabolitos (Tabla 4.1) durante 12 h y posteriormente se determinó la distancia recorrida; a) fotografías representativas que muestran la migración de las HAECs en medio control a 0 y 12 h. Efecto del TNF- α solo y en comparación a los co-tratamientos con cada uno de los metabolitos; b) histograma sobre la distancia recorrida por las HAECs calculada como la diferencia entre la distancia de la brecha a 0 h y tras 12 h de incubación. Los resultados se presentan como media aritmética \pm DE de, como mínimo, 3 experimentos independientes ($n = 3 - 5$; 2 pocillos por ensayo). Los símbolos indican diferencias respecto de las muestras tratadas con TNF- α , * $p < 0,05$; # $p < 0,1$.

A la concentración de 5 μM , solamente Uro-A-gluc y Uro-B-gluc inhibieron la migración inducida por TNF- α ($\sim 20\%$, $p < 0,05$ y $p < 0,1$ respectivamente) mientras que a 1 μM no se observó efecto. Las urolitinas, tanto agliconas como glucurónidos, no presentaron efectos sobre la migración de las HAECs en ausencia de la citoquina pro-inflamatoria.

Para determinar si los tratamientos con los metabolitos de las urolitinas generaban citotoxicidad, se llevó a cabo un ensayo de MTT. Ninguno de los tratamientos provocó cambios en la reducción del MTT lo que indicó que la respuesta de las células a los metabolitos de las urolitinas no se debía a efectos tóxicos de estos compuestos.

3.4. – Antibody arrays.

Para el estudio de los posibles cambios en los niveles de expresión de citoquinas relacionadas con adhesión y factores de crecimiento relacionados con migración, se seleccionó el tratamiento con Uro-A-gluc ya que este metabolito es el que presentó los resultados más significativos en los ensayos de migración y adhesión. Además, Uro-A-gluc es el metabolito más abundante encontrado en plasma (Cerdá *et al.*, 2004; González-Sarrías *et al.*, 2010b). Como Uro-A mostró efectos inhibitorios sobre la migración, se estudiaron también sus posibles efectos moduladores sobre factores de crecimiento. Para el estudio simultáneo de citoquinas y proteínas relacionadas con la adhesión y de factores de crecimiento asociados a la migración, se utilizaron los *antibody arrays* de humanos descritos en el capítulo 3 (**apartado 3.4.4.4**). El perfil completo de proteínas del *array* y las diferencias detectadas para cada una de ellas entre los grupos experimentales se incluyen en el **Anexo I** (marcadores de adhesión) y **Anexo II** (factores de crecimiento). En la **Tabla 4.4** se muestra una selección de las

proteínas de adhesión y factores de crecimiento cuyos niveles de expresión se alteraron de forma más significativa con los tratamientos.

Tabla 4.4. Perfil de expresión de proteínas de adhesión y factores de crecimiento que mayores cambios mostraron en las HAECs tras el tratamiento con TNF- α y el co-tratamiento con Uro-A o Uro-A-gluc

Proteína	TNF- α /Ct		TNF- α + Uro-A /TNF- α		TNF- α + Uro-A-gluc /TNF- α	
	Símbolo	Cambio (n° veces)	Valor- <i>p</i>	Cambio (n° veces)	Valor- <i>p</i>	Cambio (n° veces)
IGF-II	-1,92	0,155	NC	-	2,68	0,002
PDGF-BB	2,41	0,148	-2,04	0,005	-3,06	0,139
CCL2	7,71	0,004	NA	-	-1,32	0,068
IL-8	6,19	0,083	NA	-	NC	-
SELE	5,96	0,003	NA	-	NC	-
ICAM-1	2,96	0,052	NA	-	NC	-
PDGF-AB	1,73	-	-1,76	0,015	-2,38	0,181
VCAM-1	5,57	0,016	NA	-	NC	-
IGF-I sR	1,96	-	-2,50	0,068	-2,56	0,122
PDGF-AA	1,63	-	-2,0	0,015	-2,04	0,161
PDGFR β	1,42	-	-1,96	0,095	-1,61	-
SCF	2,55	0,196	-2,17	0,107	-3,33	0,054
M-CSF	1,09	-	-1,11	-	2,21	0,024
M-CSFR	-1,63	0,136	NC	-	2,35	0,003
GDNF	-2,85	-	2,54	-	2,43	0,003
NT3	NC	-	NC	-	1,96	0,035
ICAM-2	-21,2	0,004	NA	-	3,75	-

El valor umbral de referencia fue $\geq 1,3$ para la sobre-expresión y $\leq -1,3$ para la disminución de la expresión. A cada valor de intensidad de cada punto del *array* se le ha restado su valor de ruido de fondo y se han normalizado con los controles positivos. Los extractos celulares se obtuvieron de dos placas de cultivo que se mezclaron e hibridaron en una membrana. Los datos se presentan como media aritmética \pm DE de dos ensayos independientes ($n = 2$; proteínas por duplicado en el *array*). Los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) se indicaron. Valores $p < 0,2$ se indicaron para indicar tendencia. Abreviaturas: NC: sin cambio; NA: no analizado.

El análisis densitométrico evidenció que las moléculas de adhesión CCL2, IL-8, Selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1, así como varios factores de crecimiento derivados de plaquetas como PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-AA y los receptores IGF-I sR, PDGF-R- β y el SCF se sobre-expresaron en las HAECs tratadas con TNF- α . El co-tratamiento de TNF- α con Uro-A-gluc revertió en parte los cambios inducidos por TNF- α en CCL2, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-AA, PDGF-R- β , IGF-I sR y SCF. Uro-A también redujo de manera significativa los niveles de expresión de PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-AA, IGF-I sR y SCF. Por otro lado, el tratamiento con TNF- α redujo la expresión de IGF-II, M-CSFR, GDNF e ICAM-2, mientras que el co-tratamiento con Uro-A-gluc o su aglicona aumentaron la expresión de estas proteínas.

3.5. – Análisis de los efectos sobre citoquinas y factores de crecimiento mediante ELISA.

Para validar algunos de los resultados del *antibody array*, utilizamos la técnica de ELISA para medir las concentraciones de algunos factores de crecimiento, moléculas de adhesión y quimioquinas seleccionadas (**Figura 4.4**, a-d y **Figura 4.5**, a-b). Los resultados de este análisis corroboraron que la estimulación de las HAECs con TNF- α (50 ng/mL; 4 h) incrementó la expresión de manera significativa ($p < 0,001$) de IL-8 (7,5 veces), CCL2 (9,7 veces), VCAM-1 (9,8 veces) e ICAM-1 (200 veces) (**Figura 4.4**, a-d). Al igual que en los resultados obtenidos con el *antibody array*, el co-tratamiento de las HAECs con TNF- α y Uro-A-gluc (15 μ M) confirmó que los niveles de CCL2 excretados al medio de cultivo eran menores (0,5 veces, $p < 0,01$) en comparación con el grupo estimulado solo con TNF- α (**Figura 4.4b**), mientras que los niveles de IL-8 no diferían de manera significativa del grupo tratado con la citoquina pro-inflamatoria (**Figura 4.4a**). Ensayos a concentraciones menores de Uro-A-gluc (5 μ M o 1 μ M) no

causaron tampoco ningún efecto sobre los niveles de CCL2. En relación con las moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1, Uro-A-gluc no modificó los niveles de estas proteínas respecto al tratamiento con TNF- α (Figura 4.4, c-d). Asimismo, se determinaron los efectos de Uro-A (15 μ M) sobre los niveles de IL-8 y de CCL2 liberados al medio de cultivo y se observó que el tratamiento con la aglicona disminuía los niveles de IL-8 (0,6 veces, $p < 0,05$) y de CCL2 (0,7 veces, $p < 0,01$) respecto al tratamiento con la citoquina pro-inflamatoria (Figura 4.4, a-b). Uro-A también disminuyó los niveles de IL-8 pero no de CCL2 a la concentración de 5 μ M (0,75 veces, $p < 0,05$).

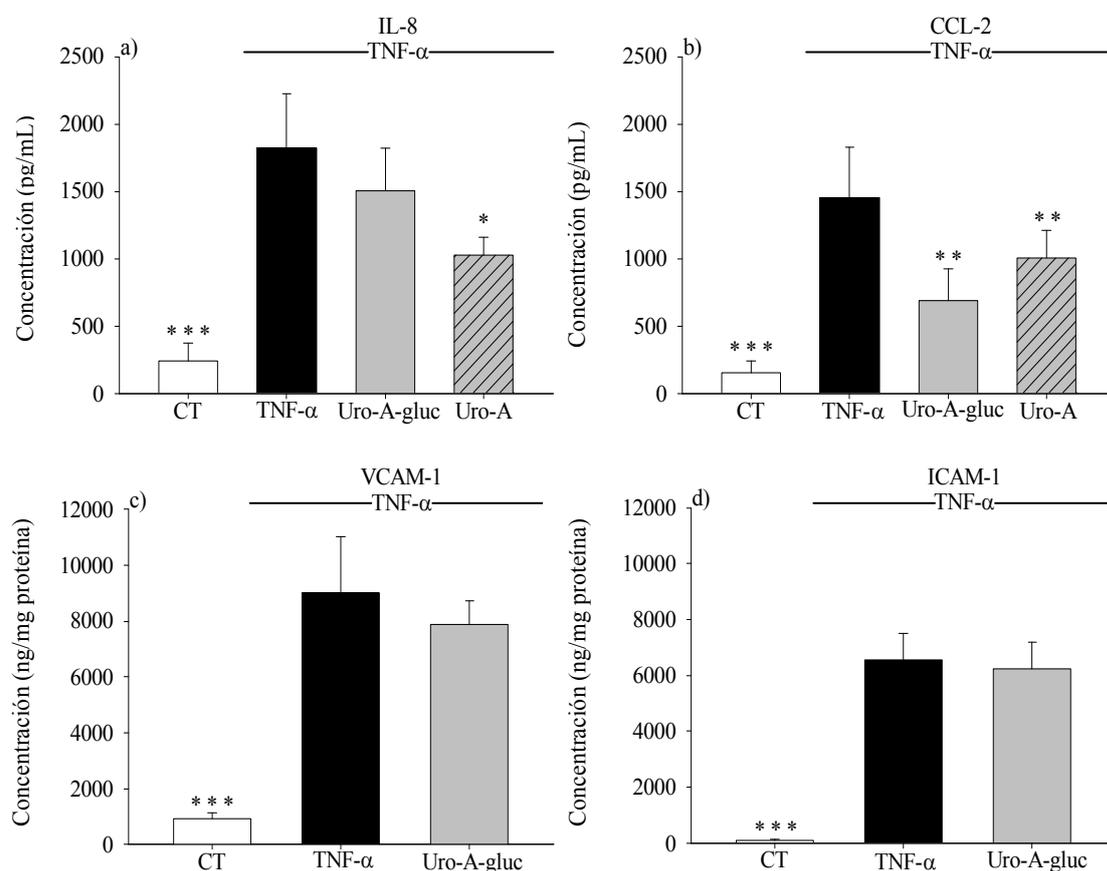


Figura 4.4. Niveles de quimioquinas y moléculas de adhesión determinados por ensayo de ELISA en los sobrenadantes o extractos de proteína celular de las HAECs expuestas a TNF- α (50 ng/mL) y cada uno de los metabolitos. En a) y b) se representan los niveles de IL-8 y de CCL-2 al medio de cultivo tras 4 h de tratamiento ($n = 3$; 3 pocillos por experimento). En c) y d) los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 en los extractos celulares tras 4 h de tratamiento ($n = 2$; cada uno de los extractos celulares provenía de la mezcla de la proteína extraída de 2 experimentos independientes; $n = 4$). Los datos se presentan como media aritmética \pm DE. Los símbolos indican diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La estimulación de las células endoteliales con TNF- α durante 12 h también causó una inducción moderada de los niveles de PDGF-R- β (1,3 veces, $p < 0,1$) mientras que el co-tratamiento con Uro-A-gluc o su aglicona disminuyó esta subida de manera moderada (0,75 veces, $p < 0,1$) (Figura 4.5, a). En el caso de PDGF-BB no se observaron cambios significativos. La estimulación con TNF- α durante 12h indujo moderadamente los niveles de PDGF-R- β (1,3 veces, $p < 0,1$) mientras que el co-tratamiento con Uro-A-gluc y su aglicona disminuyó esta subida de manera moderada (0,75 veces, $p < 0,1$) (Figura 4.5, b). En el caso de PDGF-BB no se observaron cambios significativos.

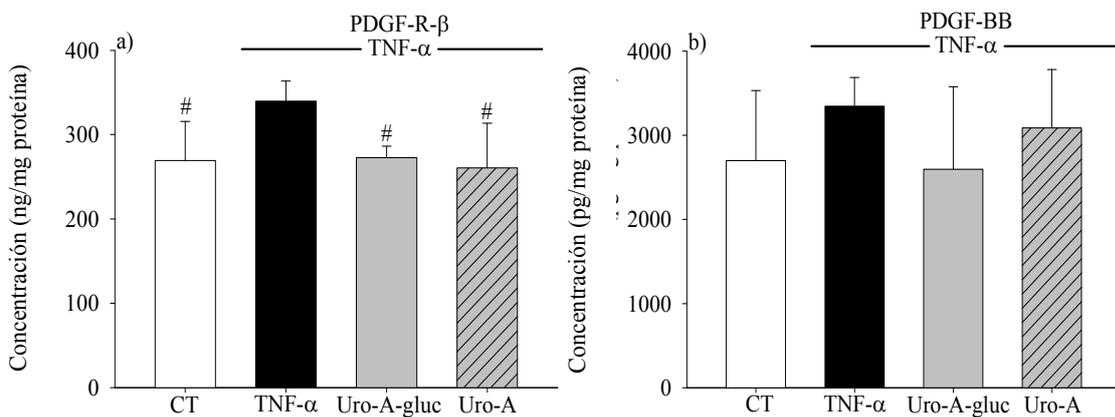


Figura 4.5. Niveles de factores de crecimiento determinados por ensayo de ELISA en los extractos de proteína celular de las HAECs expuestas a TNF- α (50 ng/mL) y cada uno de los metabolitos. En a) y b) se representan los niveles de PDGF-BB y PDGF-R- β en los extractos celulares tras 4 h de tratamiento. Los datos se presentan como media aritmética \pm DE de 2 experimentos independientes ($n = 2$; 3 pocillos por ensayo). Los símbolos indican diferencias significativas: # $p < 0,1$.

Además de los marcadores seleccionados, también se investigaron los cambios en los niveles de expresión de PAI-1. Se observó una importante inducción de esta proteína (4,5 veces) tras el tratamiento con TNF α ($p < 0,001$) y una ligera pero significativa disminución tras el co-tratamiento con Uro-A-gluc (0,8 veces, $p < 0,01$) (Figura 4.6).

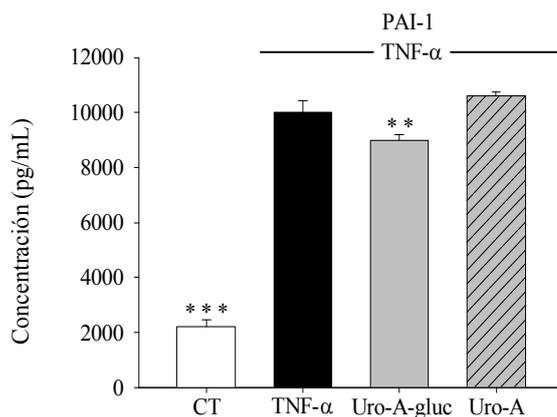


Figura 4.6. Niveles de PAI-1 medidos por ensayo ELISA en el medio de cultivo de las HAECs tratadas con TNF- α (50 ng/mL) y cada uno de los metabolitos durante 4 h. Los datos se presentan como media aritmética \pm DE de un mínimo de 3 experimentos independientes (n = 3 – 5; 3 pocillos por experimento). Los símbolos indican diferencias significativas respecto al grupo TNF- α ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4. – DISCUSIÓN

La relación entre los efectos cardioprotectores atribuidos a los compuestos fenólicos de la dieta y las moléculas que son las verdaderas responsables de estos efectos no está del todo clara. Esto se debe, en parte, a que existen algunas cuestiones claves sin resolver: i) identificación y cuantificación de los metabolitos formados *in vivo* tras la ingesta de los compuestos fenólicos; ii) distribución específica en los tejidos y mecanismos moleculares que se desencadenan en las células por acción de esos metabolitos (Cerdá *et al.*, 2004; Espín *et al.*, 2007b; González-Sarriás *et al.*, 2009c; Azorín-Ortuño, 2011c; Kaway, 2011). Teniendo en cuenta estos dos aspectos, en el presente trabajo se han investigado algunos de los efectos anti-inflamatorios en células endoteliales de aorta y posibles mecanismos moleculares de los principales metabolitos detectados en plasma derivados de los ETs de la dieta, Uro-A-gluc y Uro-B-gluc, y sus respectivas agliconas. Entre los metabolitos estudiados, Uro-A-gluc a concentraciones en el rango micromolar (~5 – 15 μ M) inhibió de forma significativa la adhesión de monocitos a las HAECs así como la migración de estas células. Estos efectos se asociaron con una disminución moderada pero también significativa de los niveles de

CCL2 y PAI-1. La aglicona, Uro-A, inhibió la migración de las células endoteliales pero no la adhesión de monocitos y redujo los niveles de CCL2 y de IL-8 inducidos por TNF- α .

El estudio de los metabolitos derivados de los compuestos fenólicos de la dieta como las posibles moléculas bioactivas responsables de los efectos beneficiosos atribuidos a estos compuestos se ha estudiado relativamente poco debido fundamentalmente a la falta de cantidades suficientes de estos metabolitos puros que permita llevar a cabo las investigaciones, así como a la dificultad y el coste de su síntesis química. No obstante, en los últimos años se ha incrementado el número de trabajos que se centran en la síntesis de metabolitos y conjugados de los compuestos fenólicos detectados en humanos y animales. Para ello se han utilizado procesos químicos más o menos complejos que constan de varias etapas y que suelen generar mezclas de metabolitos que precisan de procesos de purificación, por ejemplo a través de cromatografía (Fumeaux *et al.*, 2010; González-Manzano *et al.*, 2009). El uso de protocolos enzimáticos para la síntesis de estos metabolitos es un campo menos estudiado que el de la síntesis química. Oleary *et al.* (2001) sintetizaron una mezcla de glucurónidos de quercetina utilizando un extracto de hígado de cerdo libre de células en combinación con ácido glucurónico-UDP. En otro estudio se utilizaron UDP-glucuronosil transferasas humanas recombinantes (UGTs) para glucuronidar varios metabolitos fúngicos. Entre las UGTs estudiadas, la UGT1A1 exhibió la mayor actividad frente a los substratos (Pfeiffer *et al.*, 2010). En nuestro trabajo comparamos la glucuronidación de Uro-A con UGT1A1 y UGT1A10 y se observó que bajo las mismas condiciones de incubación, UGT1A1 era más eficiente que UGT1A10 en la producción de los conjugados y por ello utilizamos UGT1A1 para sintetizar el glucurónido de Uro-A. Como se observa en el perfil de HPLC (**Figura 4.1**) y en función

de los resultados del espectro de absorción y los espectros de masas (González-Barrio *et al.*, 2011), el principal producto que se detectó fue un monoglucurónido de Uro-A (Uro-A-gluc). El método enzimático nos permitió producir cantidades suficientes de este metabolito con fines analíticos así como para estudiar su bioactividad en los ensayos celulares (de un total inicial de ~3,0 mg de Uro-A se obtuvieron ~4,6 mg de Uro-A-gluc, ~87% de rendimiento). Asumimos que el glucurónido está localizado en la posición 3 de la molécula de Uro-A (**Figura 4.1**) ya que el otro metabolito relevante, Uro-B-gluc, es el 3-glucurónido. Sin embargo, la posición exacta de la molécula de ácido glucurónico (posición 8- o 3-) en Uro-A-gluc aún no se ha establecido. En nuestro grupo hemos sintetizado después Uro-A-gluc por procedimientos químicos que la resonancia magnética nuclear (RMN) identifica como la mezcla de los dos regioisómeros, Uro-A-3-gluc y Uro-A-8-gluc. Ambos regioisómeros co-eluyen en un único pico cromatográfico presentando el mismo tiempo de retención y los mismos espectros MS/MS y UV. Aún no hemos conseguido la separación de estos dos compuestos. Además la Uro-A-gluc detectada en plasma y orina en estudios animales y humanos (Espín *et al.*, 2007; Cerdá *et al.*, 2004; González-Sarrías *et al.*, 2010b) tiene las mismas propiedades cromatográficas que los compuestos sintetizados química y enzimáticamente. Por lo tanto, no podemos descartar que los compuestos sintetizados enzimáticamente puedan comportarse como una mezcla de dos posibles monoglucurónidos.

La disminución del efecto inflamatorio inducido por TNF- α y, en concreto, la reducción de la adhesión de monocitos a las células endoteliales es un mecanismo clave en el control de la inflamación y de la formación de la placa de ateroma (Zagorchev *et al.*, 2011). Nuestros resultados indican que la exposición de las HAECs a Uro-A-gluc, el principal metabolito derivado de los ETs de la dieta, a concentraciones en el rango

micromolar (~15 μM) se asocia con una leve reducción, aunque significativa, de la adhesión de monocitos THP1 a las HAECs inducida por TNF- α .

Por otra parte, la teoría reciente designada como “*outside-in*” sobre el inicio de la inflamación en arterias sugiere que la inflamación podría iniciarse también en la capa adventicia de las arterias. Esta teoría se apoya en la observación del incremento de la neovascularización (*vasa vasorum*) en lesiones de la capa íntima y la placa de ateroma (Zagorchev *et al.*, 2011). Mientras que moléculas pro-angiogénicas como VEGF y TNF- α se asocian al crecimiento de lesiones de la íntima, otras moléculas anti-angiogénicas son inhibidores efectivos de la densidad del *vasa vasorum* y del desarrollo de la placa de ateroma (Gössl *et al.*, 2009). La migración de las células endoteliales es un componente esencial del proceso angiogénico que está regulado por diferentes citoquinas, incluyendo factores de crecimiento, interleuquinas y TNF- α (Yoshida *et al.*, 1997). En el presente trabajo, se ha demostrado que la migración de células HAECs inducida por TNF- α se redujo tras 12 h de exposición a algunos de los metabolitos derivados de los ETs, más significativamente a Uro-A-gluc y a Uro-A, lo que sugiere un moderado efecto anti-angiogénico de estos compuestos.

En general los efectos anti-inflamatorios y anti-angiogénicos inducidos por estos metabolitos de ETs, están asociados a cambios modestos en los niveles de expresión de marcadores específicos moleculares implicados en estos procesos como mostraron los ensayos con *antibody arrays* y ELISA. Aunque la técnica de *antibody arrays* ha mejorado mucho durante los últimos años, a día de hoy es una técnica de elevado coste lo que limita el número de réplicas que pueden realizarse. Como ocurre con otras tecnologías de *arrays* (*microarrays* de expresión génica), los *antibody arrays* se utilizan, como norma general, como un barrido o *screening* semicuantitativo que requiere de posterior validación por otra técnica. Los *antibody arrays* de RayBio

parecen generar datos reproducibles con un bajo coeficiente de variación *intra-array* y una elevada correlación entre réplicas (Li *et al.*, 2011). También han sido validados de manera eficiente por ensayos de ELISA (Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). En nuestro estudio, utilizamos varios ensayos ELISA para confirmar algunos de nuestros resultados de los *arrays*. Bajo nuestras condiciones experimentales, la adhesión de monocitos inducida por TNF- α a las HAECs, se asoció con un aumento de IL-8 y CCL2 al igual que con las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. La Uro-A-gluc redujo de manera efectiva la adhesión de los monocitos y disminuyó significativamente la producción de CCL2 inducida por TNF- α , aunque no tuvo efectos sobre las moléculas de adhesión o IL-8. Estos resultados se observaron tanto en los ensayos por ELISA como por *antibody array*. El ensayo por ELISA también evidenció que Uro-A disminuyó significativamente los niveles de CCL2, un regulador clave en la migración de monocitos que está sobre-expresado en aterosclerosis (Deshmane *et al.*, 2009), y de IL-8, una citoquina quimioatrayente de linfocitos y un potente regulador de angiogénesis inducida por inflamación (Yoshida *et al.*, 1997; Szekanecz *et al.*, 1994). Además, los resultados que obtuvimos con el análisis por *antibody array* mostraron que PDGF-BB, PDGF-AB y PDGF-AA, 3 isoformas miembros de la familia PDGF, se sobre-expresan en las HAECs por la acción de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α . Tanto Uro-A como Uro-A-gluc disminuyeron este incremento en los niveles de estos factores de crecimientos. Los PDGFs se unen a dos receptores transmembrana tirosín quinasa, PDGF-R- α y PDGF-R- β , activando rutas de señalización posteriores (Barrientos *et al.*, 2008). En particular, se ha descrito que PDGF-BB aumenta el crecimiento y la migración de las HAECs (Imanishi *et al.*, 2000) y propaga sus señales mitogénicas a través de la unión y fosforilación de su receptor PDGF-R- β (Takimoto *et al.*, 2011). Los ensayos con la técnica de ELISA evidencian que los niveles de PDGF-R-

β aumentaron levemente en las HAECs tratadas con TNF- α , mientras que los niveles retornaban a valores control cuando las células se co-trataban con Uro-A-gluc y su aglicona, aunque estos resultados no fueron significativos. En general, nuestros resultados indican una buena correlación entre los *antibody array* RayBio utilizados en este estudio y los ensayos de ELISA. Sin embargo, no se pudieron detectar cambios en los niveles de PDGF-BB utilizando la técnica de ELISA lo que podría deberse a diferencias entre los anticuerpos utilizados en el *array* y los seleccionados para el ELISA.

Tras la estimulación con TNF- α , Uro-A-gluc redujo significativamente los niveles de PAI-1, un potente regulador de la migración de células vasculares y de angiogénesis (Stefansson *et al.*, 2003). Niveles elevados de PAI-1 se asocian a lesiones ateroscleróticas y la expresión de PAI-1 aumenta con los estímulos inflamatorios y disminuye por acción de drogas como las estatinas utilizadas en pacientes con ECVs (Kruithof, 2008). En definitiva, estos resultados indican que Uro-A-gluc, uno de los metabolitos más abundantes y que se detectan con mayor frecuencia en el plasma tras la ingesta de alimentos que contienen ETs, reduce la respuesta inflamatoria en las HAECs disminuyendo la adhesión de monocitos, la migración de las células endoteliales y la regulación de los niveles de varios marcadores angiogénicos y quimiotácticos, en particular, CCL2 y PAI-1. Bajo las condiciones del estudio (bajas concentraciones, rango μM), todos los cambios observados fueron moderados.

En los últimos años se ha incrementado el número de estudios *in vitro* publicados que investigan el posible papel de los compuestos fenólicos de la dieta frente a las ECVs, en condiciones más representativas de la situación *in vivo*. Por ejemplo, se estudian concentraciones más bajas (rango μM) de los metabolitos circulantes en plasma frente a las células del sistema vascular. Así, por ejemplo, se han estudiado los

efectos de quercetina y algunos de sus principales conjugados, en particular, quercetina-3-glucurónido (Q3GA) sobre células endoteliales, células de musculo liso vascular o macrófagos bajo condiciones inflamatorias (Tribolo *et al.*, 2008; Ishizawa *et al.*, 2011; Winterbone *et al.*, 2009; Suri *et al.*, 2008; Al-Shalmani *et al.*, 2011). Aunque estos estudios se han llevado a cabo utilizando diferentes tipos celulares y en distintas condiciones y/o tratamientos con los metabolitos, en general, parece que la quercetina (aglicona) es más eficiente que Q3GA disminuyendo los niveles de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 o de CCL2. Sin embargo, también se han descrito efectos moderados del glucurónido conjugado de quercetina (Al-Shalmani *et al.*, 2011). Aunque es difícil extrapolar estos datos a la situación real *in vivo*, en conjunto, nuestros resultados junto con otros estudios apoyan la hipótesis de que el consumo durante largos períodos de tiempo de alimentos que contienen compuestos fenólicos podrían mantener un cierto nivel (concentraciones bajas en torno a μM) de los principales metabolitos derivados circulantes en plasma y que esos metabolitos podrían entrar e interactuar con el tejido aórtico. De hecho, algunos metabolitos como Q3GA y glucurónidos de resveratrol han sido localizados en el tejido aórtico (Ishizawa *et al.*, 2011; Winterbone *et al.*, 2009; Suri *et al.*, 2008; Al-Shalmani *et al.*, 2011; Azorín-Ortuño *et al.*, 2011). Los metabolitos, por lo tanto, podrían modular algunos de los procesos celulares que conducen a la aterosclerosis y reducir el riesgo de desarrollo de esta enfermedad.

ANEXO I

Tabla suplementaria S4.1. Perfil de expresión de proteínas de adhesión en HAECs.

Proteína	TNF / CT		TNF+Uro-A-gluc / TNF	
Símbolo	Cambio (n° veces)	Valor p	Cambio (n° veces)	Valor p
<i>Nivel de expresión relativa elevado ($\geq 0,25$)</i>				
CCL2	7,71	0,004	-1,32	0,068
IL-8	6,19	0,083	NC (1,05)	-
SELE	5,96	0,003	NC (1,06)	-
ICAM-1	2,96	0,052	NC (1,28)	-
ALCAM	NC (1,04)	-	NC (1,02)	-
PECAM-1	-1,37	-	-1,13	-
CDH3	-1,33	-	NC (1,21)	-
SELL	-1,45	-	NC (1,05)	-
BCAM	1,33	-	NC (-1,05)	-
<i>Nivel de expresión relativa moderado ($< 0,25$ y $\geq 0,10$)</i>				
VCAM-1	5,57	0,016	NC (-1,29)	-
CDH5	1,36	-	NC (1,04)	-
PF-4	NC (-1,15)	-	-2,67	-
CD 14	-2,21	0,138	-1,76	-
CEACAM-1	1,84	-	-1,42	-
SELP	-1,72	-	2,25	-
<i>Nivel de expresión relativa bajo o muy bajo ($< 0,10$)</i>				
CDH1	2,72	-	NC (1,07)	-
VEGF-C	NC (-1,20)	-	1,81	-
ICAM-3	1,47	0,172	NC (1,06)	-
ICAM-2	-21,2	0,004	3,75	-
EpCAM	28,7	-	NC (1,03)	-

Valor de corte $\geq 1,3$ para sobre-expresión y $< -1,3$ para disminución de la expresión. A cada valor de intensidad de cada punto se le ha restado su valor de ruido de fondo y se han normalizado con los controles positivos. Los extractos celulares se obtuvieron de dos placas que se mezclaron e hibridaron en una membrana. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 2; proteínas por duplicado en el array). Los valores de $p < 0,05$ se indican entre paréntesis. Los valores de $p < 0,2$ también se muestran para indicar tendencia. Abreviaturas: NC: sin cambio.

ANEXO II

Tabla Suplementaria S4.2. Perfil de cambios de expresión de los factores de crecimiento en HAECs

Proteína	TNF/CT		TNF+Uro-A / TNF		TNF+Uro-A-gluc /TNF	
	Cambio	Valor p	Cambio	Valor p	Cambio	Valor p
<i>Nivel de expresión relativo elevado ($\geq 0,25$)</i>						
EGF	NC (1,30)	-	-1,43	-	-1,35	-
IGF-II	-1,92	0,155	NC (1,30)	-	2,68	0,002
PDGF-BB	2,41	0,148	-2,04	0,005	-3,06	0,139
<i>Nivel de expresión relativo moderado (<0,25 y >0,1)</i>						
PDGF-AB	1,73	-	1,76	0,015	-2,38	0,181
<i>Nivel de expresión relativo bajo (<0,1 y >0,01)</i>						
HB-EGF	NC (-1,25)	-	NC (-1,25)	-	NC (1,16)	-
IGF-I	1,99	-	-2,04	0,103	-2,43	-
IGFBP-1	NC (-1,06)	-	NC (-1,21)	-	NC (-1,05)	-
IGFBP-2	NC (1,09)	-	NC (-1,28)	-	-1,36	-
IGFBP-6	1,72	-	-1,4	-	-2,12	-
IGF-I sR	1,96	-	-2,5	0,068	-2,56	0,122
PDGF-AA	1,63	-	-2	0,015	-2,04	0,161
PDGFR β	1,42	-	-1,96	0,095	-1,61	-
bFGF	-1,16	-	-1,36	-	NC (-1,14)	-
FGF4	NC (1,27)	-	NC (-1,05)	-	-1,49	-
FGF6	2,45	-	-1,96	-	-4,76	0,169
FGF7	1,74	-	-1,82	-	-2,7	0,169
TGF β	-1,47	-	NC (1,01)	-	3,02	-
TGF β 2	NC (-1,17)	-	NC (-1,29)	-	2,27	-
TGF β 3	1,77	-	-1,72	-	NC (1,05)	-
VEGF	1,55	-	-1,88	-	1,55	-
VEGF-D	1,85	-	-1,61	-	NC (1,06)	-
VEGF R2	NC (1,01)	-	-1,72	-	NC (1,20)	-
VEGF R3	1,97	-	-1,85	-	NC (1,01)	-
SCFR	-3,03	-	NC (1,28)	-	4,48	-
SCF	2,55	0,196	-2,17	0,107	-3,33	0,054
M-CSF	NC (1,09)	-	NC (-1,11)	-	2,21	0,024
M-CSFR	-1,63	0,136	NC (-1,28)	-	2,35	0,003
GM-SCF	2	-	-1,96	-	1,46	-
bNGF	NC (-1,12)	-	NC (-1,36)	-	NC (-1,25)	-
GDNF	-2,85	-	2,54	-	2,43	0,003
NT3	NC (-1,29)	-	NC (-1,13)	-	1,96	0,035
NT4	NC (-1,29)	-	-2,32	-	1,38	-
AR	NC (-1,26)	-	NC (-1,30)	-	NC (1,09)	-
PIGF	3,54	0,187	-2,08	0,167	-3,22	0,101

Tabla Suplementaria S4.2 (continuación). Perfil de expresión de los factores de crecimiento en HAECs

Proteína	TNF/CT		TNF+Uro-A / TNF		TNF+Uro-A-gluc / TNF	
	Cambio (nº veces)	Valor p	Cambio (nº veces)	Valor p	Cambio (nº veces)	Valor p
<i>Nivel de expresión relativo bajo o no detectable (<0,01)</i>						
HGF	-	-	-	-	-	-
PDGFR α	-	-	-	-	-	-
EGFR	-	-	-	-	-	-
TGF- α	-	-	-	-	-	-
IGFBP-3	-	-	-	-	-	-
IGFBP-4	-	-	-	-	-	-
GCSF	-	-	-	-	-	-

Valor de corte $\geq 1,3$ para sobre-expresión y $< -1,3$ para disminución de la expresión. A cada valor de intensidad de cada punto se le ha restado su valor de ruido de fondo y se han normalizado con los controles positivos. Los lisados celulares se obtuvieron de dos placas que se mezclaron e hibridaron en una membrana. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 2; proteínas por duplicado en el *array*). Los valores de $p < 0,05$ se indican entre paréntesis. Los valores de $p < 0,2$ también se muestran para indicar tendencia. Abreviaturas: NC: sin cambio.

CAPÍTULO 5

El ácido elálgico y los metabolitos intestinales derivados de elagitaninos, urolitinas, atenúan la inflamación inducida por las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 β y TNF- α , en miofibroblastos de colon humano y modulan marcadores moleculares asociados.

El ácido elágico y los metabolitos intestinales derivados de elagitaninos, urolitinas, atenúan la inflamación inducida por las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 β y TNF- α , en miofibroblastos de colon humano y modulan marcadores moleculares asociados.

RESUMEN

Los elagitaninos (ETs), compuestos fenólicos abundantes en la granada, se hidrolizan en el estómago e intestino para formar ácido elágico (EA) que, por acción de la microbiota intestinal, se transforman en urolitinas (Uro-A y Uro-B). Estos compuestos exhiben actividad anti-inflamatoria *in vitro* e *in vivo*. El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de Uro-A, Uro-B y EA sobre miofibroblastos de colon, células que juegan un papel importante en la inflamación intestinal. La línea celular de miofibroblastos de colon humano, CCD18-Co, se trató con una mezcla de Uro-A, Uro-B y EA, a concentraciones similares a las detectadas en colon (40 μ M Uro-A, 5 μ M Uro-B, 1 μ M de EA), en presencia y en ausencia de IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL) y se estudiaron los efectos sobre la adhesión de monocitos a miofibroblastos y la migración de miofibroblastos. Además, se investigaron los niveles de citoquinas y quimioquinas implicadas con el proceso de adhesión y los niveles de factores de crecimiento asociados con la migración celular. Nuestros resultados evidencian que la mezcla de metabolitos inhibió de forma significativa la migración de miofibroblastos (~70%) y la adhesión de monocitos a miofibroblastos (~50%). Estos efectos se asociaron con una disminución significativa de los niveles de PGE₂, PAI-1 e IL-8. Otros reguladores importantes de migración y adhesión celular fueron también modulados por el tratamiento con los metabolitos. De estos, Uro-A fue el que exhibió una mayor

actividad anti-inflamatoria. Nuestros resultados indican que la mezcla de metabolitos de ETs, urolitinas y EA, a concentraciones que se pueden encontrar en colon, tras el consumo de granada, puede ejercer efectos moduladores moderados sobre la respuesta inflamatoria de miofibroblastos de colon y sugieren que el consumo de alimentos ricos en ETs puede tener efectos moduladores beneficiosos sobre enfermedades inflamatorias intestinales.

1. – INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), son procesos inflamatorios progresivos o crónicos con períodos remitentes que pueden afectar a todo el tracto gastrointestinal o a la mucosa del colon, y que se asocian con riesgo de padecer cáncer de colon (Kaser *et al.*, 2010). La incidencia de las EIIs está aumentando en los países desarrollados y en los países en vías de desarrollo, lo que sugiere que la “occidentalización” podría estar condicionando la aparición de estos desórdenes y que los factores ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de las EII (Latilla *et al.*, 2010). De estos factores, la dieta parece contribuir de forma importante pero su papel no está bien definido, ya que algunos de los constituyentes de la dieta pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad mientras que otros parece que protegen frente a ella (Chapman-Kiddell *et al.*, 2010). En particular, el consumo de frutas, verduras, aceite de oliva, cereales y nueces se ha correlacionado negativamente con la EC (D’Souza *et al.*, 2008). Estos alimentos vegetales son ricos en compuestos fenólicos muchos de los cuales exhiben propiedades anti-inflamatorias (González *et al.*, 2011). Como la eficiencia de absorción de estos compuestos fenólicos es, en general, muy baja, estos compuestos y/o sus metabolitos microbianos tienden a alcanzar concentraciones importantes en el intestino.

Numerosos estudios *in vivo*, utilizando modelos animales de colitis, e *in vitro*, con células intestinales tratadas con citoquinas pro-inflamatorias, han investigado los efectos anti-inflamatorios de diversos compuestos fenólicos (Biasi *et al.*, **2011**). Larrosa *et al.* (**2010b**) demostraron que un extracto de granada rico en ETs exhibía propiedades anti-inflamatorias frente a un modelo de colitis inducida en rata y que regulaba la expresión de numerosos genes implicados en rutas inflamatorias, disminuyendo varios marcadores de inflamación y preservando la arquitectura del epitelio del colon. Los ETs se hidrolizan en el tracto digestivo liberando EA. Tanto ETs como EA presentan una baja absorción en el estómago e intestino delgado y se metabolizan a lo largo del lumen por la acción de bacterias aun no identificadas produciendo urolitinas (derivados dibenzopirranonas), principalmente Uro-A y Uro-B (Espín *et al.*, **2007b**). Estos metabolitos microbianos pueden llegar a alcanzar concentraciones relativamente elevadas en el colon (rango μM) (Larrosa *et al.*, **2010b**, González-Sarriás *et al.*, **2009**) y podrían ser las moléculas responsables de los efectos anti-inflamatorios observados después del consumo de extracto de granada. Como se ha descrito en el capítulo anterior, Uro-A es capaz de modular algunos procesos asociados con la inflamación de células de endotelio aórtico humano (Giménez-Bastida *et al.*, **2012**). Uro-A también ejerce efectos anti-inflamatorios en modelos celulares de miofibroblastos de colon humano (González-Sarriás *et al.*, **2010a**) y en el intestino *in vivo* (Larrosa *et al.*, **2010b**).

Las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 β y TNF- α , son esenciales en la regulación de la respuesta inflamatoria. Estas moléculas provocan, entre otros efectos, la alteración de la barrera intestinal y el aumento del tránsito de antígenos del lumen al tejido. La inhibición de esta permeabilidad inducida por citoquinas es un importante factor protector frente al daño de la mucosa intestinal y del desarrollo de inflamación intestinal (Powel *et al.*, **2011**). Los miofibroblastos subepiteliales del colon, localizados

bajo la capa epitelial, forman parte de la barrera intestinal y están implicados en el proceso de reparación de la mucosa intestinal gracias a su capacidad de regular los componentes de la matriz extracelular (MEC) (Ivanov *et al.*, 2010). Estas células juegan un papel importante en la respuesta inmune del intestino ya que producen citoquinas, quimioquinas, expresan proteínas de adhesión y factores de crecimiento que inician el proceso de atracción de células del sistema inmune al tejido inflamado y dañado (Andoh *et al.*, 2007).

Objetivos. Para dilucidar algunos de los posibles mecanismos mediante los cuales los ETs de la dieta podrían contribuir a proteger frente a procesos inflamatorios del intestino, en este estudio se investigaron algunas de las respuestas celulares y moleculares de miofibroblastos de colon humanos activados por citoquinas frente al tratamiento con urolitinas, EA y una mezcla de estos metabolitos. Para tratar las células se seleccionaron concentraciones representativas de las observadas en el colon en estudios *in vivo* tras la ingesta de alimentos que contenían ETs. Además se investigó el efecto individual de cada metabolito a la misma concentración. En este estudio se investigaron específicamente los efectos de estos metabolitos microbianos sobre i) la migración de miofibroblastos de colon, ii) la adhesión de monocitos a miofibroblastos de colon, y iii) los niveles de marcadores moleculares implicados en migración y adhesión.

2. – MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. – Materiales.

En este estudio se utilizaron los metabolitos: Uro-A, Uro-B y EA descritos en el capítulo 3, **apartado 3.1**. Los metabolitos se disolvieron en DMSO a una concentración stock de 24mM para Uro-A y Uro-B y de 6mM para EA. Los reactivos de uso general

están también descritos en el **apartado 3.1** del capítulo general de Materiales y Métodos.

2.2. – Cultivos celulares.

El crecimiento, mantenimiento y subcultivo de la línea celular humana de miofibroblastos de colon (CCD18-Co) está descrito en el capítulo 3, **apartados 3.2.1.1, 3.2.1.1.1 y 3.2.1.1.2**. Para los experimentos descritos en este capítulo, se utilizaron células entre los pases 16 y 19. Los monocitos de leucemia humana (THP-1) se cultivaron y mantuvieron como se describe en el capítulo 3 **apartado 3.2.1.3.1**. Se utilizaron células THP-1 entre los pases 15 y 30.

2.3. – Análisis de prostaglandina E₂ (PGE₂).

Los miofibroblastos de colon se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad inicial de $1,2 \times 10^3$ células/pocillo. Al alcanzar la confluencia, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con PBS para posteriormente adicionar medio de cultivo con 0,1% de SBF. Después de 24 h, las células se trataron con las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL), (disueltas en medio con 0,1% de suero bovino fetal (SBF)) solas o en combinación con los metabolitos disueltos en DMSO y filtrados (0,22 μ m). Los tratamientos que se llevaron a cabo fueron: i) Uro-A (40 μ M), ii) Uro-B (5 μ M), iii) EA (1 μ M) y iv) una mezcla de esas moléculas (40 μ M de Uro-A, 5 μ M de Uro-B y 1 μ M de EA; MIX) durante 18 h (máxima producción observada de PGE₂) (González-Sarrías *et al.*, **2010a**). Las células control se trataron con cantidades equivalentes de DMSO (0,5% v/v). Una vez finalizado el tratamiento, el medio de cultivo se congeló a -80 °C. Los niveles de PGE₂ se determinaron utilizando un método inmunoenzimático (Cayman Chemicals, San

Diego, CA, USA) como se indica en el capítulo 3 (**apartado 3.4.4.5**). Este ensayo se repitió un mínimo de 3 veces ($n = 3 - 4$; 6 pocillos por ensayo).

2.4. – Ensayo de migración.

El desarrollo del ensayo y el análisis de los resultados están descritos en el capítulo 3, **apartado 3.2.4**. Los miofibroblastos de colon se cultivaron en placas de 6 pocillos a una densidad de 6×10^3 células/cm². Se dejaron crecer hasta alcanzar $\geq 90\%$ de confluencia para posteriormente cambiar el medio de cultivo normal (10% SBF) a medio con 0,1% de SBF durante 24h. Posteriormente, las células se trataron durante 48 h con IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL) y los metabolitos a las mismas concentraciones indicadas en el ensayo de PGE₂. Las células control se trataron con cantidades equivalentes de DMSO (<0,5%). Este ensayo se repitió 3 veces ($n = 3$; 2 pocillos por ensayo).

2.5. – Viabilidad celular.

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT (Capítulo 3, **apartado 3.2.2.2**). Los miofibroblastos de colon se cultivaron en placas de 6 pocillos a una densidad de 6×10^3 células/cm². Se dejaron crecer hasta alcanzar $\geq 90\%$ de confluencia para posteriormente cambiar el medio de cultivo normal por medio con 0,1% de SBF durante 24h. Las células se trataron como se ha descrito para el ensayo de migración celular. Las células control se trataron con cantidades equivalentes de DMSO ($\leq 0,5\%$). Tras 48 h de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS estéril. A continuación, se añadió 1 mL de solución MTT (1 mg/mL de MTT en medio sin rojo fenol y libre de SBF) y se incubó con las células durante 4 h. Los cristales de formazano que se generaron por acción de las células viables se

solubilizaron con DMSO (625 μ L) y se midió la A_{570} utilizando como referencia la A_{670} . Este ensayo se realizó 3 veces ($n = 3$; 2 pocillos por ensayo).

2.6. – Ensayo de adhesión celular.

El ensayo de adhesión está descrito en el capítulo 3, **apartado 3.2.4**. Los miofibroblastos de colon CCD18-Co se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de $1,2 \times 10^4$ células/pocillo y se dejaron crecer hasta confluencia en medio al 10% SBF. A continuación, se co-incubaron en medio fresco con IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL) solas o en combinación con los metabolitos a las mismas concentraciones utilizadas para el ensayo de análisis de PGE₂. Las células control se trataron con cantidades equivalentes de DMSO ($\leq 0,5\%$). Este ensayo se realizó por triplicado ($n = 3$; 6 pocillos por tratamiento).

2.7. – Medida de factores de crecimiento, moléculas de adhesión y citoquinas mediante ELISA.

Los miofibroblastos de colon CCD18-Co se trataron con las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL) en ausencia o presencia de los metabolitos a las concentraciones descritas en: i) medio de cultivo (0,1% de SBF) durante 48 h para el análisis de factores de crecimiento y ii) medio de cultivo (10% SBF) durante 12 h para el análisis de proteínas de adhesión. Al final de los tratamientos, se recogieron y congelaron a -80 °C los lisados celulares y los medios de cultivo. Los niveles de IL-8, CCL-2 y PAI-1 se determinaron en el medio de cultivo. Los niveles de PDGF-BB, PDGF-R- β , s-ICAM-1 y VCAM-1 se midieron en los lisados celulares. Los kits comerciales correspondientes a cada proteína están descritos en el capítulo 3,

apartado 3.4.4.5. Los resultados se presentan como media aritmética \pm DE de 3 a 6 experimentos independientes ($n = 3 - 6$; 3 pocillos por ensayo).

2.8. – *Antibody arrays.*

Los cambios en los niveles de expresión de proteínas implicadas en adhesión celular y en migración se estudiaron utilizando los *antibody arrays* especificados en el capítulo 3, **apartado 3.4.4.4.** Los miofibroblastos de colon CCD18-Co se cultivaron en placas de 10 cm de diámetro a una densidad inicial de 6×10^3 células/cm². Cuando las células alcanzaron confluencia se sometieron a los mismos tratamientos especificados para el ensayo de migración (medida de los factores de crecimiento) y los designados para el ensayo de adhesión (medida de las proteínas de adhesión). Tras los tratamientos, el medio de cultivo se guardó a -80 °C hasta su análisis. La obtención de los lisados celulares está descrita en el capítulo 3 (**apartado 3.4.4.2**) y la concentración de proteína se determinó utilizando el kit *DC protein* (capítulo 3, **apartado 3.4.4.1**).

Al igual que en el capítulo anterior, se estableció como criterio de corte para seleccionar las proteínas con expresión alterada tras los tratamientos, aquellas que mostraron cambios entre los grupos experimentales $\geq 1,3$ (sobre-expresión) o $\leq -1,3$ (represión). De este modo se incluyen cambios moderados de expresión que pueden tener una gran relevancia biológica. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, para los tratamientos con IL-1 β , o por duplicado, en el caso del tratamiento con TNF- α . Los datos se presentan como media aritmética \pm DE.

2.9. – Análisis estadístico.

Los resultados se presentan como media aritmética \pm DE (barras de error). Para el análisis estadístico se utilizó el software PASW statistic 18.0 (SPSS Inc., Chicago,

IL, EEUU). Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron mediante *t*-Student. Los resultados con valores $p < 0,001$, $< 0,01$ o $< 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. También se incluyen los valores $p < 0,1$ para indicar tendencia.

3. – RESULTADOS

3.1. – Efecto de las urolitinas y/o EA sobre los niveles de PGE₂

El tratamiento con IL-1 β (1 ng/mL, 18 h) de los miofibroblastos de colon CCD18-Co causó una inducción significativa de los niveles de PGE₂ ($36,0 \pm 1,6$ veces, $p < 0,001$) en esta células. El co-tratamiento con la mezcla de metabolitos (40 μ M de Uro-A, 5 μ M de Uro-B, 1 μ M de EA) o con Uro-A sola (40 μ M) atenuaron este efecto, devolviendo los valores de PGE₂ a los niveles detectados en células control. Uro-B (5 μ M) también disminuyó los niveles de la prostaglandina significativamente (reducción del 66,5%, $p < 0,001$) mientras que EA (1 μ M) no tuvo efecto sobre PGE₂ (**Figura 5.1**).

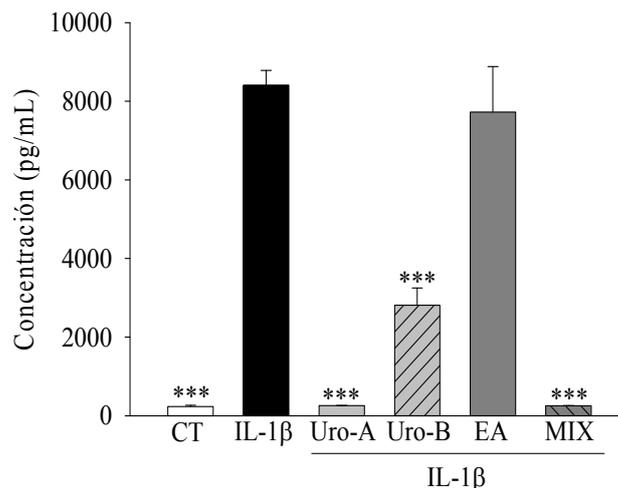


Figura 5.1. Niveles de PGE₂ determinados en el sobrenadante de miofibroblastos de colon expuestos a IL-1 β (1ng/mL), sola o en combinación con Uro-A (40 μ M), Uro-B (5 μ M), EA (1 μ M) o la mezcla de los metabolitos. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 3; 3 pocillos por cada réplica). *** $p < 0,001$ respecto del inflamado con IL-1 β (1ng/mL).

El tratamiento de los miofibroblastos de colon con TNF- α , solo o en combinación con los metabolitos (**Figura 5.2a**), o la exposición de las células a los metabolitos en ausencia citoquinas (**Figura 5.2b**) no causaron ningún efecto significativo sobre los niveles de PGE₂.

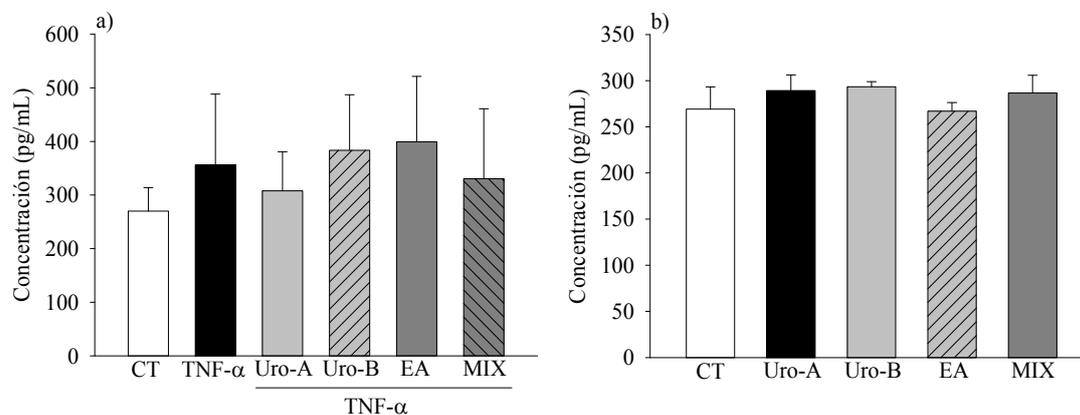


Figura 5.2. Niveles de PGE₂ determinados en el sobrenadante de miofibroblastos de colon expuestos a TNF- α (50 ng/mL), solo o en combinación con Uro-A (40 μ M), Uro-B (5 μ M), EA (1 μ M) o la mezcla de los metabolitos (a), o a los metabolitos en ausencia de la TNF- α (b). Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 3 – 4; 3 pocillos por cada réplica).

3.2. – Efecto de las urolitinas y/o EA sobre la migración de los miofibroblastos de colon, viabilidad celular y marcadores moleculares relacionados.

Para determinar si la mezcla de metabolitos o los compuestos individuales causaban alguna respuesta fenotípica anti-inflamatoria sobre los miofibroblastos de colon humano, se estudiaron primero los efectos de estos compuestos sobre la capacidad de migración de estas células. Los resultados obtenidos (**Figura 5.3**) muestran que IL-1 β indujo moderadamente la migración (24%, $p < 0,1$) (**Figura 5.3a**) mientras que la mezcla de metabolitos, Uro-A y EA inhibieron de forma significativa la migración inducida por esta citoquina en un 69% ($p < 0,001$), 57% ($p < 0,01$) y 38% ($p < 0,01$), respectivamente. El tratamiento de los miofibroblastos durante 48 h con TNF- α indujo también moderadamente la migración de las células (29%, $p < 0,01$) (**Figura 5.3b**).

También en este caso, los tratamientos con la mezcla, Uro-A y EA redujeron la capacidad migratoria de los miofibroblastos en un 70%, 54% y 19%, respectivamente ($p < 0,001$). En ausencia de las citoquinas pro-inflamatorias, la migración de los miofibroblastos de colon se redujo de forma significativa tras el tratamiento con la mezcla de metabolitos durante 48 h (64%, $p < 0,1$) (Figura 5.3c).

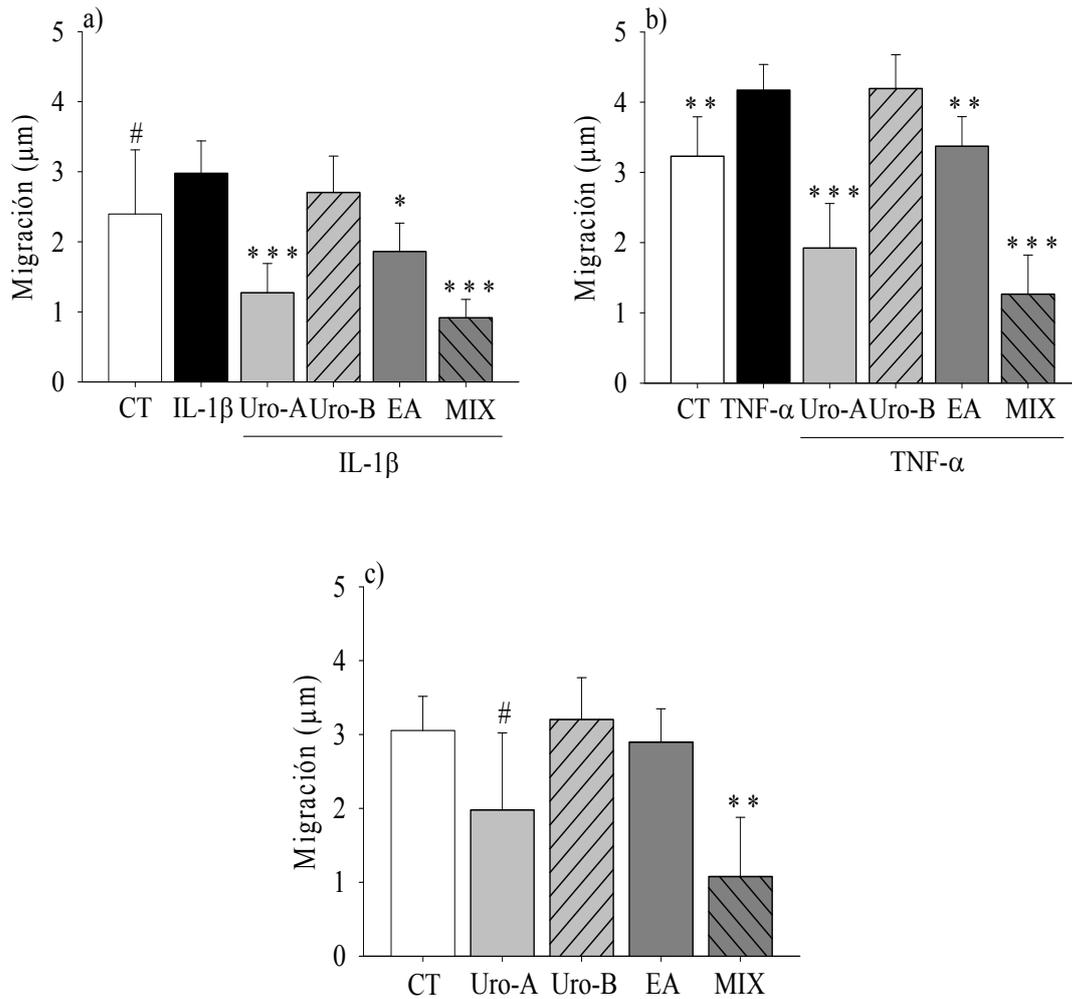


Figura 5.3. Efecto de Uro-A (40 μM), Uro-B (5 μM), EA (1 μM) y la mezcla de estas moléculas sobre la migración de los miofibroblastos de colon CCD18-Co. a) co-tratamiento con IL-1β (1 ng/mL), b) co-tratamiento con TNF-α (50 ng/mL) y c) ausencia de citoquinas pro-inflamatorias. Los datos se representan como media aritmética ± DE (n = 3; 2 pocillos por cada réplica). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; # $p < 0,1$ respecto del inflamado en el caso de a) y b) y respecto del control en el caso de c).

Uro-A exhibió también un efecto inhibitorio aunque menor que el de la mezcla (inhibición del 35%, $p < 0,1$). Uro-B y EA no tuvieron ningún efecto sobre la migración de los fibroblastos a las concentraciones ensayadas.

En la **Figura 5.4** se presentan varias imágenes representativas de la inducción de la migración de los miofibroblastos de colon observada tras el tratamiento con las citoquinas IL-1 β y TNF- α y de la inhibición de dicha migración tras el co-tratamiento con la mezcla de metabolitos. El análisis de estas imágenes mediante el procedimiento indicado en el capítulo general de Materiales y Métodos, nos permitió cuantificar este proceso y elaborar los histogramas de la **Figura 5.3**.

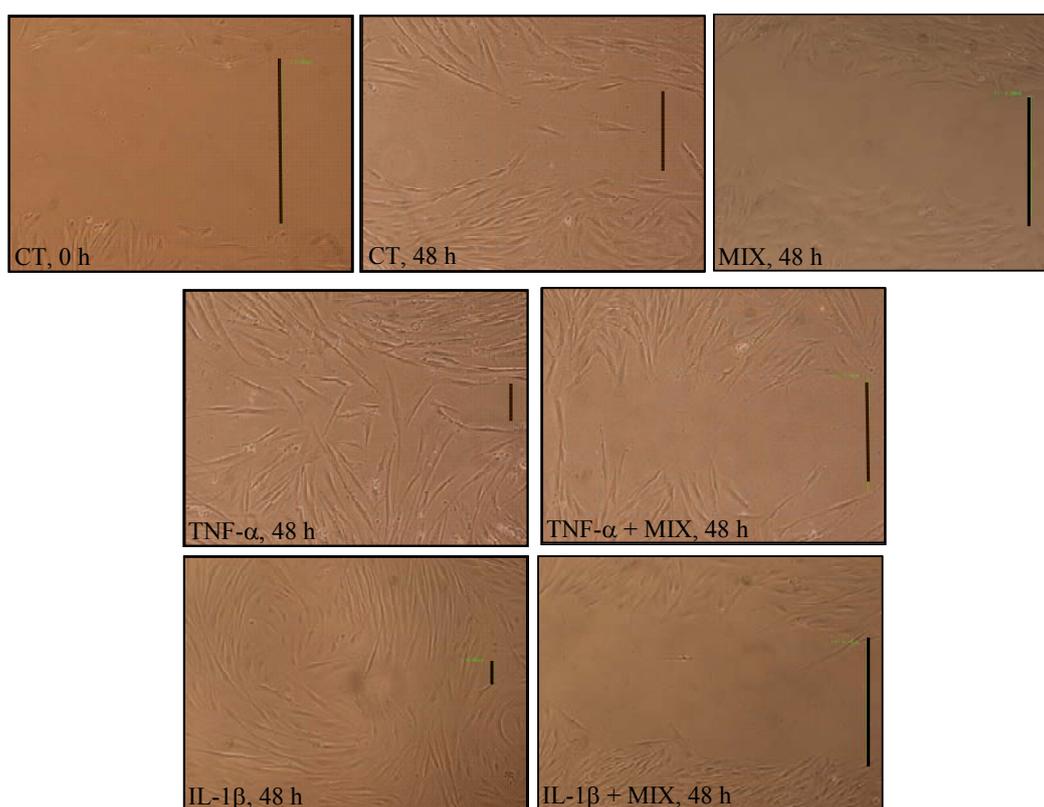


Figura 5.4. Imágenes tomadas con el microscopio que reflejan el efecto de la mezcla de metabolitos (MIX) sobre la migración de los miofibroblastos de colon CCD18-Co a las 48 h de tratamiento. Las 3 imágenes superiores representan la migración de las células en ausencia de citoquinas pro-inflamatorias. Las dos imágenes inferior-izquierda muestran el efecto inductor de las citoquinas sobre la migración. Las dos imágenes inferior-derecha muestran el efecto inhibitorio de la mezcla de metabolitos (MIX) en la migración.

Para determinar si la exposición de los miofibroblastos de colon a las urolitinas y/o EA durante 48 h provocaba importantes cambios en las células que pudieran indicar citotoxicidad de estos compuestos, se examinó el efecto de los metabolitos sobre la actividad total mitocondrial utilizando el ensayo de MTT (**Figura 5.5**). El tratamiento con IL-1 β , sola o en combinación con los metabolitos no tuvo ningún efecto significativo sobre la viabilidad celular (**Figura 5.5a**).

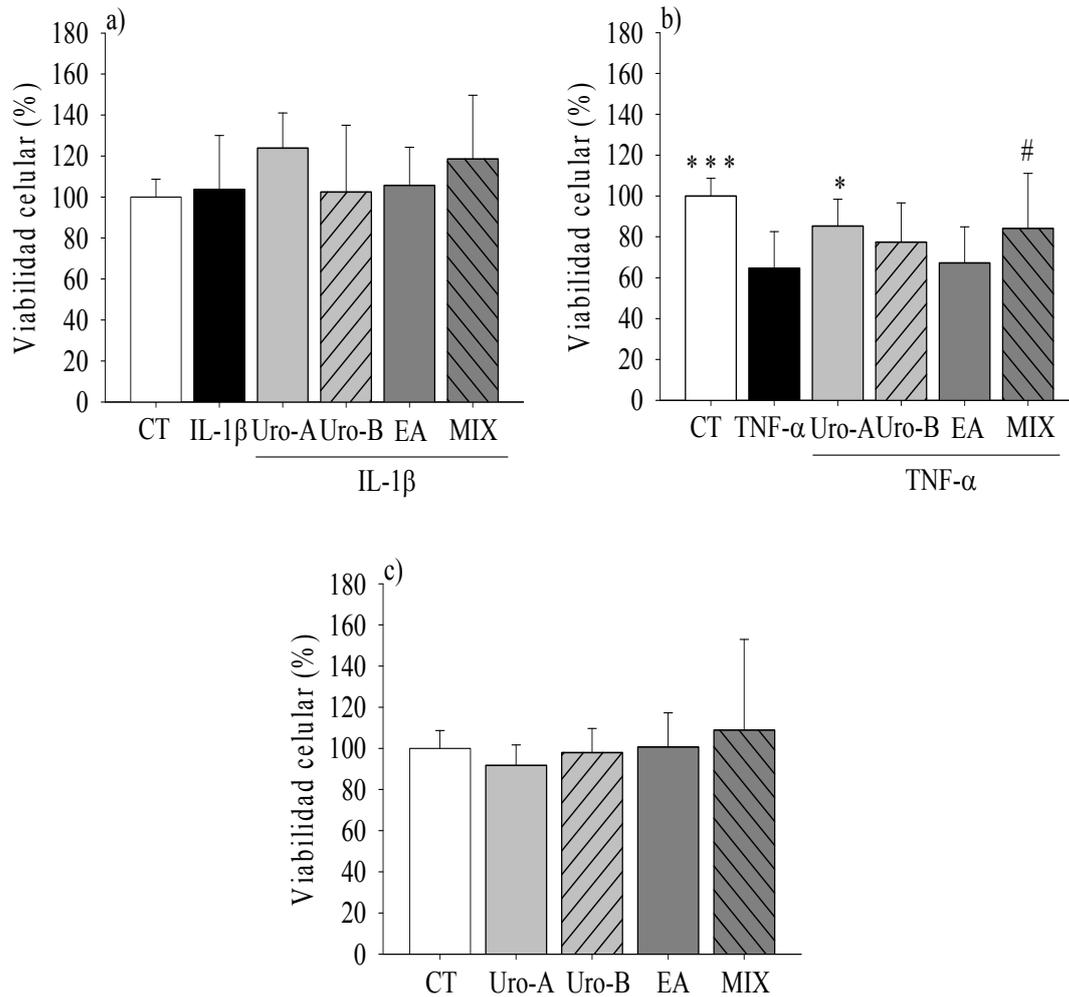


Figura 5.5. Efecto de Uro-A (40 μ M), Uro-B (5 μ M), EA (1 μ M) y la mezcla de estos metabolitos sobre la viabilidad de los miofibroblastos de colon tras 48 h de exposición (ensayo MTT). a) co-tratamiento con IL-1 β (1 ng/mL), b) co-tratamiento con TNF- α (50 ng/mL) y c) en ausencia de citoquinas pro-inflamatorias. Los resultados se presentan como media aritmética \pm DE (n = 3; 2 pocillos por experimento). *** p <0,001; * p <0,05; # p <0,1 respecto de las células tratadas con TNF- α .

La exposición de los fibroblastos a TNF- α , sin embargo, sí que afectó moderadamente la actividad mitocondrial celular (inhibición del 35%, $p < 0,001$, **Figura 5.5b**) que se recuperó ligeramente en presencia de la mezcla de metabolitos o de Uro-A

En ausencia de las citoquinas, ni la mezcla de metabolitos ni los compuestos individuales alteraron la tasa de reducción del MTT a las concentraciones utilizadas (**Figura 5c**). Estos resultados indican que los efectos inhibitorios de estos metabolitos sobre la migración de los fibroblastos no son debidos a efectos tóxicos sobre las células.

Se determinaron también los posibles cambios en los niveles de PAI-1 mediante ensayo ELISA (**Figura 5.6**). Los niveles de PAI-1 se indujeron significativamente tras el tratamiento durante 48 h con IL-1 β ($6,5 \pm 0,7$ veces, $p < 0,001$) o TNF- α ($4,5 \pm 0,3$ veces, $p < 0,001$). Esta inducción se redujo visiblemente con el co-tratamiento con Uro-A o la mezcla de metabolitos, siendo este efecto mucho más significativo en el caso de las células tratadas con IL-1 β (reducción de $0,5 \pm 0,2$; $p < 0,01$ y $0,6 \pm 0,3$; $p < 0,05$ respectivamente).

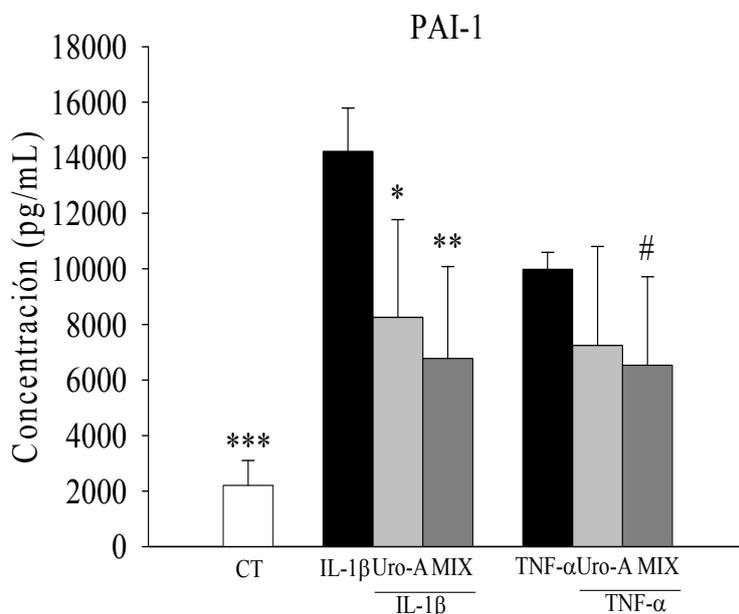


Figura 5.6. Determinación mediante ensayo ELISA de los niveles de PAI-1 liberados al medio de cultivo por los miofibroblastos de colon CCD18-Co tras 48 h de tratamiento con IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL), solos o en combinación con Uro-A (40 μ M) o la mezcla de metabolitos (MIX). Los resultados se presentan como media aritmética \pm DE (n = 3; 3 pocillos por ensayo). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; # $p < 0,1$ respecto del control tratado con IL-1 β o TNF- α .

Se midieron también, mediante la técnica de ELISA, los niveles de PDGF-BB y PDGF-R- β en los miofibroblastos de colon pero no se detectaron cambios significativos en los niveles de estas dos proteínas ni tras la estimulación con las citoquinas pro-inflamatorias durante 48 h, solas o en combinación con Uro-A o la mezcla de metabolitos (resultados no mostrados).

3.3. – Análisis múltiple de factores de migración y crecimiento modulados por TNF- α o IL-1 β y por los metabolitos de ETs: aplicación de *antibody arrays*.

Entre los tratamientos estudiados, los resultados más significativos de inhibición de la migración de fibroblastos se obtuvieron con la mezcla de metabolitos (MIX) y con Uro-A y por ello seleccionamos estos dos casos para el análisis múltiple de factores de crecimiento mediante *antibody arrays*. El perfil completo de los factores de crecimiento representados en el *array* (ordenados de mayor a menor intensidad densitométrica) y las diferencias detectadas para cada uno de ellos entre los grupos experimentales se incluyen en el ANEXO I (Tabla suplementaria S5.1 y S5.2). En general, tanto TNF- α como IL-1 β incrementaron la expresión de muchos de los factores de crecimiento representados en la membrana (alrededor del 80% y del 60%, respectivamente) mientras que la mezcla de metabolitos y Uro-A atenuaron la inducción de varios de estos factores. Los cambios en los niveles de expresión de los factores de crecimiento fueron, en general, muy moderados con variaciones en el rango desde 1,3 hasta 3 veces. En la **Tabla 1** se presentan los resultados comparativos entre las células tratadas con IL-1 β o TNF- α para algunas de las principales familias de factores de crecimiento relacionados con la migración celular y el proceso de reparación de tejidos. El tratamiento con IL-1 β causó un aumento generalizado en la expresión de la mayoría de estos factores de crecimiento. El tratamiento con TNF- α también indujo los niveles de varios factores de

crecimiento (EGF, FGFs y PDGFs) aunque no afectó los niveles de los miembros de la familia TGF β , ni tampoco de la mayoría de los miembros de la familia VEGF o CSF. En las células estimuladas con IL-1 β , el tratamiento con la mezcla de metabolitos o Uro-A se tradujo en una disminución también generalizada de la expresión de muchos de estos factores de crecimiento. En el caso de TNF- α , sin embargo, se observó una mayor variación en los resultados de los co-tratamientos con los metabolitos, ya que algunos de estos factores de crecimiento resultaron incluso más sobre-expresados en el co-tratamiento con la mezcla de metabolitos (FGF6, algunos miembros de la familia TGF β y VEGF, y M-CSF). El co-tratamiento con Uro-A también incrementó los niveles de IGFBP3 y bFGF. A diferencia de los resultados obtenidos con el ensayo de ELISA, los antibody array indicaron que la estimulación de los miofibroblastos de colon con cada una de las citoquinas inducía los niveles de PDGF-BB y PDGF-R- β , y el co-tratamiento con los metabolitos atenuaba este aumento.

Tabla 5.1. Factores de crecimiento implicados en migración celular y el proceso de reparación de tejidos cuyos niveles de expresión variaron en los miofibroblastos de colon humano (CCD18-Co) tras los tratamientos con las citoquinas, IL-1 β (1ng/mL) y TNF- α (50ng/mL) y la mezcla de metabolitos o Uro-A.

Proteína (Símbolo)	IL-1 β /CT	IL-1 β + MIX /IL-1 β	IL-1 β + Uro-A /IL-1 β	TNF- α /CT	TNF- α + MIX /TNF- α	TNF- α + Uro-A /TNF- α
<i>Familia EGF</i>						
EGF	1,53 (0,038)	-1,66	NC	1,66 (0,041)	-1,51 (0,029)	-1,42
EGFR	1,80	NC	NC	1,99 (0,093)	-2,10 (0,026)	NC
<i>Familia FGF</i>						
bFGF	2,78	-2,68	-2,27	1,32	-1,51	1,81
FGF4	1,49	-1,43	NC	1,62	-1,53 (0,001)	-1,47
FGF6	2,13 (0,021)	-2,56 (0,049)	-2,28 (0,054)	1,57	5,68 (0,007)	NC
FGF7	2,94 (0,014)	-2,21	-2,01	1,48	-1,96 (0,008)	NC
<i>Familia TGFβ</i>						
TGF β 1	6,22 (0,093)	-1,47	-2,05 (0,073)	NC	1,48	-7,19 (0,044)
TGF β 2	1,80 (0,016)	NC	-1,59 (0,001)	NC	1,47	-1,53
TGF β 3	2,12 (0,001)	NC	-1,69 (0,001)	NC	1,67	-2,45
<i>Familia PDGF</i>						
PDGF-AA	1,96 (0,044)	-1,46 (0,052)	-1,37 (0,067)	NC	NC	-1,55 (0,068)
PDGF-BB	2,05 (0,028)	-1,77 (0,088)	-1,64	1,41	-1,84	-1,55
PDGF-AB	1,88 (0,032)	-1,51	-1,53 (0,074)	1,33	-1,45	-1,86 (0,047)
PDGF-R- α	2,75 (0,001)	-1,49 (0,042)	-1,76 (0,010)	1,53	-1,41	-2,29 (0,007)
PDGF-R- β	1,78 (0,091)	-1,56	NC	1,51	-1,36	-2,21 (0,061)

Tabla 5.1 (continuación)

Proteína (Símbolo)	IL-1 β /CT	IL-1 β + MIX /IL-1 β	IL-1 β + Uro-A /IL- 1 β	TNF- α /CT	TNF- α + MIX /TNF- α	TNF- α + Uro-A /TNF- α
<i>Familia VEGF</i>						
VEGF	2,66 (0,001)	NC	-1,69 (0,001)	NC	1,43	NC
VEGF R2	2,40 (0,028)	NC	-1,75 (0,065)	NC	1,41	-1,47
VEGF R3	2,25 (0,007)	NC	-2,04 (0,003)	NC	NC	NC
VEGF-D	2,53 (0,001)	-1,39 (0,040)	-1,99 (0,001)	NC	NC	-1,81
PlGF	2,42 (0,006)	-1,61 (0,082)	-1,66 (0,031)	1,84 (0,095)	-2,18 (0,068)	-2,24 (0,025)
<i>Familia CSF</i>						
M-CSF	1,77 (0,028)	-1,60 (0,007)	-1,46 (0,026)	1,52	5,08	-2,66 (0,016)
M-CSFR	1,68 (0,007)	NC	-1,53 (0,041)	NC	NC	-1,73 (0,072)
GM-CSF	8,05 (0,029)	-1,80	-2,22 (0,093)	ND	ND	ND
<i>Familia IGF</i>						
IGF-I	1,92 (0,021)	-1,51	-1,41	1,62 (0,066)	-2,13 (0,006)	-1,37
IGFBP-2	1,45 (0,082)	-1,32	-1,43 (0,074)	1,40	-1,35	NC
IGFBP-3	2,45 (0,037)	-1,43	NC	1,71	-1,94 (0,005)	1,40
IGF-I SR	1,71	-1,51 (0,057)	-1,38	1,76 (0,073)	-2,35 (0,003)	NC

Valor umbral de referencia $\geq 1,3$ para sobre-expresión y $< -1,3$ para disminución de la expresión. A cada valor de intensidad de cada punto del *array* se le ha restado su valor de ruido de fondo y se han normalizado con los controles positivos. Los extractos celulares de dos placas de cultivo, se mezclaron y se hibridaron en una membrana. Las proteínas se presentan por duplicado en cada *array*. Datos expresados como la media aritmética \pm DE de tres (IL-1 β ; n = 3) o dos (TNF- α ; n = 2) ensayos independientes tras 48 h de tratamiento. Los valores remarcados en negrita indican resultados coincidentes entre los tratamientos con las dos citoquinas pro-inflamatorias. Los valores de $p < 0,05$ se indican entre paréntesis. Se incluyen valores $p < 0,1$ para indicar tendencia. NC: sin cambio.

3.4. – Efecto de las urolitinas y/o EA sobre la adhesión de monocitos a miofibroblastos de colon y marcadores moleculares relacionados.

La incubación de las células CCD18-Co con IL-1 β (1 ng/mL; **Figura 5.7a**) o TNF- α (50 ng/mL; **Figura 5.7b**) durante 12 h, produjo un aumento significativo de la

adhesión de los monocitos THP-1 a los miofibroblastos en un 50% y un 32%, respectivamente ($p < 0,001$). De los metabolitos estudiados, Uro-A y EA inhibieron, de manera moderada pero significativa, la adhesión de los monocitos sobre las células tratadas con IL-1 β (20%, $p < 0,05$) mientras que Uro-B y EA inhibieron la adhesión de los monocitos a las células estimuladas con TNF- α (22%, $p < 0,05$). La inhibición más significativa se observó tras el co-tratamiento de las células de colon con las citoquinas y la mezcla de metabolitos (35% de inhibición en el caso de células tratadas con IL-1 β y 50% en el caso de TNF- α ; $p < 0,001$). Ninguno de los metabolitos estudiados tuvo efecto sobre la adhesión de los monocitos en ausencia de las citoquinas pro-inflamatorias (Figura 5.7c).

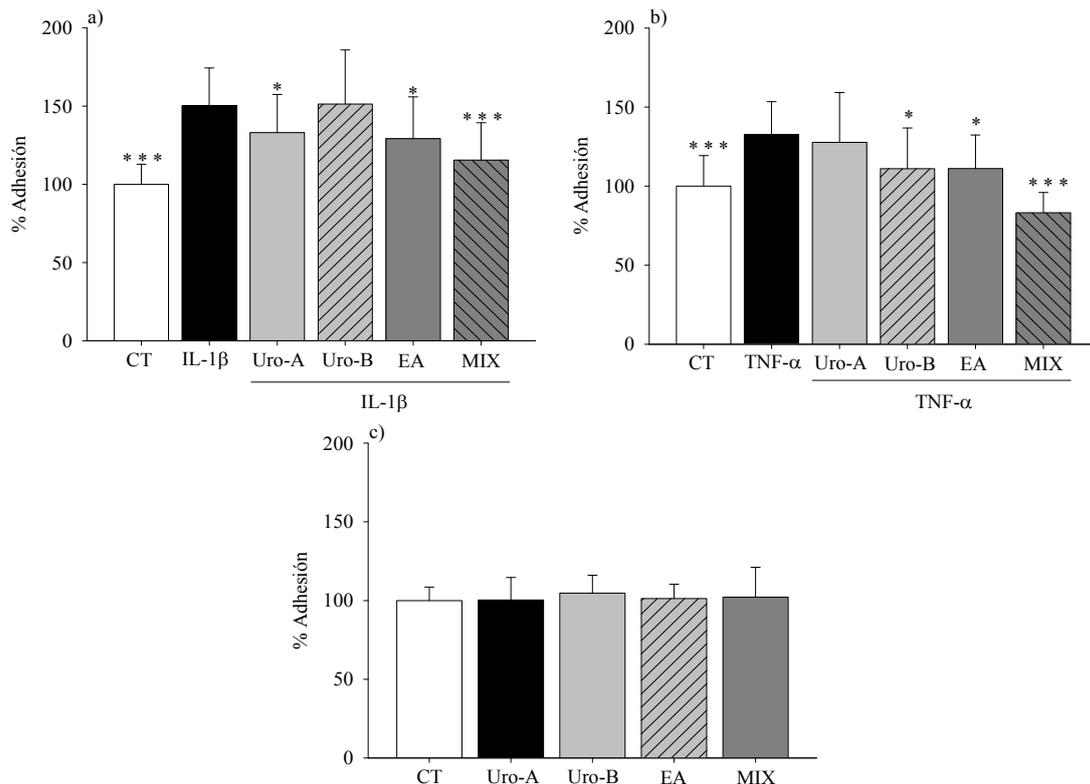


Figura 5.7. Efecto del tratamiento con las citoquinas, IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL), y/o con urolitinas, EA o la mezcla de metabolitos durante 12 h sobre la adhesión de los monocitos THP-1 a los miofibroblastos de colon CCD18-Co. Los resultados se presentan como media aritmética \pm DE de 3 experimentos independientes (n = 3; 6 pocillos por tratamiento). *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; respecto del control tratado con la citoquina inflamatoria.

Mediante el uso de la técnica de ELISA se midió la concentración de algunas quimioquinas y moléculas implicadas en el proceso de adhesión en los miofibroblastos de colon tras los tratamientos (**Figura 5.8 a-d**). Los resultados muestran que la estimulación de las CCD18-Co con las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL) durante 12 h, incrementó de manera significativa ($p < 0,001$) la expresión de IL-8 ($17,4 \pm 3,5$ y $12,0 \pm 1,6$ respectivamente), CCL2 ($2,4 \pm 0,2$ y $1,8 \pm 0,1$), sICAM-1 ($11,9 \pm 0,9$ y $8,4 \pm 0,6$) y VCAM-1 ($3,4 \pm 1,1$ y $3,8 \pm 1,1$). Solamente en los miofibroblastos de colon tratados con TNF- α , pudo observarse un efecto reductor significativo de los niveles de IL-8 liberados al medio de cultivo, cuando las células se co-trataron con la mezcla de metabolitos ($0,6 \pm 0,3$) y con Uro-A ($0,7 \pm 0,2$) ($p < 0,05$) (**Figura 5.8a**). Ni Uro-A ni la mezcla tuvieron ningún efecto sobre los niveles de expresión de CCL2 (**Figura 5.8b**). Respecto a las moléculas de adhesión, sICAM-1 y VCAM-1, solamente en los miofibroblastos co-tratados con IL-1 β y la mezcla de metabolitos se detectó una reducción de los niveles de expresión de estas dos proteínas ($0,7 \pm 0,2$, $p < 0,05$ y $0,7 \pm 0,1$ $p < 0,1$, respectivamente (**Figura 5.8c y 5.8d**). Adicionalmente se midieron los niveles de IL-6 que también se incrementó por acción de IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL) tras 12 y 48 h de tratamiento. Ninguno de los metabolitos tuvo ningún efecto modulador sobre la expresión de esta citoquina a las concentraciones estudiadas.

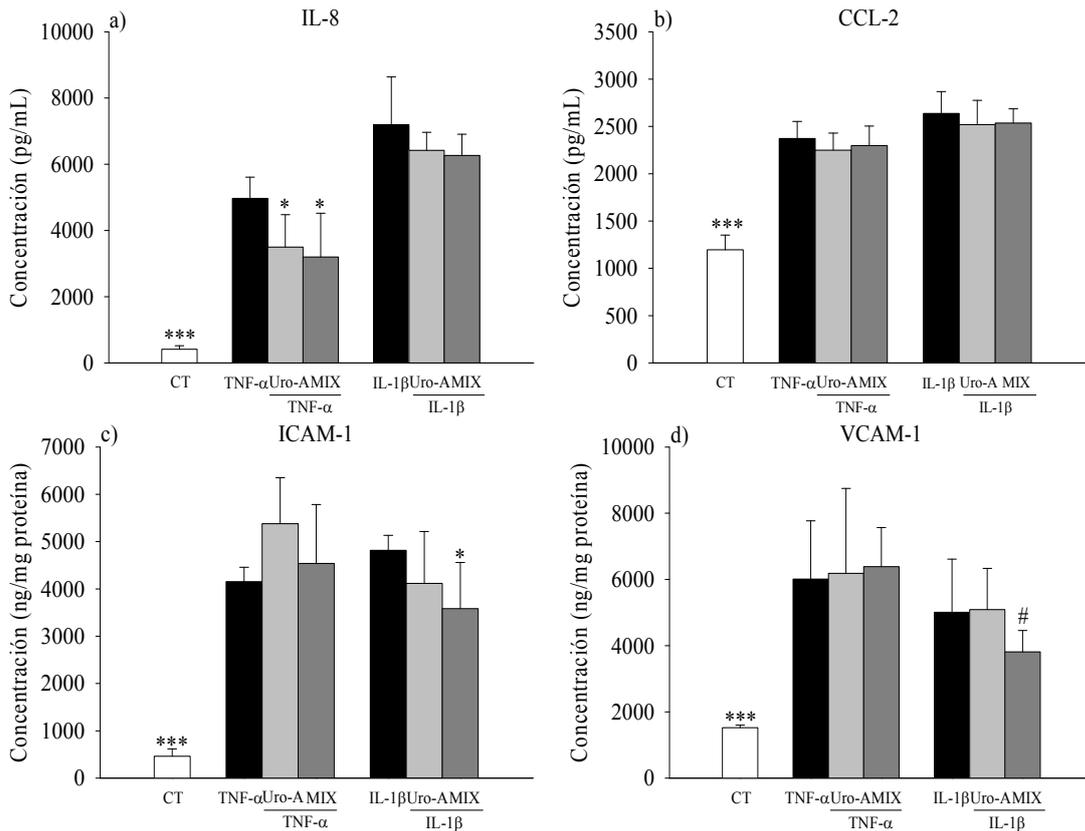


Figura 5.8. Niveles de expresión de citoquinas y proteínas de adhesión determinados por ELISA en los miofibroblastos de colon CCD18-Co tratados con IL-1 β (1 ng/mL) o TNF- α (50 ng/mL), solos o en combinación con Uro-A (40 μ M), Uro-B (5 μ M), EA (1 μ M) o la mezcla de estos metabolitos (MIX) durante 12 h. (a, b) niveles de IL-8 y CCL2 determinados en medio de cultivo (n = 6; 3 pocillos por ensayo); (c, d) niveles de ICAM-1 y VCAM-1 determinados en lisados celulares (n = 3; 3 pocillos por ensayo). Los lisados celulares se obtuvieron de dos placas de cultivo que se mezclaron para el análisis. Los resultados se muestran como la media aritmética \pm DE de tres experimentos independientes. # p <0.1; * p <0,05; *** p <0,001.

3.5. Análisis múltiple de proteínas de adhesión modulados por TNF- α o IL-1 β y por los metabolitos de ETs: aplicación de *antibody arrays*.

Utilizando los *antibody array* hicimos también un cribado para determinar cambios adicionales de varias proteínas de adhesión en los miofibroblastos de colon tras el tratamiento con TNF- α sólo o con TNF- α más la mezcla de metabolitos. El perfil completo de proteínas de adhesión (ordenadas de mayor a menor intensidad densitométrica de cada proteína) y las diferencias entre las células control y las tratadas se incluyen en el ANEXO II (Tabla suplementaria S5.3). Algunos de los marcadores

de adhesión cuya expresión se incrementó tras el tratamiento con esta citoquina y sobre los que la mezcla de metabolitos tuvo un efecto represor de la expresión se presentan en la **Tabla 5.2**. El análisis densitométrico de los *arrays* corroboró algunos de los resultados previamente obtenidos mediante ELISA al evidenciar: i) el incremento de la expresión de IL-8, CCL2, ICAM-1 y VCAM-1 en los miofibroblastos de colon tras el tratamiento con TNF- α y ii) la reducción de los niveles de IL-8 y la ausencia de regulación de los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 tras el co-tratamiento con la mezcla de metabolitos. Sin embargo, y a diferencia de los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA, los *arrays* mostraron una disminución pequeña, pero significativa, de los niveles de CCL2 por acción de la mezcla de metabolitos en las células inflamadas con TNF- α . Otras proteínas de adhesión como ALCAM, BCAM y CDH1 también se sobre-expresaron por acción de TNF- α y esta expresión se vió atenuada por acción de la mezcla de metabolitos.

Tabla 5.2. Niveles de expresión de proteínas de adhesión determinados por *Antibody array* en los miofibroblastos de colon CCD18-Co tratados con TNF- α (50 ng/mL) solo o en combinación con la mezcla de metabolitos (MIX) durante 12 h

Símbolo	TNF- α / CT	TNF- α + MIX / TNF- α
IL-8	7,02 (0,017)	-1,75
CCL-2	2,98 (0,037)	1,41 (0,003)
ICAM-1	1,53	NC
VCAM-1	3,92 (0,001)	NC
ALCAM	1,72	-1,61
BCAM	1,44	-1,69
CDH1	1,85 (0,015)	2,70 (0,044)

Valor umbral de referencia $\geq 1,3$ para sobre-expresión y $< -1,3$ para disminución de la expresión. A cada valor de intensidad de cada punto del *array* se le ha restado su valor de ruido de fondo y se han normalizado con los controles positivos. Los extractos celulares se obtuvieron de dos placas de cultivo que se mezclaron e hibridaron en una membrana. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 2; proteínas por duplicado en el *array*). Los valores de $p < 0,05$ se indican entre paréntesis. Abreviaturas: NC: sin cambio.

4. – DISCUSIÓN.

El tratamiento actual de las EIIs consiste en una terapia anti-inflamatoria a largo plazo no exenta de recaídas, efectos secundarios y cirugía. Se ha descrito que numerosos compuestos fenólicos presentes en la dieta exhiben efectos anti-inflamatorios diversos sobre modelos animales y celulares por lo que podrían constituir una alternativa natural para la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Las propiedades anti-inflamatorias de los compuestos fenólicos podrían ser especialmente relevantes en el intestino donde pueden alcanzar concentraciones considerables a través de la ingesta regular de alimentos ricos en estos compuestos (Biasi *et al.*, 2011). Para poder entender los posibles efectos anti-inflamatorios en el intestino de los compuestos fenólicos de la dieta es esencial: i) identificar y cuantificar los metabolitos que se encuentran en el intestino *in vivo* y ii) descifrar los posibles mecanismos moleculares que estos metabolitos desencadenan en los tejidos y células específicas implicadas en la respuesta inflamatoria intestinal. Teniendo en cuenta estas dos premisas, en este estudio hemos investigado algunos de los efectos y mecanismos moleculares de los principales metabolitos microbianos derivados de los ETs de la dieta frente a un modelo celular de miofibroblastos de colon. Nuestros resultados muestran que la mezcla de metabolitos, Uro-A, Uro-B y EA, a concentraciones representativas de las que pueden alcanzarse en el intestino a través de la dieta (rango μM), inhibió de manera significativa dos procesos clave en la respuesta inflamatoria intestinal: la migración de los miofibroblastos y la adhesión de monocitos a miofibroblastos. Estos efectos se asociaron con un efecto inhibitorio significativo de los niveles de PGE_2 , IL-8 y PAI-1, todos ellos moléculas clave que intervienen en la regulación de la migración y la adhesión celular. De los tres metabolitos estudiados, Uro-A mostró los efectos anti-inflamatorios más destacables.

Para este estudio se seleccionó la línea celular CCD18-Co que son miofibroblastos de colon humanos de naturaleza no cancerosa. En el organismo, los miofibroblastos de colon descansan bajo la capa epitelial del intestino y contribuyen al mantenimiento de la mucosa intestinal. Aunque por su localización los miofibroblastos del colon no están directamente expuestos a los compuestos del lumen que proceden de la dieta, el aumento transitorio de la permeabilidad a través de las uniones estrechas (*tight junctions*) en condiciones inflamatorias hace posible el paso de muchos nutrientes y pequeñas moléculas a través de las rutas paracelulares (Snoeck *et al.*, 2005). Además, en casos graves de inflamación crónica con rotura de la barrera epitelial, el contenido del lumen intestinal puede entrar en contacto directo con las células residentes en la lámina propia, como es el caso de los miofibroblastos de colon. Entre los metabolitos derivados de los ETs de la dieta, Uro-A es el metabolito más abundante que se ha detectado en heces de humanos y cerdos, seguido de Uro-B y EA (Espín *et al.*, 2007b, Cerdá *et al.*, 2005). En ratas alimentadas con dosis elevadas de granada, se detectaron y cuantificaron cantidades importantes de estos metabolitos: Uro-A (7-34 μM) Uro-B (2-65 μM) y trazas de EA (González-Sarrías *et al.*, 2009). Basándonos en estos resultados así como en los valores de solubilidad de urolitinas y EA en el medio de cultivo (máxima solubilidad de 40 μM para urolitinas y 30 μM para EA) (González-Sarrías *et al.*, 2010a), se decidió tratar los miofibroblastos de colon con Uro-A, Uro-B y EA a las concentraciones de 40 μM , 5 μM y 1 μM , respectivamente y con la mezcla de estos compuestos.

Los miofibroblastos de la mucosa del colon juegan un papel muy importante en la modulación de la respuesta inmune del intestino, en parte debido a la producción de PGE_2 (Rieder *et al.*, 2010). Nuestro grupo ya había descrito la asociación entre el consumo de extracto de granada o Uro-A con una disminución en los niveles de PGE_2

en la mucosa del colon de rata en condiciones de inflamación (Larrosa *et al.*, **2010b**). Además, en estudios *in vitro* también desarrollados con los miofibroblastos de colon humano CCD18-Co, establecimos que Uro-A y Uro-B, a concentraciones halladas en el lumen colónico de las ratas e incluso menores (1 y 10 μM), contrarrestaban la inducción de PGE_2 por $\text{IL-1}\beta$ (González-Sarrías *et al.*, **2010a**). Sin embargo, no establecimos entonces si se producía o no algún efecto sinérgico entre los diferentes metabolitos de ETs. En este segundo trabajo realizado en miofibroblastos de colon, hemos confirmado que la mezcla de las dos principales urolitinas y EA, a concentraciones en el rango μM que pueden alcanzarse en el colon mediante el consumo de productos ricos en ETs, reducen los niveles de PGE_2 inducidos por $\text{IL-1}\beta$ a niveles control, siendo Uro-A el principal responsable de este efecto. Sin embargo, la otra citoquina ensayada, $\text{TNF-}\alpha$, o los metabolitos de ETs en ausencia de citoquinas pro-inflamatorias no tuvieron ningún efecto sobre la producción de PGE_2 . El papel de $\text{TNF-}\alpha$ en la producción de PGE_2 no está del todo claro. Algunos estudios evidencian que esta citoquina induce la expresión de esta prostaglandina en los miofibroblastos de colon CCD18-Co, aunque el grado de inducción varía considerablemente y además, se ha observado que es mucho más pronunciado con $\text{IL-1}\beta$ que con $\text{TNF-}\alpha$ (Kim *et al.*, **1998**). Más en concordancia con nuestros resultados, otros estudios indican que el tratamiento de los miofibroblastos CCD18-Co con bajas concentraciones de $\text{TNF-}\alpha$ (8,3 ng/mL, 4h) no tuvo un efecto significativo sobre la producción y secreción de PGE_2 (Yoo *et al.*, **2009**). La PGE_2 tiene un papel regulador sobre varias funciones importantes de los miofibroblastos incluyendo migración, pudiendo inducirla o inhibirla (Rieder *et al.*, **2010**; Li *et al.*, **2011a**). La migración de los miofibroblastos de la lámina propia desde los tejidos vecinos hacia la región inflamada o mucosa dañada, es un importante mecanismo implicado en el proceso de reparación y formación de tejido en el intestino. Parece ser

que esta respuesta está regulada por un complejo gradiente quimiotáctico con moléculas que aumentan o reducen la capacidad migratoria de estas células. Además de PGE₂, las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α también presentan importantes efectos reguladores sobre la migración celular (Powel *et al.*, **2011**; Ivanov *et al.*, **2010**; Andoh *et al.*, **2007**). Para profundizar en la respuesta de los miofibroblastos de colon al tratamiento con los metabolitos de ETs, estudiamos los efectos de estos compuestos, solos o en presencia de IL-1 β o TNF- α , sobre la capacidad de migración de los miofibroblastos CCD18-Co. En las condiciones de nuestro ensayo, tanto TNF- α como IL-1 β incrementaron la capacidad migratoria de los miofibroblastos de colon, de acuerdo con un efecto pro-fibrótico que atrae los miofibroblastos activados a zonas dañadas como parte de la respuesta inflamatoria y del proceso de reparación de daño tisular. Este efecto se inhibió por el co-tratamiento con los metabolitos de ETs lo que parecía indicar una aparente interferencia con la reparación de los tejidos y su restitución. En contraposición con estos resultados, existen estudios que indican que TNF- α reduce la migración de los miofibroblastos de la lámina propia del colon (Leeb *et al.*, **2003**). Las diferencias en los efectos de las citoquinas pro-inflamatorias sobre la migración celular, y en particular de TNF- α , solo pueden entenderse a la vista de la complejidad de sus acciones. TNF- α puede tener actividad inmunomoduladora y supresora de enfermedades aunque también puede iniciar y sostener condiciones inflamatorias crónicas (Apostolaki *et al.*, **2010**). Los efectos de esta citoquina pleiotrópica dependen de muchos factores que incluyen entre otros: el microambiente que rodea a las células, el tejido que produce la citoquina o la dosis y tiempo de exposición (Fajardo *et al.*, **1992**). En el caso de la inhibición de la migración de miofibroblastos causada por la mezcla de metabolitos de ETs, podría tener un efecto protector frente a una fibrosis excesiva, como la que se puede producir cuando el

mecanismo homeostático que controla la reparación de tejidos se descontrola en las EII. Parece ser que los efectos inhibitorios de los metabolitos de los ETs sobre la migración de los miofibroblastos son independientes de los niveles de PGE₂. El tratamiento de los miofibroblastos de colon con IL-1 β o TNF- α indujo la migración de estas células. Sin embargo, solo IL-1 β exhibió la capacidad de aumentar los niveles de PGE₂. Además, la inhibición observada sobre la migración de los miofibroblastos en las células co-tratadas con IL-1 β y los metabolitos derivados de los ETs, no se observó en el co-tratamiento con TNF- α o en células no inflamadas.

Otra molécula reguladora asociada con las reacciones inflamatorias en la mucosa intestinal y con un papel crucial en la migración de los miofibroblastos es PAI-1. Aunque el efecto neto de PAI-1 sobre la motilidad celular también depende de diversos factores (composición de la matriz extracelular (MEC), concentración de PAI-1, expresión de receptores celulares, etc.), en general, la expresión de PAI-1 se induce en el fenotipo migratorio mientras que la migración se reduce a bajos niveles de PAI-1 (Dellas *et al.*, 2005). Nuestros resultados indican que la inducción de la migración de los miofibroblastos de colon por IL-1 β y TNF- α se asocia a una inducción significativa de PAI-1 y que la inhibición del proceso por la mezcla de metabolitos o Uro-A está asociada a su vez con una disminución de PAI-1.

La migración celular y la reparación de tejidos son mecanismos complejos que implican la interacción y regulación de múltiples células y factores (Barrientos *et al.*, 2008). En nuestro estudio hemos utilizado *antibody arrays* para investigar los efectos de las citoquinas y los metabolitos de ETs sobre varias familias de factores de crecimiento que están implicados en el crecimiento y migración celular. En general, bajo condiciones pro-inflamatorias, como ocurre en casos de inflamación aguda, las citoquinas IL-1 β y TNF- α están sobre-expresadas y activan otras células tales como los

miofibroblastos que producen altos niveles de factores de crecimiento (Barrientos *et al.*, 2008; Andoh *et al.*, 2005). Por ejemplo, el análisis transcripcional de la migración de queratinocitos humanos se ha asociado con un aumento en la expresión de PAI-1 además de una sobre-expresión de varios factores de crecimiento, como VEGF, PDGF- β y TGF- β 1 (Czekay *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran que la exposición de los miofibroblastos de colon a las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α se asocian con un incremento de los niveles de PAI-1 y con la sobre-expresión general de algunos factores de crecimiento de las familias de IGF, EGF, FGF y PDGF. De particular interés es la familia PDGF y sus receptores, y en concreto PDGF-BB y PDGF-R- β , que están probablemente relacionados con el desarrollo de fibrosis intestinal (Bonner, 2004). Mediante la técnica de *antibody arrays* detectamos una disminución general de estos PDGF tras los tratamientos con la mezcla de metabolitos o Uro-A lo que sugiere un mecanismo potencialmente preventivo de estos metabolitos frente a los desórdenes fibróticos. Aunque la disminución de la expresión de PDGF-BB y PDGF-R- β no se confirmó por ELISA, estos datos coinciden con los presentados en el capítulo anterior en el que se observó que PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-AA y PDGF-R- β estaban sobre-expresados en las células endoteliales de aorta humana activadas por TNF- α , y Uro-A causó una reducción de la expresión de estas proteínas. La regulación de los niveles del factor de crecimiento placentario (PIGF) es también un factor interesante ya que se ha descrito que niveles elevados de PIGF inducen la expresión de PAI-1 (Patel *et al.*, 2010) mientras que su ausencia inhibe notoriamente la angiogénesis de la mucosa intestinal en casos de colitis aguda (Hindryckx *et al.*, 2010). Nuestros resultados muestran que tanto la mezcla de metabolitos como Uro-A redujeron los niveles de PIGF en los miofibroblastos de colon

inducidos por citoquinas. Esta respuesta fue similar a la observada en el capítulo anterior en células de aorta humana.

Durante la inflamación, las quimioquinas como IL-8 y CCL2 al igual que las moléculas de adhesión (ICAM-1) se inducen en los miofibroblastos subepiteliales de colon en respuesta a IL-1 β y TNF- α (Okuno *et al.*, 2002; Beddy *et al.*, 2004). Estas moléculas están implicadas en el proceso de infiltración y adhesión de los neutrófilos y monocitos a la zona inflamada y muestran elevados niveles de expresión en las enfermedades inflamatorias de colon (Maeda *et al.*, 2004). Para aportar más información sobre los posibles mecanismos anti-inflamatorios de los metabolitos de ETs, examinamos también los efectos de estos metabolitos sobre la adhesión de monocitos a los miofibroblastos de colon así como sobre la producción de quimioquinas relevantes y proteínas de adhesión. Nuestros resultados mostraron que la adhesión de monocitos se indujo moderadamente por las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 β y TNF- α , y se atenuó, principalmente, por acción de la mezcla de metabolitos. Este efecto inhibitorio se asoció, sin embargo, con mecanismos aparentemente diferentes en las células tratadas con IL-1 β y con TNF- α . De esta manera, la reducción de la adhesión de los monocitos por la mezcla de metabolitos en células inflamadas con TNF- α se vinculó con una disminución en la secreción de IL-8 por los miofibroblastos. La disminución de IL-8 también se observó tras el tratamiento con Uro-A. Como se ha indicado en el capítulo anterior, Uro-A también redujo los niveles de IL-8 en células endoteliales de aorta humana inflamadas con TNF- α . Por otro lado, en los miofibroblastos tratados con IL-1 β , la mezcla de metabolitos no tuvo ningún efecto sobre los niveles de IL-8 pero sí causó una pequeña disminución en los niveles de expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Una situación similar en la que se observan respuestas diferentes según las células se hayan tratado con IL-1 β o TNF- α ha sido indicada

previamente en fibroblastos aislados de intestino afectado con la enfermedad de Crohn y tratados con corticoesteroides anti-inflamatorios (Beddy *et al.*, 2004). En este estudio se observó que cuando estos fibroblastos eran inflamados con IL-1 β y tratados con los corticoesteroides se producía una reducción en la expresión de ICAM-1, que sin embargo, no se observaba en las células tratadas con TNF- α . En contrapartida a estos resultados, otros compuestos fenólicos como los presentes en la manzana, inhiben tanto ICAM-1 como IL-8 en células cancerosas de colon estimuladas con IL-1 β o con TNF- α . En relación a la regulación de los niveles de CCL2, solamente se detectó una pequeña disminución en la expresión de esta proteína tras el tratamiento con la mezcla de metabolitos en los miofibroblastos inflamados con TNF- α (resultados del análisis con *antibody arrays*).

A pesar de que existen algunas diferencias entre los datos obtenidos por la técnica de ELISA y los *antibody arrays*, los resultados de nuestro estudio muestran una correlación razonable entre ambas técnicas. Aunque la tecnología de *antibody arrays* ha mejorado sustancialmente y, en algunos casos, se han validado por ensayos ELISA (Li *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2010), sigue siendo una técnica costosa que limita el número de muestras que pueden analizarse y consecuentemente la reproducibilidad de los datos. En general, las proteínas que presentan elevados niveles de expresión y/o muestran cambios considerables como, por ejemplo, los observados tras la acción de las citoquinas pro-inflamatorias, son aquellas que se detectan mejor mediante *arrays* y se confirman más fácilmente con las técnicas de ELISA. En nuestro estudio, la determinación de la concentración mediante la técnica ELISA (rango ng/mL – pg/mL) mostró que las concentraciones de IL-8 y CCL-2 iban desde 500 hasta 7000 pg/mL y de 1000 a 2500 pg/mL, respectivamente. Los *antibody arrays* exhibieron cambios muy similares en las mismas moléculas lo que indicó una elevada sensibilidad. No existen

demasiados estudios con los que comparar los niveles de citoquinas producidas por los miofibroblastos de colon CCD18-Co en unas condiciones similares a las establecidas en nuestro estudio. Lippert *et al.*, (2007) midieron las concentraciones de IL-8 en los miofibroblastos CCD18-Co (5-50 pg/ μ g proteína) y en fibroblastos de colon aislados (10-180 pg/ μ g proteína) en medio de cultivo específico. Los niveles de CCL-2 en fibroblastos asociados a cáncer puede variar desde 350-660 hasta 1800-2950 pg/mL tras la exposición a TNF- α (Mueller *et al.*, 2010). En cambio, cuando los niveles de expresión de las proteínas son bajos y/o los cambios producidos son pequeños, como los que inducen los compuestos de la dieta a dosis bajas, los resultados son menos reproducibles y más difíciles de confirmar por ELISA. No descartamos que las diferencias encontradas en este capítulo y en el anterior, entre los resultados de los *antibody arrays* y los ensayos ELISA, puedan además deberse a que se utilicen distintos anticuerpos en cada técnica.

En los últimos años se ha incrementado de forma importante el número de estudios *in vitro* que tratan de determinar los posibles efectos de los compuestos fenólicos de la dieta en condiciones más representativas de la situación *in vivo* tras la ingesta dietética de esos compuestos (González-Sarrías *et al.*, 2010a). En estos ensayos se tiende a utilizar concentraciones bajas de los metabolitos apropiados frente a modelos celulares adecuados. En general parece que bajo estas condiciones, los metabolitos inducen, en general, respuestas fenotípicas moderadas asociadas a una modulación modesta de múltiples proteínas diana. Estos efectos son más difíciles de validar que aquellos que se obtienen tras el uso de dosis farmacológicas de una determinada droga o compuesto, y requiere más estudios para evidenciar el papel de los metabolitos de los compuestos fenólicos sobre la salud humana. Este trabajo, es un paso en esta dirección. En conjunto nuestros resultados apoyan la hipótesis en la que trabaja nuestro grupo

desde hace tiempo y que establece que concentraciones en el rango μM de los metabolitos derivados de los ETs que pueden alcanzarse en el intestino tras la ingesta de granada través de la dieta pueden ejercer efectos inmunomoduladores sobre las células de la barrera intestinal y contribuir a la prevención de las EII.

ANEXO I

Tabla suplementaria S5.1. Perfil de expresión de factores de crecimiento en miofibroblastos de colon CCD18-Co y cambios detectados tras el tratamiento con TNF- α ; TNF- α + Uro-A; TNF- α y la mezcla de metabolitos (MIX).

Proteína	TNF/CT		TNF- α +MIX / TNF		TNF- α +Uro-A / TNF	
Símbolo	Cambio (nº veces)	Valor p	Cambio (nº veces)	Valor p	Cambio (nº veces)	Valor p
<i>Nivel de expresión relativo moderado (<0,25 y >0,1)</i>						
IGF-II	NC (1,17)	-	NC (-1,04)	-	-1,75	0,172
HGF	NC (1,25)	-	-1,40	0,031	2,46	0,092
<i>Nivel de expresión relativo bajo (<0,1 y >0,01)</i>						
FGF4	1,62	0,103	-1,53	<0,001	-1,47	-
EGF	1,66	0,041	-1,51	0,029	-1,42	-
VEGF-D	NC (-1,17)	-	NC (1,18)	-	-1,81	-
PDGF-AA	NC (1,29)	-	NC (-1,17)	-	-1,55	0,068
HB-EGF	NC (1,24)	-	-1,40	0,152	NC (1,02)	-
VEGF R3	NC (-1,24)	-	NC (1,25)	-	NC (-1,21)	-
SCF	-6,87	0,098	3,47	0,019	5,09	0,023
PIGF	1,84	0,095	-2,18	0,068	-2,24	0,025
NT3	1,40	0,195	-1,42	0,147	-1,77	0,053
IGFBP-2	1,40	-	-1,35	0,178	NC (1,08)	-
PDGF-BB	1,41	-	-1,84	0,105	-1,55	0,111
IGFBP-6	1,36	-	-1,64	0,016	NC (1,01)	-
PDGF-AB	1,33	-	-1,45	-	-1,86	0,047
M-CSFR	NC (1,25)	-	NC (-1,12)	-	-1,73	0,072
IGF-I SR	1,76	0,073	-2,35	0,003	NC (-1,17)	-
IGF-I	1,62	0,066	-2,13	0,006	-1,37	0,148
VEGF R2	NC (-1,19)	-	1,41	-	-1,47	-
IGFBP-1	1,37	0,194	-1,45	0,102	-1,49	-
M-CSF	1,52	0,175	5,08	0,139	-2,66	0,016
SCFR	NC (-1,11)	-	NC (1,06)	-	-2,70	0,038
AR	1,32	-	-1,36	0,088	NC (1,21)	-
bFGF	1,32	-	-1,51	0,114	1,81	-
VEGF	NC (-1,18)	-	1,43	-	NC (-1,12)	-
GDNF	1,64	0,186	-1,55	-	NC (1,04)	-
EGFR	1,99	0,093	-2,10	0,026	NC (-1,04)	-
PDGFR β	1,51	-	-1,36	0,095	-2,21	0,061
TGF β 2	NC (1,00)	-	1,47	-	-1,53	-
TGF β 3	NC (-1,13)	-	1,67	-	-2,45	-
PDGFR α	1,53	-	-1,41	-	-2,29	0,007
bNGF	1,71	0,053	-1,93	0,072	NC (1,09)	-
FGF6	1,57	-	5,68	0,007	NC (1,09)	-
NT4	1,62	0,166	-1,40	-	-1,48	-
TGF β	NC (1,01)	-	1,48	-	-7,19	0,044
IGFBP-4	1,57	0,110	-1,80	0,022	NC (1,03)	-
FGF7	1,48	-	-1,96	0,008	NC (1,25)	-

Tabla suplementaria S5.1 (Continuación)

Proteína	TNF/CT		TNF- α +MIX / TNF		TNF- α +Uro-A /TNF	
	Cambio (nº veces)	Valor <i>p</i>	Valor Cambio (nº veces)	Valor <i>p</i>	Cambio (nº veces)	Valor <i>p</i>
<i>Nivel de expresión bajo (<0,01) o no detectado</i>						
IGFBP-3	1,71	0,155	-1,94	0,005	1,40	-
TGF- α	-1,94	-	2,59	-	-2,13	-
GCSF	1,40	-	NC (1,15)	-	1,45	-
GM-SCF	-	-	-	-	-	-

Valor umbral de referencia $\geq 1,3$ para sobre-expresión y $< -1,3$ para disminución de la expresión. A cada valor de intensidad de cada punto del *array* se le ha restado su valor de ruido de fondo y se han normalizado con los controles positivos. Los extractos celulares se obtuvieron de dos placas de cultivo que se mezclaron e hibridaron en una membrana. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 2; proteínas por duplicado en el *array*). Los valores de $p < 0,05$ se indican entre paréntesis. Los valores de $p < 0,2$ también se muestran para indicar tendencia. Abreviaturas: NC: sin cambio.

Tabla suplementaria S5.2 Perfil de expresión de factores de crecimiento en miofibroblastos de colon CCD18-Co y cambios detectados tras el tratamiento con IL-1 β ; IL-1 β + Uro-A; IL-1 β y la mezcla de metabolitos (MIX).

Proteína	IL1 β /CT		IL1 β +MIX / IL1 β		IL1 β +Uro-A / IL1 β	
Símbolo	Cambio (n° veces)	Valor p	Cambio (n° veces)	Valor p	Cambio (n° veces)	Valor p
<i>Nivel de expresión relativo moderado (<0,25 y >0,1)</i>						
HGF	2,42	0,026	-2,02	0,132	-1,33	0,180
IGF-II	NC (1,13)	-	NC (-1,26)	-	NC (-1,29)	-
<i>Nivel de expresión relativo bajo (<0,1 y >0,01)</i>						
SCFR	1,47	0,086	-1,41	0,104	NC (-1,17)	-
M-CSF	1,77	0,028	-1,60	0,007	-1,46	0,026
GDNF	NC (1,22)	-	NC (-1,01)	-	NC (1,06)	-
HB-EGF	1,38	0,001	NC (-1,09)	-	NC (-1,06)	-
NT3	NC (-1,24)	-	NC (-1,07)	-	NC (-1,10)	-
TGF β 3	2,12	0,001	NC (-1,08)	-	-1,69	0,001
TGF β 2	1,80	0,016	NC (-1,13)	-	-1,59	0,001
PDGFR β	1,78	0,091	-1,56	0,153	NC (-1,29)	-
PDGF-AA	1,96	0,044	-1,46	0,052	-1,37	0,067
EGF	1,53	0,038	-1,66	0,139	NC (-1,13)	-
TGF- α	NC (-1,13)	-	NC (-1,04)	-	-1,52	0,155
IGFBP-2	1,45	0,082	-1,32	0,109	-1,43	0,074
IGFBP-1	NC (-1,04)	-	NC (-1,04)	-	NC (-1,03)	-
M-CSFR	1,68	0,007	NC (-1,08)	-	-1,53	0,041
VEGF-D	2,53	0,001	-1,39	0,040	-1,99	0,001
bFGF	2,78	-	-2,68	-	-2,27	-
NT4	1,66	-	-1,45	-	-1,22	-
FGF4	1,49	-	-1,43	-	NC (-1,08)	-
EGFR	1,80	-	NC (-1,18)	-	NC(-1,19)	-
IGF-I SR	1,71	0,151	-1,51	0,057	-1,38	-

Tabla suplementaria S5.2 (continuación)

Proteína	IL1 β /CT		IL1 β +MIX / IL1 β		IL1 β +Uro-A / IL1 β	
Símbolo	Cambio (nº veces)	Valor <i>p</i>	Cambio (nº veces)	Valor <i>p</i>	Cambio (nº veces)	Valor <i>p</i>
<i>Nivel de expresión bajo (<0,01) o no detectado</i>						
AR	NC (-1,01)	-	NC (-1,28)	-	-1,69	-
VEGF R3	2,25	0,007	NC (-1,27)	-	-2,04	0,003
PDGF-AB	1,88	0,032	-1,51	0,118	-1,53	0,074
IGFBP-6	1,69	0,138	-1,48	-	NC (1,25)	-
VEGF	2,66	0,001	NC (-1,07)	-	NC (-1,69)	0,001
PDGF-BB	2,05	0,028	-1,77	0,088	-1,64	0,103
VEGF R2	2,40	0,028	NC (1,14)	-	-1,75	0,065
SCF	2,47	0,018	-1,81	0,087	-1,70	0,060
GCSF	-2,14	-	1,95	-	2,28	-
FGF6	2,13	0,021	-2,56	0,049	-2,28	0,054
IGF-I	1,92	0,021	-1,51	0,163	-1,41	0,193
PDGFR α	2,75	0,001	-1,49	0,042	-1,76	0,010
PIGF	2,42	0,006	-1,61	0,082	-1,66	0,031
bNGF	NC (1,15)	-	NC (-1,04)	-	NC (1,11)	-
TGF β	6,22	0,093	-1,47	-	-2,05	0,073
FGF7	2,94	0,014	-2,21	0,117	-2,01	0,168
IGFBP-4	2,14	-	-1,64	0,139	-1,49	-
IGFBP-3	2,45	0,037	-1,43	-	NC (-1,06)	-
GM-SCF	8,05	0,029	-1,80	-	-2,22	0,093

Valor umbral de referencia $\geq 1,3$ para sobre-expresión y $< -1,3$ para disminución de la expresión. A cada valor de intensidad de cada punto del *array* se le ha restado su valor de ruido de fondo y se han normalizado con los controles positivos. Los extractos celulares se obtuvieron de dos placas de cultivo que se mezclaron e hibridaron en una membrana. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 2; proteínas por duplicado en el *array*). Los valores de $p < 0,05$ se indican entre paréntesis. Los valores de $p < 0,2$ también se muestran para indicar tendencia. Abreviaturas: NC: sin cambio.

ANEXO II

Tabla suplementaria S5.3. Perfil de expresión de proteínas de adhesión en miofibroblastos de colon CCD18-Co y cambios detectados tras el tratamiento con TNF- α y el co-tratamiento con la mezcla de metabolitos (MIX)

Proteína	TNF / CT		TNF+MIX / TNF	
Símbolo	Cambio (nº veces)	Valor <i>p</i>	Cambio (nº veces)	Valor <i>p</i>
<i>Nivel de expresión relativa alto ($\geq 0,25$)</i>				
CCL2	2,98	0,037	-1,41	0,003
ICAM-1	1,53	-	NC (-1,20)	-
VCAM-1	3,92	<0,001	NC (1,03)	-
ALCAM	1,72	-	-1,61	-
IL-8	7,02	0,017	-1,75	-
<i>Nivel de expresión relativa moderado ($< 0,25$ and $\geq 0,025$)</i>				
SELL	NC (-1,20)	-	NC (1,10)	-
CDH3	NC (1,20)	-	NC (-1,10)	-
PF-4	NC (-1,13)	-	1,37	-
BCAM	1,44	-	-1,69	-
SELE	NC (-1,01)	-	2,01	0,048
CEACAM-1	NC (1,03)	-	-1,75	0,018
CD 14	-1,56	0,076	1,71	0,022
CDH5	NC (1,19)	-	NC (-1,23)	-
<i>Nivel de expresión relativa bajo o muy bajo ($< 0,025$) o no detectado</i>				
SELP	-1,33	-	1,52	-
PECAM-1	NC (-1,29)	-	-1,35	-
ICAM-3	-1,78	-	NC (1,00)	-
CDH1	1,85	0,015	-2,70	0,044
VEGF-C	-1,49	-	1,76	0,082
EpCAM	-3,70	-	NC (1,07)	-
ICAM-2	NC (1,06)	-	-1,53	-

Valor umbral de referencia $\geq 1,3$ para sobre-expresión y $\leq -1,3$ para disminución de la expresión. A cada valor de intensidad de cada punto del *array* se le ha restado su valor de ruido de fondo y se han normalizado con los controles positivos. Los extractos celulares se obtuvieron de dos placas de cultivo que se mezclaron e hibridaron en una membrana. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 2; proteínas por duplicado en el *array*). Los valores de $p < 0,05$ se indican entre paréntesis. Los valores de $p < 0,2$ también se muestran para indicar tendencia. Abreviaturas: NC: sin cambio.

CAPÍTULO 6

Un extracto de naranja rico en flavanonas reduce los niveles de expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y regula otros múltiples genes relacionados con inflamación, reparación de tejidos y fibrosis en miofibroblastos de colon humano

JA. Giménez-Bastida *et al.*, “A Citrus Containing Flavanones Represses Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Expresión and Regulates Multiple Inflammatory, Tissue Repair, and Fibrosis Genes in Human Colon Fibroblasts”, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 9305-15.

Un extracto de naranja rico en flavanonas reduce los niveles de expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y regula otros múltiples genes relacionados con inflamación, reparación de tejidos y fibrosis en miofibroblastos de colon humano

RESUMEN

El consumo de extractos naturales derivados de cítricos ricos en flavonoides se ha asociado con múltiples efectos beneficiosos, incluyendo efectos anti-inflamatorios aunque sus efectos específicos en la respuesta inflamatoria del intestino no se han investigado en profundidad. En este estudio, hemos utilizado microarrays para buscar cambios moleculares inducidos en miofibroblastos de colon humano tratados con un extracto de naranja enriquecido en flavanonas en condiciones parcialmente representativas de la situación *in vivo*. Las células de colon se trataron con el extracto una vez digerido (simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*) a concentraciones dietéticas y no tóxicas para las células. Bajo estas condiciones experimentales se indujeron en los miofibroblastos cambios moderados, pero significativos, en la expresión de múltiples genes asociados con reparación de tejidos e inflamación. Entre los genes más significativamente afectados por el tratamiento, los niveles de PAI-1 (ARNm y proteína) se redujeron mientras que los de la metaloproteínasa de la matriz-12 (MMP-12) aumentaron. Ambas proteínas están implicadas en procesos de remodelación de la matriz extracelular (MEC) y en la migración de los miofibroblastos. El tratamiento con el extracto de naranja también afectó de forma moderada a la capacidad de migración de los miofibroblastos y redujo la adhesión de monocitos a los miofibroblastos. La respuesta resultó diferente en células no estimuladas frente a

células pre-tratadas con la citoquina pro-inflamatoria TNF- α . Estos resultados indicaron que el extracto de naranja exhibía un efecto activador moderado de diversas funciones relacionadas con la inflamación en los miofibroblastos de colon y sugieren que el consumo regular de este tipo de extractos puede tener un efecto modulador *in vivo* en el intestino en relación con las enfermedades inflamatorias.

1. – INTRODUCCIÓN

La inflamación es el proceso fisiológico que protege al organismo eliminando estímulos peligrosos tales como patógenos o toxinas, e iniciando la curación y reparación de tejidos dañados. Se trata de un proceso muy complejo en el que intervienen distintos tipos de células (neutrófilos, células mononucleares y miofibroblastos) al igual que una cascada de mediadores moleculares altamente regulados por el organismo. La desregulación del proceso inflamatorio puede conducir al desarrollo de enfermedades crónicas como alergias, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias del intestino (EII) (Ardizzone *et al.*, 2005). En estos casos, se suelen administrar terapias con compuestos anti-inflamatorios para controlar la respuesta inflamatoria. Entre otros productos, se han utilizado de forma tradicional diversas plantas ricas en ciertos flavonoides por sus propiedades anti-inflamatorias como, por ejemplo, los flavonoides de los cítricos (Benavente-García *et al.*, 2008). Las flavanonas son los flavonoides predominantes en los cítricos donde se encuentran principalmente en forma de glicósidos (naringina, neohesperidina, hesperidina, etc) (Merken *et al.*, 2000). Estos compuestos son interesantes desde el punto de vista comercial debido a la multitud de posibles aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Gran parte de la bioactividad de los flavonoides de los cítricos parece repercutir sobre propiedades de la sangre y sobre las células endoteliales microvasculares, haciendo de la actividad anti-

inflamatoria de las flavanonas de los cítricos un área importante de investigación. En esta línea, la hesperidina se ha llegado a comercializar como un producto que mejora la permeabilidad y la integridad del revestimiento capilar (Garg *et al.*, 2001). La hesperidina también ejerce efectos anti-inflamatorios sistémicos en modelos *in vivo* de ratón con inflamación intestinal inducida por lipopolisacárido (LPS) (Yeh *et al.*, 2007) o inflamación inducida por otras endotoxinas (Kawaguchi *et al.*, 2004a), en modelos de rata que presentan artritis reumatoide (Li *et al.*, 2008; Kawaguchi *et al.*, 2006) o frente a inflamación en piel de ratón (Koyuncu *et al.*, 1999). La naringina también reduce, en ratones, la infección inducida por shock endotóxico (Kanno *et al.*, 2006; Kawaguchi *et al.*, 2004a) mientras que su aglicona, naringenina, exhibe propiedades anti-inflamatorias frente a macrófagos y en sangre humana (Bodet *et al.*, 2008).

Existen también algunos estudios que investigan las propiedades anti-inflamatorias de los flavonoides de los cítricos en el intestino. La hesperidina mejora la inflamación colónica reduciendo el daño en colon y la actividad mieloperoxidasa (MPO) en modelos animales con colitis experimental inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) (Crespo *et al.*, 1999) o por dextrán sulfato sódico (DSS) (Lei *et al.*, 2009). Las EIIs se caracterizan por inflamación crónica de la mucosa como resultado de la infiltración de células inmunes (neutrófilos, linfocitos y monocitos) acompañada de una sobreproducción de radicales libres de oxígeno que conducen a una alteración de la barrera epitelial (Ardizzone, *et al.*, 2005). En el colon, los miofibroblastos subepiteliales intestinales (ISEMFs) están implicados en procesos de reparación de heridas y de la mucosa, gracias a su capacidad de sintetizar y secretar colágenos y otros componentes de gran importancia en la remodelación de la matriz extracelular (MEC). Los ISEMFs juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria del intestino ya que afectan a la migración y activación de células inmunes

a través de la síntesis de citoquinas, quimioquinas, eicosanoides, proteínas de adhesión y otros mediadores inflamatorios (Andoh *et al.*, 2007).

Objetivos. Los efectos anti-inflamatorios en el intestino de extractos naturales ricos en flavanonas así como los posibles mecanismos moleculares activados por estos productos en células de la mucosa del colon no se han investigado en profundidad. Para intentar dilucidar algunos de los posibles mecanismos mediante los cuales estos extractos podrían contribuir a proteger frente a procesos inflamatorios del intestino, en este estudio se investigaron algunas de las respuestas celulares y moleculares de miofibroblastos de colon humanos tratados con un extracto de naranja rico en flavanonas en condiciones parcialmente representativas del tracto gastro-intestinal *in vivo*. El extracto inicial se sometió a un proceso simulado de digestión gastro-duodenal y la digesta resultante se utilizó para tratar las células a concentraciones no tóxicas y que podrían alcanzarse en el intestino a través del consumo oral. Siguiendo con nuestro interés en la aplicación de técnicas de análisis múltiple (*arrays*) para estudios moleculares, en este capítulo utilizamos *microarrays* de expresión génica para investigar posibles cambios en los niveles de expresión de genes en relación con la respuesta inflamatoria de estas células. En paralelo también examinamos la respuesta fenotípica de las células analizando específicamente los efectos del extracto sobre i) la migración de miofibroblastos de colon y ii) la adhesión de monocitos a miofibroblastos de colon.

2. – MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. – Materiales

En este estudio se utilizó el extracto soluble de naranja amarga, rico en flavanonas, descrito en el capítulo 3 (**apartado 3.1**). Las soluciones de extracto se

prepararon disolviendo 0,1 g del extracto en polvo en 50 mL de agua milliQ (0,2%) con agitación magnética a temperatura ambiente. Las flavanonas individuales se disolvieron en DMSO (solución stock 10mM). Los reactivos de uso general también están descritos en el **apartado 3.1** del capítulo general de Materiales y Métodos.

2.2. – Digestión *in vitro*

El extracto diluido se sometió a una digestión salival, gástrica y pancreática siguiendo las indicaciones de un método publicado previamente (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007a) con algunas modificaciones. Los 50 mL de solución de extracto (0,2%) se sometieron primero a digestión salival incubándose con 200 μ L de saliva humana a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 5 min. A continuación, basándonos en resultados obtenidos en estudios *in vivo* (Ríos *et al.*, 2002), se inició la digestión gástrica: la solución de extracto de naranja se sometió a un proceso de acidificación gradual hasta alcanzar un pH 2,0 adicionando secuencialmente HCl (0,1 N) y pepsina en un baño en agitación continua como se indica en la **Tabla 6.1**:

Tabla 6.1. Adición secuencial de HCl 0,1 N

Tiempo	pH	Cantidad de pepsina
0	7,5	+ 25% de la pepsina
15'	5,5	+ 25% de la pepsina
30'	3,0	+ 50% de la pepsina
60'	1,9	-

Para la digestión pancreática, a 20 mL de la muestra anterior se le añadió NaHCO_3 hasta alcanzar un pH aproximadamente neutro (pH = 7,5) para posteriormente añadir 5 mL de una mezcla de pancreatina–sales biliares e incubar en un baño a 37 °C durante 2 h. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un frasco a 37 °C en agitación suave y en oscuridad. Las muestras control se trataron igual pero utilizando volúmenes

equivalentes de agua milliQ ultrapura en lugar de extracto. Al finalizar cada una de las etapas de la digestión, se tomó 1mL de las muestras, se filtró (0,2 µm) y se analizó por HPLC-DAD (capítulo 3, **apartado 3.5.3.1**) para determinar la composición y estabilidad de las flavanonas en el extracto.

2.3. – Estabilidad de las flavanonas en el tracto gastrointestinal de ratas

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (n = 15). Su descripción y mantenimiento están descritos en el capítulo 3 (**apartado 3.3.1**). Las ratas Sprague-Dawley se alimentaron con el pienso estándar hasta el momento del ensayo en el que se les suministró el extracto de naranja amarga diluido al 0,2% en agua. Se preparó una solución con 150 mg de extracto de naranja (63,15 mg de flavanonas totales) en 0,5 mL de agua y se administró con una cánula gastroesofágica a las ratas del estudio. Para ello, los animales se anestesiaron ligeramente con xilazina (Xilagesic 2%) (Calier Laboratories, Barcelona, España) y ketamina (Imalgene 1000) (Merial Laboratories, Barcelona, España) a la dosis 1:1 v/v; 0,32 mL/kg peso. A los tiempos 1, 2, 6, 8, 12 y 24 h después de la administración, los animales se volvieron a anestesiar (xilazina:ketamina 1:1 v/v; 1,0 mL/kg peso corporal), y se sacrificaron por punción cardíaca. Se extrajo el estómago, el intestino delgado y el colon. El contenido de esos órganos se lavó con PBS en frío, se pesó en tubos de 15 mL estériles y se congeló en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlo a -80 °C hasta la extracción y análisis de las flavanonas. El proceso de extracción se llevó a cabo siguiendo un protocolo descrito anteriormente en el que se realizó una extracción con una solución de MeOH acidificada, una posterior concentración en un rotavapor y un aislamiento de los compuestos mediante el uso de cartuchos de fase reversa C18 SEP-PAK. Los

compuestos se resuspendieron en MeOH y finalmente se analizaron por HPLC (Espín *et al.*, 2007b) (**apartado 3.5.3.1**).

2.4. – Análisis de flavanonas por HPLC-DAD

Las muestras (extracto original, alíquotas digeridas, medio de cultivo o contenido del lumen) se filtraron (0,2 µm) y analizaron por HPLC-DAD para determinar la composición y recuperación de flavanonas solubles. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo como se describe en el capítulo 3 (**apartado 3.5.3.1**). Los resultados se muestran como media aritmética ± desviación estándar (DE) de un mínimo de 3 experimentos independientes (n = 3 – 7).

2.5. – Cultivos celulares y tratamientos de las células.

El crecimiento, mantenimiento y subcultivo de los miofibroblastos de colon humano CCD18-Co está descrito en los **apartados 3.2.1.1.1** y **3.2.1.1.2** del capítulo general de Materiales y Métodos. Para los experimentos descritos en este capítulo, se utilizaron células entre los pases 30 y 35. Los monocitos de leucemia humana (THP-1) se cultivaron y mantuvieron como se describe en el capítulo 3 (**apartados 3.2.1.3.1** y **3.2.1.3.2**). Se utilizaron células THP-1 entre los pases 15 y 30.

Los miofibroblastos de colon CCD18-Co se cultivaron a una densidad de 6000 células/cm en placas de 6 pocillos (extracción ARN total) o placas petri de 10 cm Ø (extracción de proteína) (Nunc, Roskilde, Dinamarca), dejando 48 h para su correcta adhesión y tratándolas en el 5^o o 6^o día (~80% confluencia) de la siguiente manera: i) extracto naranja digerido (~60 µM de flavanonas totales en el medio de cultivo); ii) extracto de naranja no digerido (~60 µM de flavanonas totales en el medio de cultivo); iii) mezcla de las 6 flavanonas mayoritarias detectadas en el extracto (~60 µM de flavanonas totales en el medio de cultivo); iv) 36 µM naringina + 17 µM neohesperidina

y 72 μM naringina + 34 μM neohesperidina; v) 1,5 μM naringenina + 2,3 μM hesperidina y 3 μM naringenina + 4.6 μM hesperidina. Los tratamientos con extracto o flavanonas individuales se llevaron a cabo durante 12, 24 y/o 48 h. El extracto de naranja se disolvió en agua mientras que las flavanonas se disolvieron en DMSO ($\leq 0,1\%$ en el medio de cultivo) y ambos se filtraron (0,22 μm) antes de adicionarse al medio de cultivo. Las células control se trataron con la digesta control (mezcla de enzimas y sales + agua) o DMSO ($\leq 0,1\%$).

En un segundo grupo de experimentos, los miofibroblastos de colon CCD18-Co se cultivaron en medio suplementado con un 0,1% de SBF durante 24 h y se trataron con la citoquina TNF- α (20 ng/mL). Tras 8 h en presencia de la citoquina, se añadió el extracto de naranja sin digerir (~ 60 μM flavanonas totales en el medio de cultivo) durante 24 h.

Para descartar que el extracto de naranja generase citotoxicidad en el medio de cultivo por un aumento del pH o de la osmolaridad, se midieron ambos parámetros mediante un osmómetro de presión de vapor 5520 (VAPRO[®] Wescor) y papel indicador de pH (Neutralit[®], pH 5,5 – 9,0; Merck). Por otro lado, se determinó la proliferación y la viabilidad celular después de exponer las células a concentraciones crecientes del extracto de naranja digerido (concentración equivalente de flavanonas en el medio de cultivo de 2 a 470 μM) durante 12 y 24 h. Para determinar la estabilidad de las flavanonas en el medio de cultivo, se determinó por HPLC-MS la concentración de cada una de ellas a los distintos tiempos de incubación.

2.6. – Proliferación celular y viabilidad

Al final de los tratamientos, las células se tripsinizaron (2,5 g/L tripsina, 0,2 g/L EDTA), se resuspendieron en medio de cultivo y se determinó la viabilidad y número de

células mediante la técnica del azul tripano y contaje en una cámara de Neubauer como se describe en el capítulo 3 (**apartado 3.2.2.1**). Los resultados de proliferación y viabilidad se obtuvieron comparando las células tratadas respecto a las no tratadas. Los datos se presentan como media aritmética \pm DE de 3 experimentos independientes (n = 3; 3 placas por ensayo).

2.7. – Extracción de ARN

La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el kit comercial de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante (capítulo 3, **apartado 3.4.1.1**). La concentración y pureza se midió en un espectrofotómetro Nanodrop (capítulo 3, **apartado 3.4.1.3**) y se tomaron las muestras cuya relación A_{260}/A_{280} se encontró entre 1,8-2,1 para el análisis mediante *microarrays*. La integridad del ARN ribosómico se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) (capítulo 3, **apartado 3.4.1.4**). Los tratamientos y extracciones se realizaron por triplicado (n = 3).

2.8. – *Microarrays*

La búsqueda de genes con niveles de transcripción alterados en las células de colon tras el tratamiento con el extracto de flavanonas digerido, se realizó mediante análisis de *microarrays* Affymetrix (GeneChip Affymetrix microarray HG U133 Plus 2.0) (capítulo 3, **apartado 3.4.2**). Los datos obtenidos se trataron como se indica en el **apartado 3.4.2** del capítulo general de Materiales y Métodos. Para seleccionar los genes que exhibían cambios diferenciales en la expresión, se siguieron los siguientes criterios: i) $FDR < 0,2$ ($p < 0,005$); ii) tratado/control (T/C) $\geq 1,25$ o $\leq 0,80$. Las sondas (transcritos o genes) seleccionadas se utilizaron posteriormente para el análisis funcional y biológico mediante la aplicación del software *Ingenuity Pathway Analysis*

(IPA; www.ingenuity.com). Los resultados de los análisis de microarrays están depositados en la base de datos del NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) pudiendo acceder a ellos a través de GEO Series mediante el número GSE15322.

2.9. – Análisis por RT-PCR

A partir de los resultados anteriores se seleccionaron 5 genes de interés para confirmar los cambios por RT-PCR cuantitativa (Taqman system, Applied Biosystems, ABI, Madrid, Spain) (capítulo 3, **apartado 3.4.3.1**). Los cebadores y sondas de los genes seleccionados se obtuvieron de Applied Biosystem (ABI, Madrid, Spain) y son los siguientes: *SERPINE1* (Hs00167155_m1); *MMP12* (Hs00899662_m1); *SMAD3* (Hs00232219_m1); *TGF β -R-2* (70/80kDa) (Hs00234253_m1); *SMURF2*, (Hs00224203_m1) (_m1 indica que la sonda está diseñada para no unirse a ADN genómico). Los niveles de expresión de los genes seleccionados se normalizaron con *GAPDH* (Hs99999905_m1) usando una curva estándar como método de cuantificación (capítulo 3, **apartado 3.4.3.1.1**). Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE de al menos 3 experimentos independientes (n = 3 – 6).

2.10. – Western blots

Tras el tratamiento, las células se lisaron siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 3 (**apartado 3.4.4.2**). La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1976) (capítulo 3, **apartado 3.4.4.1**). El desarrollo del *Western blot* está descrito en el capítulo 3 (**apartado 3.4.4.3**). Se cargaron las mismas cantidades de proteína (10 μ g) por calle y se separaron en un gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) al 10%. Las proteínas analizadas y las diluciones aplicadas a cada

anticuerpo fueron: SERPINE1 (1:1000), MMP-12 (1:250), SMAD3 (1:500), TGF β -R-2 (1:500), SMURF2 (1:1000) y GAPDH (1:2500). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron IgG anti-ratón o IgG anti-conejo a una dilución 1:5000 (capítulo 3, **apartado 3.1**). Los resultados se presentan como la media aritmética \pm DE de un mínimo de 3 experimentos independientes (n = 3 – 7).

2.11. – Migración celular. Ensayo de “Reparación de tejidos”

Tras el tratamiento de los miofibroblastos de colon, el ensayo se desarrolló como se describe en el capítulo 3 (**apartado 3.2.3**) con algunas modificaciones. Los miofibroblastos de colon confluentes se rasparon horizontalmente con una punta de pipeta estéril. El medio de cultivo, las células disgregadas y los restos celulares generados se aspiraron con una bomba de vacío y se lavaron dos veces con PBS. A continuación, se añadió el medio de cultivo a los pocillos: i) medio 10% SBF; ii) medio 0,1% SBF. Tras 24 h, se adicionó TNF- α (20 ng/mL, 8 h). Las células inflamadas se trataron con extracto de naranja rico en flavanonas sin digerir durante 24 h. Se tomaron fotografías con un microscopio Nikon Diaphot-TMD (Tokio, Japón). Los resultados se obtuvieron de un mínimo de 2 experimentos distintos (n = 2 – 3; 2 pocillos por experimento).

2.12. – Ensayo de adhesión de monocitos

El ensayo de adhesión está descrito en el capítulo 3 (**apartado 3.2.4**). Los miofibroblastos de colon se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 12.500 células/pocillo. Al alcanzar la confluencia se sustituyó el medio de cultivo por: i) medio 10% SBF; ii) medio al 0,1% SBF. Pasadas 24 h, las células se trataron con la citoquina pro-inflamatoria TNF- α (20 ng/mL, 8 h). A continuación, se añadió el

extracto de naranja rico en flavanonas sin digerir y se dejó durante 24 h. Finalizado el tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron los monocitos. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (n = 3; 6 pocillos por ensayo).

2.13. – Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado en los distintos ensayos de este estudio está descrito en el **apartado 3.6** de la sección general de Materiales y Métodos. Para el análisis de los *microarrays* se aplicó la corrección del “test de la *t*” de Benjamín-Hochberg (Benjamín y Hochberg, 1995) con corrección para la proporción de falsos positivos (FDR) como se indica en el capítulo 3 (**apartado 3.4.2**).

3. – RESULTADOS

3.1. – Estabilidad de las flavanonas presentes en el extracto de naranja durante la digestión gastrointestinal *in vitro*

La composición en flavanonas del extracto de naranja (0,2% en agua) determinada por HPLC-DAD viene determinada en la **Tabla 6.2**:

Tabla 6.2. Análisis del contenido en flavanonas del extracto de naranja amarga original mediante análisis por HPLC-DAD.

Flavanonas	
Naringina	24,5* \pm 2,6
Hesperidina	1,7 \pm 0,4
Neohesperidina	11,4 \pm 0,8
Naringenina	0,4 \pm 0,1
Hesperetina	0,4 \pm 0,1
Isosakuranetina	0,2 \pm 0,1
Otras	3,5 \pm 0,8

* valores expresados como % en peso de flavanona en el extracto original (n = 7 análisis independientes; los resultados se presentan como la media aritmética \pm DE).

Los análisis de los niveles de flavanonas tras las diferentes etapas de la digestión *in vitro* mostraron que no se produjo ningún cambio significativo por efecto del pH, T^a o acción de los enzimas gástricos y pancreáticos. Estos datos indican que las flavanonas presentes en el extracto de naranja amarga son altamente estables en las condiciones químicas y enzimáticas en las que se desarrollan los procesos de digestión gástrico-duodenal y que no sufren degradación o transformación detectable durante estos procesos. Estos resultados sugieren que las principales flavanonas del extracto de naranja amarga son capaces de alcanzar el intestino grueso en su forma molecular original.

3.2. – Estabilidad de las flavanonas en el tracto digestivo *in vivo*

Para determinar si la estabilidad que exhibieron las flavanonas del extracto de naranja tras la digestión *in vitro* se reproducía en un modelo *in vivo*, se examinó por HPLC-DAD la presencia de las flavanonas (en su forma molecular original) en el tracto gastrointestinal (contenido del lumen del estómago, intestino delgado e intestino grueso) de ratas alimentadas con el extracto de flavanonas. En la **Tabla 6.3** se presentan los resultados obtenidos en este ensayo:

TABLA 6.3. Flavanonas totales (mg) detectadas en el estómago, intestino delgado (ID) y colon a las distintas horas examinadas en ratas (% de la dosis administrada total de flavanonas, 57,63 mg).

Tiempo	Estómago	ID	Colon	Total
1 hora	20,6 (32,6 %)	11,4 (18,1 %)	ND	32,0 (50,7%)
2 horas	24,0 (38,0 %)	9,0 (14,3%)	0,08 (0,13 %)	33,0 (52,3 %)
6 horas	17,6 (27,9 %)	10,8 (17,1 %)	17,1 (27,1 %)	45,5 (72,1 %)
12 horas	10,2 (16,2 %)	0,8 (1,3 %)	9,8 (15,5 %)	20,8 (32,9 %)
24 horas	0,5 (0,80 %)	0,04 (<0,06%)	0,4 (0,6 %)	0,9 (1,5 %)

Abreviaturas: ND: no detectado

Una hora después de suministrar el extracto a las ratas, se recuperó aproximadamente un 33% en el estómago y un 18% en el intestino delgado del total de flavanonas administradas, detectándose 12 h después de la administración flavanonas en

ambos órganos. A las 2 h, las flavanonas se empezaron ya a detectar en el colon, alcanzando la concentración más alta a las 6 y 12 h después de la administración. A las 24 h, todavía se encontraron trazas de flavanonas en el lumen del estómago y del intestino delgado y grueso (la concentración de flavanonas detectada fue de 345 μM para un volumen estimado de 2 mL). El máximo porcentaje de recuperación fue del 72% del total administrado a las 6 h. En todas las muestras analizadas, se pudieron detectar y cuantificar la mayoría de las flavanonas presentes en el extracto de naranja. Estos resultados evidencian la estabilidad de las flavanonas en condiciones fisiológicas en el intestino e indican que estos compuestos pueden llegar y permanecer inalterados en el colon durante varias horas.

3.3. – Efecto del extracto de naranja rico en flavanonas y digerido sobre la expresión génica de los miofibroblastos de colon humanos CCD18-Co.

Para determinar la cantidad máxima de extracto de flavanonas digerido que podría añadirse al medio de cultivo y que no producía citotoxicidad y/o alteración grave de las condiciones de cultivo, se midieron la proliferación y viabilidad celular así como el pH y la osmolaridad en el medio de cultivo, después de añadirle cantidades crecientes de extracto (2,0 a 60 μM) o de digesta control siempre filtradas por 0,2 μm . Los datos obtenidos indican que a las concentraciones ensayadas, el pH del medio de cultivo se mantenía entre 7,0 y 7,5 y la osmolaridad entre 260 y 320 mOsm/L (rango normal tolerado por las células humanas). En estas condiciones no se afectaron ni la proliferación (> 95%) ni la viabilidad (> 90%) de las células, a ninguno de los tiempos estudiados (12 y 24 h), frente a los valores de células tratadas con la digesta control (mezcla de sales y enzimas) o células no tratadas (solo medio de cultivo, EMEM). El análisis de las flavanonas en el medio de cultivo mostró que estos compuestos son estables en las condiciones utilizadas incluso después de 24 h de incubación.

Los análisis de *microarrays* se utilizaron para investigar los posibles cambios inducidos en la expresión de genes en los miofibroblastos de colon, por efecto del tratamiento con el extracto de naranja pre-digerido a una dosis que no causara citotoxicidad o inhibición de la proliferación celular, y que fuera representativa de las cantidades que podían alcanzarse en el colon. Se seleccionó pues la concentración de extracto más elevada que no causó inhibición de la proliferación celular (equivalente a 60 μ M de flavanonas) durante 24 h (período en el que las flavanonas permanecían estables en el medio de cultivo).

Tras el tratamiento, los resultados revelaron que un total de 705 sondas (un 1,3% de un total de 54676 sondas representadas en el chip) mostraban cambios significativos aunque moderados en su expresión entre células tratadas con el extracto de naranja digerido y células control. Los genes regulados significativamente se analizaron mediante el software IPA para: i) identificar aquellos genes que podrían estar potencialmente implicados en enfermedades específicas, funciones celulares a nivel molecular y procesos fisiológicos y ii) determinar rutas biológicas en las cuales algunos de estos genes estuviesen implicados y pudiesen estar afectadas en los miofibroblastos de colon humano a causa del tratamiento. Encontramos que una buena parte de los genes modulados por el tratamiento estaban principalmente implicados en enfermedades inflamatorias, en la respuesta inmune y en los procesos de reparación de tejidos y fibrosis. Las funciones celulares y moleculares que más parecían estar afectadas tras el tratamiento fueron la migración y la adhesión celular, en particular, quimiotaxis y atracción de células inmunes. En la **Tabla 6.4** se presenta una selección de genes que mostraron cambios significativos de expresión tras el tratamiento con el extracto de flavanonas digerido y que están asociados con el papel de los ISEMFs en inflamación y procesos de reparación tisular en el intestino. En general, observamos la inducción de

varias interleuquinas, quimioquinas y prostaglandina sintasas, mientras que diversos genes relacionados con componentes extracelulares, colágenos y factores de crecimiento se encontraban tanto inducidos como reprimidos en las células tratadas.

Tabla 6.4. Selección de genes de los miofibroblastos de colon CCD18-Co que fueron modulados significativamente tras la exposición al extracto de naranja digerido y que están implicados en la respuesta inmune y en la reparación de tejidos en el intestino.

Símbolo (genes)	T / C*
Componentes de la MEC	
COL13A1	0,6
COL1A1	0,7
COL1A2	0,8
COL5A1	0,7
COL11A1	1,4
COL4A1	1,6
COL4A3	1,3
LAMA1	1,6
MMP12	2,1
Factores de crecimiento y genes relacionados	
FGF5	0,6
HB-EGF	0,5
IGFBP3	0,7
TGFβ-R-2	0,7
VEGFC	0,7
AREG	2,2
TGFβ-2	1,3
TGFβ-R-3	1,5
Interleuquinas	
IL-11	1,3
IL-1β	1,7
IL-R1	1,7
IL-24	1,6
IL-6	1,6
IL-8	1,5
IRAK2	1,5
Quimioquinas	
CCL20	1,6
CXCL1	1,7
CXCL10	2,2
CXCL11	1,9
CXCL2	2,2
CXCL3	2,4
CXCL5	3,1
CXCL6	1,9
Inhibidores de Proteasas	
SERPINE1	0,4
SERPINB1	1,4
SERPINE2	1,7
Prostaglandina Sintasas	
PTGES	2,1
PTGS2	1,7

*T/C: Ratio treated cells/control cells.

Entre los genes regulados, se detectó una importante disminución en la expresión del gen *SERPINE1* o *PAI-1* y una inducción en los niveles de *MMP-12*. Estos dos genes, junto con otros relacionados (*TGFβ-R-2*, *SMAD3* y *SMURF2*) se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa para confirmar los cambios detectados por *microarrays*. Para los análisis por RT-PCR se usaron alícuotas del mismo ARN utilizado para los *microarrays* (células tratadas durante 24 h) y también ARN obtenido de otros experimentos independientes (células tratadas durante 12 y 24 h). Cada experimento generó tres muestras de ARN extraídas de 3 placas o pocillos independientes. Los resultados obtenidos por RT-PCR se presentan como cambios en la expresión relativa (T/C) en la **Figura 6.1a** y confirmaron los cambios obtenidos por *microarrays* para *PAI-1*, *MMP-12* y *SMURF2*.

Seguidamente, determinamos los niveles de proteína en lisados de células tratadas y control mediante *Western blots*. Los resultados se expresaron también como cambios de expresión relativa (T/C) (**Figura 6.1b**) y corroboraron repetidamente que los niveles de proteína de PAI-1 y SMURF2 se reducían después del tratamiento ($0,6 \pm 0,2$; n = 5 y $0,7 \pm 0,1$; n = 3, respectivamente), aunque los resultados no alcanzaron valores significativos. Los niveles de MMP-12 también se indujeron ($1,3 \pm 0,1$; n = 7) tras 24 h de tratamiento con el extracto de naranja digerido. No se encontraron cambios en los niveles de proteína para TGFβR2 y SMAD3 (**Figura 6.1b**).

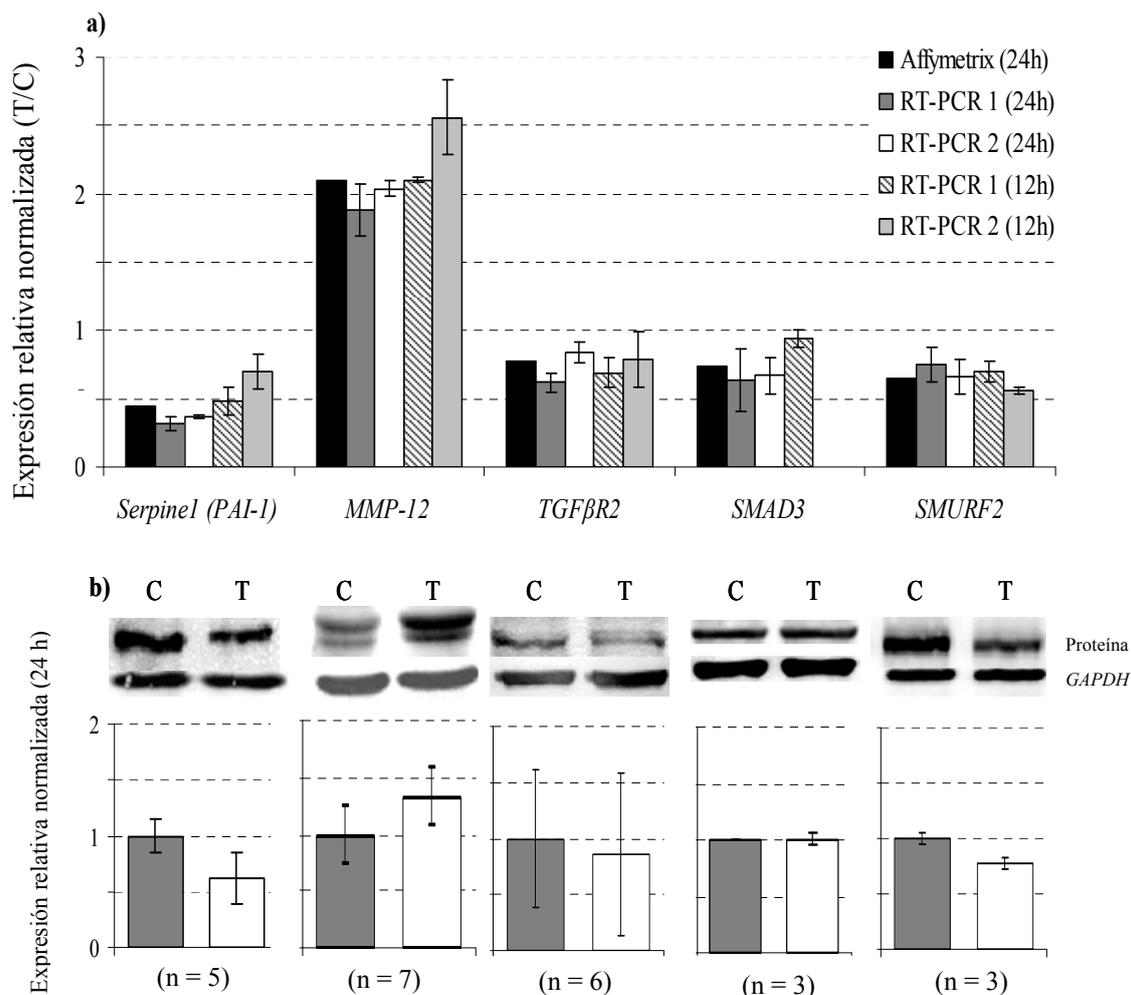


FIGURA 6.1. Efecto del extracto de naranja rico en flavanonas digerido sobre la expresión de genes en los miofibroblastos de colon tras 12 y 24 h de tratamiento. Los datos se normalizan con GAPDH. (a) Expresión relativa de genes (T/C) determinado mediante *microarrays* de Affymetrix y RT-PCR (n = 3); (b) expresión de los niveles de proteína determinada en los lisados de células control y tratadas mediante *Western blots* (n = 3 – 7). Los resultados se expresan como media aritmética ± DE.

3.4. – Determinación de si los efectos sobre la expresión génica causados por el extracto de naranja son debidos a las principales flavanonas presentes en el extracto.

En primer lugar y para determinar que los efectos causados por el extracto de naranja digerido pudieran ser consecuencia de moléculas y/o compuestos generados durante el proceso de digestión *in vitro*, se determinó si los cambios observados en *PAI-1*, *MMP-12* y *SMURF2* aún tenían lugar cuando las células se exponían al extracto de

naranja sin digerir (a concentraciones de flavanonas equivalentes a las usadas con el extracto digerido) (**Figura 6.2**).

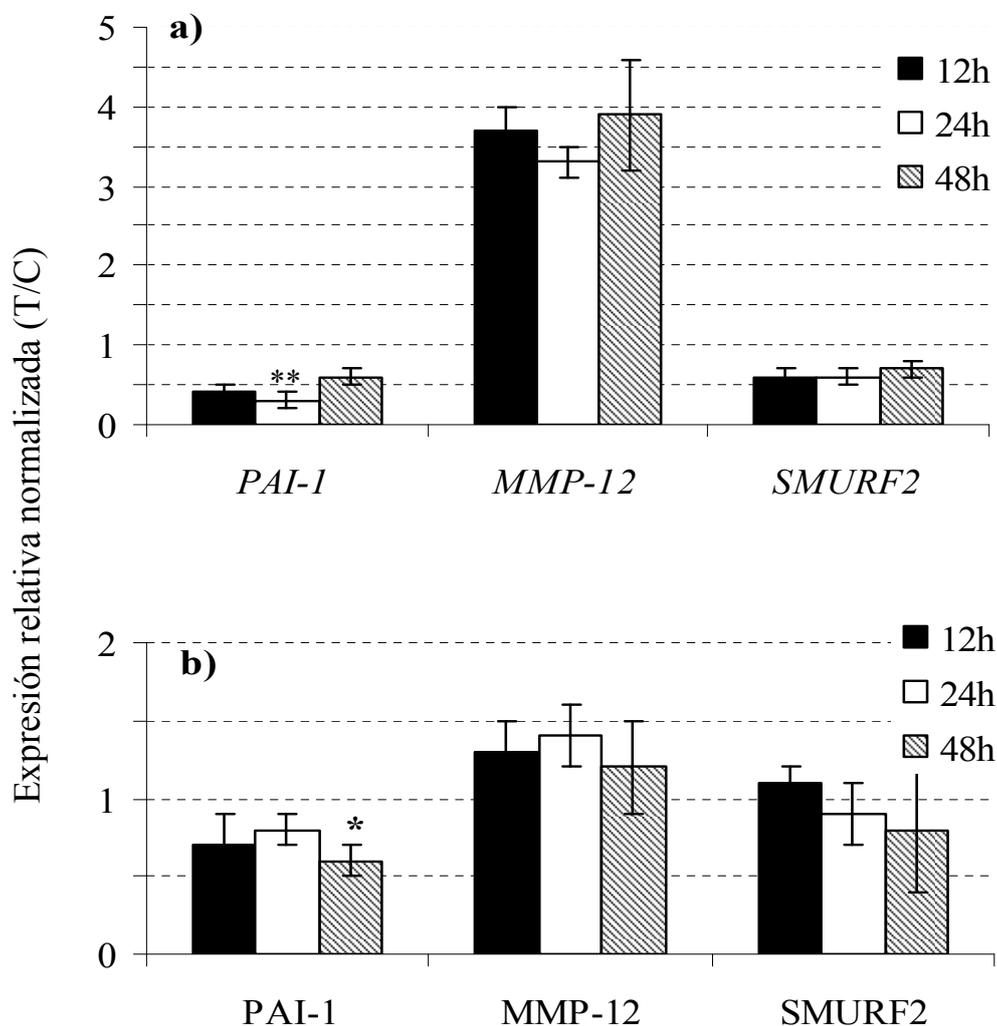


FIGURA 6.2. Efecto del extracto de naranja rico en flavanonas no digerido (concentración final de flavanonas 60 μ M) sobre la expresión de genes *PAI-1*, *MMP12* y *SMURF2* (T/C) en los miofibroblastos de colon CCD18-Co. Los datos se normalizan con GAPDH. (a) Expresión relativa de genes determinada mediante RT-PCR; (b) expresión relativa de los niveles de proteína, determinada en los lisados de células control y tratadas utilizando *Western blots*. Los resultados se expresan como media aritmética \pm DE (n = 3 experimentos independientes); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Al igual que el extracto digerido, el extracto sin digerir reducía la expresión del gen *PAI-1* $0,4 \pm 0,1$; $0,3 \pm 0,1$ y $0,6 \pm 0,1$ (n = 3) tras 12 h, 24 h y 48 h de tratamiento, respectivamente. Esta reducción se produjo también a nivel de proteína, alcanzando valores significativos a las 48 h ($0,5 \pm 0,1$; n = 3, $p < 0,05$). *MMP-12* se indujo a nivel de

ARNm ($3,7 \pm 0,3$; $3,3 \pm 0,2$; $3,9 \pm 0,7$) y a nivel de proteína ($1,3 \pm 0,2$; $1,4 \pm 0,2$; $1,2 \pm 0,3$) tras 12, 24 y 48 h de tratamiento, respectivamente. Por otra parte, se redujo la expresión de *SMURF2* a nivel de ARNm pero no se observaron cambios a nivel de proteína.

Una vez confirmado que algún o algunos de los componentes presentes en el extracto deben ser los responsables de los efectos observados sobre *PAI-1*, *MMP-12* y *SMURF2*, a continuación intentamos determinar si eran precisamente las flavanonas mayoritarias del extracto de naranja las responsables de dichos efectos. Para ello, tratamos a los miofibroblastos de colon con la mezcla de las 6 flavanonas mayoritarias presentes en el extracto (disueltas en DMSO) a las concentraciones individuales en las que se encuentran en el extracto. La mezcla inducía la transcripción de *MMP-12* de 2 a 3 veces sobre las células control pero no se pudieron reproducir el resto de los cambios. Estos resultados indican que las flavanonas del extracto contribuyen a algunos de los cambios observados pero no son las responsables únicas y que otros componentes del extracto o la combinación de todos ellos tienen efectos reguladores sobre la respuesta de los miofibroblastos.

3.5. – Cambios inducidos por el extracto de naranja en *PAI-1*, *MMP-12* y *SMURF2* en los miofibroblastos de colon humano estimulados con $\text{TNF-}\alpha$.

Para determinar si los efectos del extracto de naranja tenían lugar en células inflamadas, en un segundo grupo de experimentos, los miofibroblastos de colon se trataron con la citoquina pro-inflamatoria $\text{TNF-}\alpha$ (20 ng/mL, 8 h) y con el extracto de naranja durante 24 h y se determinaron los niveles de expresión de *PAI-1*, *MMP-12* y *SMURF2* (**Figura 6.3**).

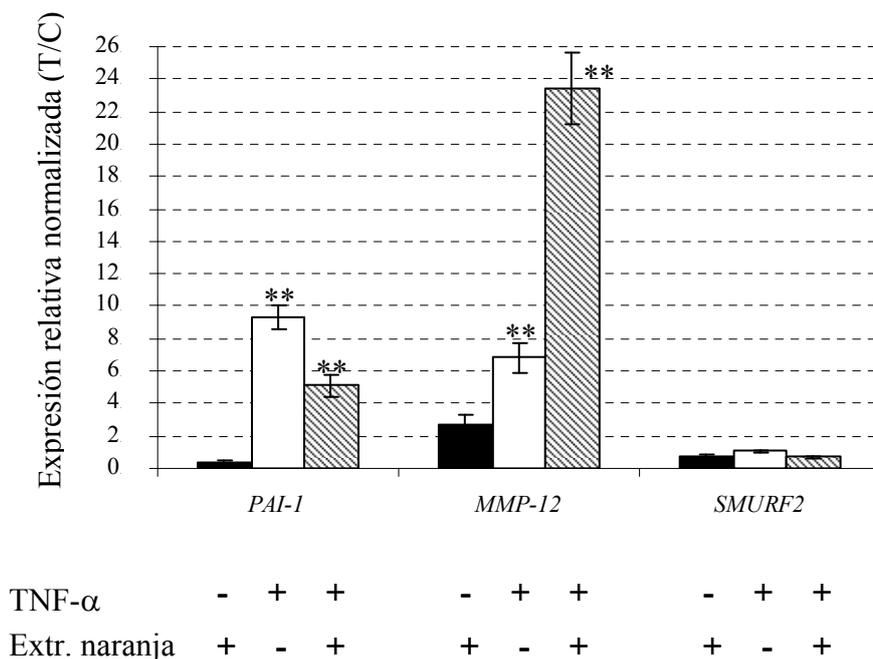


FIGURA 6.3. Efecto del extracto de naranja rico en flavanonas (concentración de flavanonas 60 μM) sobre los miofibroblastos de colon: i) medio de cultivo 0,1% SBF + extracto de naranja después de 32 h sin suero; ii) medio de cultivo 0,1% SBF + TNF- α (20 ng/mL) después de 24 h sin suero; iii) medio de cultivo 0,1% SBF + TNF- α (20 ng/mL) después de 24 h sin suero + extracto de naranja 8 h después de la adición de TNF- α . Los análisis de los genes *PAI-1*, *MMP12* y *SMURF2* se realizaron tras un total de 56 h de incubación. Los resultados se expresan como media aritmética \pm DE ($n = 3$ experimentos independientes), $**p < 0,01$. + Indica presencia; - indica ausencia.

El tratamiento con la citoquina pro-inflamatoria indujo los niveles de *PAI-1* (T/C, $9,3 \pm 0,8$, $n = 3$; $p < 0,01$) y el extracto de naranja disminuyó la expresión de este gen ($5,1 \pm 0,7$; $p < 0,01$). En el caso de *MMP-12*, se incrementó la expresión del gen tanto al tratar primero con TNF- α y después con el extracto ($23,4 \pm 2,2$; $p < 0,01$). Finalmente, en el caso de *SMURF2*, la citoquina no tuvo efectos ($1,1 \pm 0,1$) mientras que en los miofibroblastos inflamados se reprimió la expresión ($0,7 \pm 0,1$ por el extracto de naranja).

3.6. – Efectos fenotípicos inducidos en los miofibroblastos de colon humano inducidos por el extracto de naranja.

Para determinar si los cambios observados en la expresión de los genes se asociaban con un efecto en algunas de las funciones celulares y moleculares detectadas por el programa IPA (como la migración y quimioatracción de células inmunes) se evaluó la respuesta fenotípica de los miofibroblastos de colon al tratamiento con el extracto de naranja. La migración de los miofibroblastos es un factor importante en el proceso de reparación de tejidos, y por lo tanto se investigó si el extracto de naranja afectaba a la migración de las células CCD-18Co (**Figura 6.4**). La fotografía presentada en la **Figura 6.4A** corresponde con células control en medio rico (10% SBF) a tiempo 0 (momento en el que se induce la herida o raspadura de células de la superficie de la placa de cultivo). A las 56 h, estas células han migrado y han cubierto la zona dañada por completo (control positivo) (**Figura 6.4B**). En medio de cultivo con reducción del aporte de suero (0,1% de SBF; **Figura 6.4C**), las células migran algo más despacio y cubren solo parcialmente el área dañada. En estas condiciones (0,1% SBF), la exposición de los miofibroblastos de colon a TNF- α (20 ng/mL) (**Figura 6.4D**) o al extracto de naranja (**Figura 6.4E**), inhibió moderadamente la migración celular en comparación a las células control correspondientes (**Figura 6.4C**) mientras que el tratamiento con TNF- α seguido del extracto de naranja incrementó levemente la migración celular (**Figura 6.4F**).

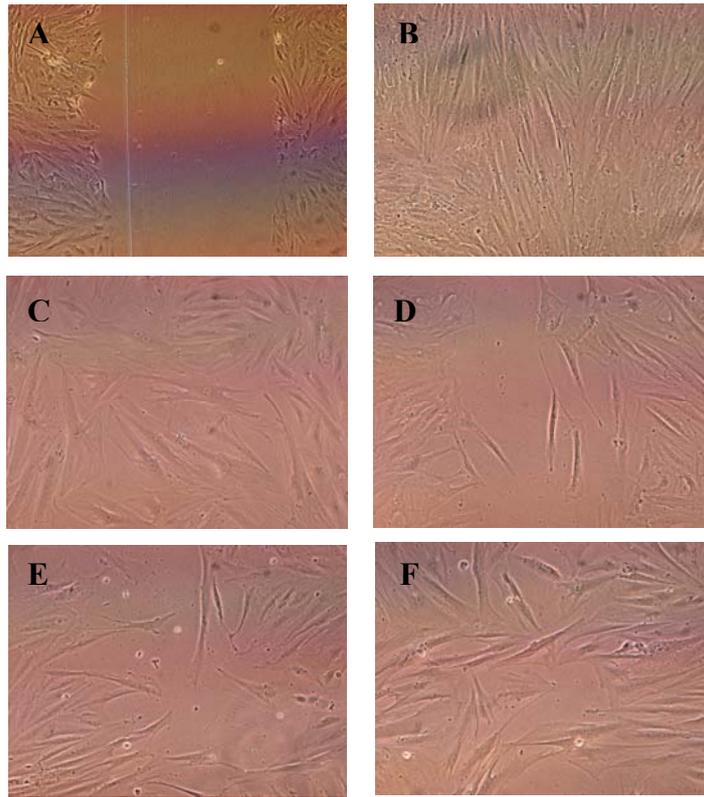
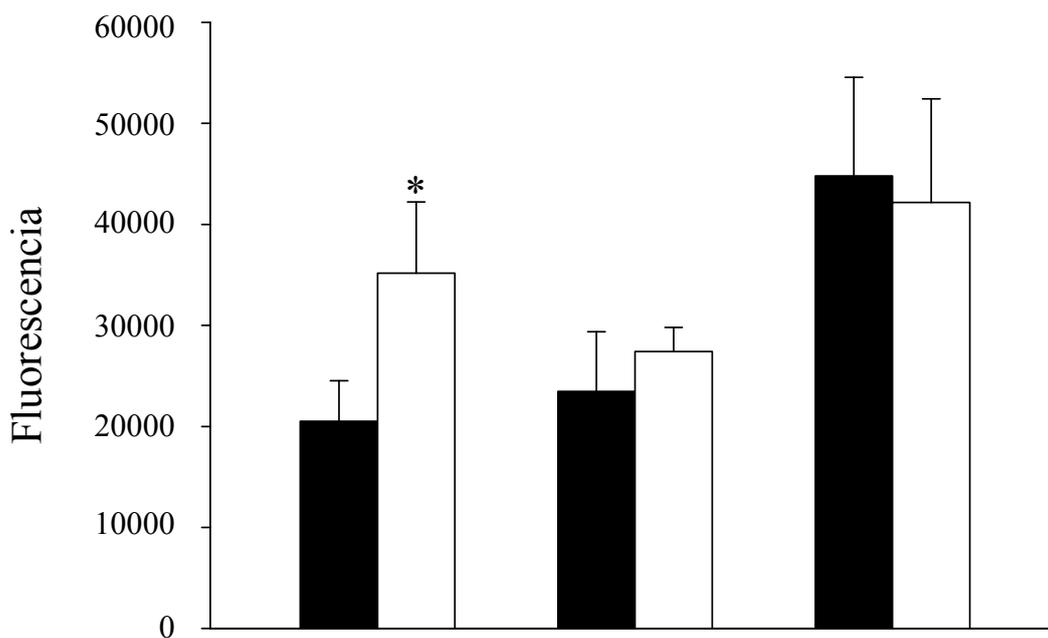


FIGURA 6.4. Efectos de $\text{TNF-}\alpha$ y/o del extracto de naranja (concentración de flavanonas $60 \mu\text{M}$) sobre la migración de los miofibroblastos de colon. El ensayo se inicia con el raspado de la monocapa celular a tiempo 0 (A). Las células se cultivan a continuación en las siguientes condiciones: (B) medio de cultivo rico en nutrientes (10% SBF); (C) medio de cultivo con 0,1% SBF; (D) medio de cultivo 0,1% SBF + $\text{TNF-}\alpha$ (20 ng/mL) añadido después de 24 h con 0,1% SBF; (E) medio de cultivo 0,1% SBF + extracto de naranja añadido 32 h después de 24 h con 0,1% SBF; (F) medio de cultivo 0,1% SBF + $\text{TNF-}\alpha$ (20 ng/mL) añadido después de 24 h con 0,1% suero + extracto de naranja añadido 8 h después de adicionar el $\text{TNF-}\alpha$. Todas las imágenes de las células control y tratadas se tomaron después de 56 h de incubación. El ensayo se repitió un mínimo de 2 veces ($n = 2 - 3$; 2 pocillos por ensayo).

También determinamos los efectos de estos tratamientos sobre la adhesión de monocitos sobre los miofibroblastos (quimiotaxis) (**Figura 6.5**).



TNF- α	-	-	-	-	+	+
Extracto de naranja	-	+	-	+	-	+
SBF 10%	+	+	-	-	-	-
SBF 0,1%	-	-	+	+	+	+

FIGURA 6.5. Efecto del extracto de naranja (concentración de flavanonas 60 μ M) sobre la adhesión de monocitos THP-1 a los miofibroblastos de colon CCD18-Co. Los datos se expresan como media \pm DE (n = 3 experimentos independientes), ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo control. + Indica presencia; - indica ausencia.

Se observó un incremento significativo en la adhesión de los monocitos a los miofibroblastos cuando las células se trataron con el extracto de naranja en ausencia de TNF- α (10% SBF). Este efecto no se observó en las células mantenidas en medio con 0,1% de SBF. En presencia de la citoquina (20 μ g/mL, 8 h) se indujo sustancialmente la adhesión de los monocitos a los miofibroblastos, pero el extracto de naranja, sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre la adhesión de los monocitos

4. - DISCUSIÓN

El consumo de flavonoides o extractos ricos en flavonoides como método preventivo o terapéutico frente a diversas enfermedades es un tema que genera una gran controversia. Entre otros aspectos, la baja biodisponibilidad y la posible pérdida de funcionalidad de los flavonoides durante el proceso de digestión y metabolismo son dos puntos críticos frente a la eficacia de la suplementación dietética con estos compuestos. Al igual que otros flavonoides, la eficiencia de absorción de las flavanonas es bastante reducida lo que indica que un alto porcentaje de la cantidad ingerida de estos compuestos puede alcanzar el colon en su forma molecular original (Espín *et al.*, **2007a**). En el colon, los glucósidos (naringina, hesperidina y neohesperidina) pueden sufrir deglicosilación dando lugar a las agliconas (naringenina y hesperetina) que a su vez pueden transformarse en compuestos fenólicos más simples por acción de la microbiota intestinal. A pesar del metabolismo microbiano, una proporción de glicósidos y agliconas pueden permanecer intactos en el lumen durante horas (Rechner, *et al.*, **2004**; Mullen, *et al.*, **2008**). En este capítulo hemos confirmado que la mayoría de las flavanonas presentes en el extracto de naranja, aparecen intactas tanto en el intestino delgado como en el colon de ratas incluso 12 y 24 h después de la administración oral del extracto. Estos resultados sugieren que una proporción de las flavanonas de la dieta podrían permanecer inalteradas durante varias horas en el colon humano y absorberse o interaccionar con la mucosa y sus elementos celulares. A este nivel sería posible que pudiesen alterar entonces la expresión de genes y/o proteínas que tendría como consecuencia la modificación o regulación de funciones celulares que repercutiesen en la salud intestinal. En este capítulo estudiamos los efectos de un extracto de naranja rico en flavanonas sobre un modelo de miofibroblastos de colon humano (CCD-18Co) analizando, en primer lugar, cambios en el perfil transcriptómico de las células tratadas

con el extracto en condiciones parcialmente representativas de las que pueden ocurrir en el intestino *in vivo*. Tratamos los miofibroblastos de colon durante 12 y 24 h con el extracto de naranja rico en flavanonas previamente sometido a una digestión gastro-duodenal *in vitro* ya una dosis equivalente a 60 μM de flavanonas totales que, además de no ser tóxica para las células, es alcanzable en el intestino a través de la dieta. Se ha descrito que las concentraciones de flavanonas que se pueden alcanzar en el colon varían desde 100 μM hasta 3 mM (Kahle, *et al.*, 2006; Scalbert y Williamson, 2000). Además, en este capítulo también vimos que en ratas a las que se les había suministrado una dosis oral de 63,15 mg de flavanonas (dosis equivalente en humanos: ~ 3 g/70 kg peso) medimos concentraciones totales de flavanonas de ~ 345 μM en el intestino, lo que sugiere que la concentración utilizada para tratar las células no es excesiva.

Los miofibroblastos de colon CCD18-Co fueron seleccionados para este estudio, primero, por ser una línea celular no cancerosa (nuestro objetivo no era ver efectos anti-cancerígenos) y segundo, y más importante, porque estas células juegan un papel importante en el mantenimiento y respuesta inmunológica de la mucosa intestinal. Aunque los miofibroblastos de colon se localizan por debajo del epitelio intestinal y, en principio, no parecen entrar en contacto directo con la digesta luminal, un posible aumento de la permeabilidad de las *tight junction* (*zonula occludens* o uniones estrechas; como el que puede ocurrir en casos de inflamación) puede hacer posible que muchos nutrientes y pequeñas moléculas (4.000-5.500 Da) pasen a través de la capa epitelial y entren en contacto con las células que se encuentran debajo del epitelio (Snoeck *et al.*, 2005). Los miofibroblastos de colon están implicados en el proceso de reparación de tejidos y en la restitución del epitelio intestinal, controlando la remodelación de la MEC y la migración de miofibroblastos activados hacia la zona afectada. Los miofibroblastos activados se caracterizan por aumentar la expresión y

secreción de componentes de la MEC (colágeno IV, laminina y/o MMPs). Además, se piensa que los miofibroblastos de colon actúan como intermediarios entre el epitelio intestinal y el sistema inmune ya que tienen un papel activo tanto en la respuesta inmune fisiológica como durante las situaciones de inflamación patológica. Los miofibroblastos activados producen numerosos mediadores de la inflamación como diversos factores de crecimiento, moléculas de adhesión, factores quimiotácticos, citoquinas y prostaglandinas. Estas moléculas tienen un papel muy importante en el balance entre la inflamación fisiológica/fisiopatológica, de manera que coordinan múltiples tipos de células durante el proceso de reparación de tejidos y la reparación y mantenimiento de la barrera epitelial (Andoh *et al.*, 2007; Powel *et al.*, 2005). En las condiciones experimentales de este estudio, los miofibroblastos de colon tratados mostraron cambios moderados en la expresión de grupos de genes asociados a la reparación de los tejidos y la inflamación. Las células respondieron al tratamiento modulando los niveles de expresión de múltiples componentes de la MEC aumentando la expresión de colágeno tipo IV, laminina y MMP12, y aumentando o disminuyendo la expresión de varios inhibidores de proteasas (serpinas). Además, la respuesta celular implicó cambios transcripcionales en varias interleuquinas, factores de crecimiento, factores quimiotácticos y prostaglandinas.

Entre los genes que más se modificaron tras el tratamiento, encontramos que el gen *PAI-1* disminuía su expresión mientras que la de *MMP-12* aumentaba (tanto a nivel de proteína como de ARNm). El PAI-1, inhibidor de serín proteasas, es un inhibidor del regulador que convierte el plasminógeno en plasmina (proteína fibrinolítica) (Nicholl *et al.*, 2006), mientras que la metaloproteínasa de matriz-12, MMP-12, (elastasa de macrófago) tiene la capacidad de degradar una gran cantidad de componentes de la MEC (elastina, colágeno tipo IV, laminina, etc.) (Pender *et al.*, 2006). Niveles bajos de

PAI-1 y altos de MMP-12 contribuyen a la degradación de la MEC y favorecen la separación y migración celular (Renckens, *et al.*, 2005; Friedl y Bröcker, 2000). Tanto el PAI-1 como la MMP-12 se han asociado con reacciones inflamatorias en la mucosa intestinal (Cale y Lawrence, 2007; Nénan *et al.*, 2005), y citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α que induce la expresión del PAI-1 (Macfelda *et al.*, 2002) y MMP-12 (Barrientos *et al.*, 2008) también reduce la migración de los miofibroblastos (Witkowski *et al.*, 1997). En nuestro estudio, el TNF- α indujo la expresión del PAI-1 y de la MMP-12 en los miofibroblastos de colon CCD-18Co lo que se acompañó de una reducción en la migración celular en comparación con las células control (no tratadas). Sin embargo, las células sometidas a co-tratamiento con TNF- α y el extracto de naranja mostraron una disminución en la expresión del PAI-1 y un aumento en el caso de la MMP-12, lo que se correlaciona con el aumento en la migración respecto de las células que solo se trataron con la citoquina pro-inflamatoria. Estos resultados indican que, en presencia del TNF- α , los cambios observados en la migración se pueden asociar a cambios en los niveles de expresión del PAI-1, mientras que la MMP-12 parece no tener un efecto directo. Existen pocos estudios que relacionan la MMP-12 con la migración, y éstos parecen indicar que su posible efecto depende del tipo celular con el que se trabaje. Así, mientras que los fibroblastos de pulmón aumentaron la migración por la adición de elastasas que incrementaron la digestión de la MEC (Chetty *et al.*, 1995), la MMP-12 no parece tener efecto sobre la migración de células de músculo liso (Ugwu *et al.*, 2001). Por otro lado, cuando los miofibroblastos de colon se trataron con el extracto de naranja, en ausencia de TNF- α , disminuyó la migración y los niveles del PAI-1 respecto del control. Estos resultados coinciden con propiedades descritas del PAI-1 en las que tanto el aumento como la disminución de su expresión se asocian con la inhibición de la migración. La respuesta puede estar asociada con el estatus celular (inflamado frente a

no-estimulado). Además, hay estudios que indican que se requiere de concentraciones precisas de PAI-1 para que tenga lugar una migración óptima (Buchwalter *et al.*, **2005**). Respecto a la adhesión de monocitos, el extracto de naranja indujo la adhesión de los monocitos THP-1 a los miofibroblastos de colon CCD18-Co, en la ausencia de la citoquina, aunque no tuvo efecto alguno sobre las células tratadas con TNF- α , es decir no fue capaz de contrarrestar el aumento de adhesión de monocitos inducido por el TNF- α . Esta respuesta podría estar relacionada con la inducción de la MMP-12, que parece promover la quimioatracción de neutrófilos en relación con un incremento transitorio en los niveles de citoquinas y factores quimiotácticos (Cale y Lawrence, **2007**). En general, estos resultados muestran una activación moderada de los miofibroblastos de colon y de una respuesta de tipo inflamatorio tras la exposición al extracto de naranja amarga.

Este estudio ha investigado los efectos de un extracto natural complejo ya que es importante estudiar los efectos en el intestino de mezclas de flavonoides, o de mezclas de flavonoides con otros compuestos, porque son estas mezclas complejas, más que los compuestos individuales, lo que habitualmente encontraremos en el lumen intestinal tras la ingesta de la dieta. Nuestro estudio indica que las flavanonas mayoritarias presentes en el extracto de naranja, no son las responsables de la reducción de la expresión del PAI-1 en las células de colon, aunque contribuyen a un aumento en la expresión de la metaloproteinasa MMP-12. Varios estudios han descrito que flavanonas como la hesperidina o la naringenina, modulan la expresión de genes con efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos. Por ejemplo, en un estudio de Nizamutdinova *et al.* (**2008**) la hesperidina inhibió la expresión de VCAM-1 inducida por TNF- α en células endoteliales. La naringenina redujo la expresión de genes pro-fibróticos inducida por TGF- β 1, incluyendo PAI-1, en células estrelladas de hígado de rata (Liu *et al.*, **2006**).

En nuestro estudio, el tratamiento de los miofibroblastos de colon CCD-18Co con la mezcla de flavanonas presentes en el extracto de naranja no indujo cambios en la expresión de PAI-1, a pesar de contener naringenina. Las diferencias en estos resultados pueden deberse a varias razones tales como i) diferencias entre los modelos celulares usados y/o ii) la concentración de naringenina usada. Nuestro trabajo también apunta a las posibles diferencias que puede haber en los efectos de un determinado compuesto cuando está solo a cuando actúa en combinación con otros muchos compuestos y moléculas, como es lo habitual en el caso de la dieta, y señala que es muy importante pues establecer los efectos de los compuestos en el contexto de la dieta. En el caso concreto de nuestro extracto de naranja, es posible que haya otros componentes típicos de cítricos con propiedades anti-inflamatorias como, por ejemplo, las flavonas polimetoxiladas (Manthey y Bendele, **2008**) que pueden contribuir a los efectos observados.

En general, se considera que los compuestos bioactivos derivados de plantas y/o los extractos naturales ricos en estos compuestos pueden tener efectos preventivos frente al desarrollo de enfermedades. Sin embargo, una buena parte de los estudios publicados que investigan, por ejemplo, los efectos anti-inflamatorios de estos compuestos o extractos se basan en modelos diversos de inflamación tanto *in vitro* como *in vivo* (modelos patológicos). Los efectos observados en tejidos sanos no inflamados pueden ser muy diferentes a los que se observan en condiciones patológicas. Precisamente, una de las funciones básicas de los miofibroblastos de colon es la de contribuir al mantenimiento de la homeostasis de la mucosa en respuesta a los múltiples mediadores inflamatorios exógenos (toxinas, bacterias, etc) que recibe el organismo diariamente evitando así la propagación de la respuesta inflamatoria y el desarrollo de enfermedades relacionadas. El proceso inflamatorio está regulado por numerosos

mediadores que dirigen la reparación y el restablecimiento de las funciones de la barrera intestinal (Andoh *et al.*, 2007). Nuestros resultados indican que el extracto de naranja rico en flavanonas usado en este estudio tiene un efecto regulador moderado sobre la activación de los miofibroblastos de colon, lo que sugiere que podría ejercer efectos beneficiosos sobre células normales sanas *in vivo* y contribuir a la prevención de la inflamación. El extracto de naranja afectó de forma moderada a la capacidad de los miofibroblastos para adherir monocitos así como a su capacidad para migrar, con diferencias en la respuesta migratoria de estos últimos en función de que se encontrasen inflamados con TNF- α o no, lo que sugiere que el extracto podría ejercer distintos efectos en función del estado de las células (fisiológico o fisiopatológico). En líneas más generales, los resultados de este trabajo muestran la complejidad de los estudios de las propiedades bioactivas de los compuestos y extractos naturales y la dificultad de establecer diseños experimentales apropiados para intentar reproducir condiciones similares a las que pueden darse en el organismo vivo. Es importante señalar las diferencias que puede haber en los resultados según se ensayen compuestos individuales o mezclas y según se empleen modelos de células sanas o de células activadas o tratadas para simular un proceso patológico como es el de la inflamación. En resumen, puede decirse que la identificación de las propiedades beneficiosas de los compuestos de la dieta a nivel celular y molecular es muy compleja y precisa de múltiples investigaciones basadas en diversos modelos celulares que deben intentar reproducir en lo posible la situación en el organismo.

CAPÍTULO 7

**Urolitinas, principales metabolitos microbianos
derivados de elagitaninos, como posibles
inhibidores de la actividad *Quorum Sensing* del
patógeno intestinal *Yersinia enterocolitica*: efectos
fenotípicos y moleculares.**

JA. Giménez-Bastida *et al.*, “Urolithins, ellagitannins metabolites produced by colon microbiota, inhibit *Quorum sensing* in *Yersinia enterocolitica*: Phenotypic response and associated molecular changes”, *Food Chem.*, 2012, 132,1465-1474

Urolitinas, principales metabolitos microbianos derivados de elagitaninos, como posibles inhibidores de la actividad *Quorum Sensing* del patógeno intestinal *Yersinia enterocolitica*: efectos fenotípicos y moleculares.

RESUMEN

Quorum Sensing (QS) es un mecanismo de comunicación bacteriana que regula procesos infecciosos como la virulencia, formación de biopelículas y motilidad bacteriana. El sistema QS en *Yersinia enterocolitica*, bacteria enteropatógena de mamíferos, está regulado por unas moléculas llamadas *N*-acilhomoserín-lactonas (AHLs) que están directamente implicadas en los procesos infecciosos regulados por QS. Entre otros productos de la dieta, algunos frutos ricos en elagitaninos (ETs) exhiben cierta actividad anti-QS. Sin embargo, en el organismo, estos ETs son metabolizados por la microbiota intestinal a urolitina-A (Uro-A) y urolitina-B (Uro-B) pero no se conoce si estas moléculas que se forman y permanecen en el intestino tienen o no propiedades moduladoras de la actividad QS de patógenos intestinales. Los resultados presentados en este capítulo demuestran que las urolitinas, a concentraciones que se pueden alcanzar en el intestino a través de la dieta: i) reducen los niveles de las dos principales AHLs producidas por *Y. enterocolitica*, *N*-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL) y *N*-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C6-HSL), e ii) inhiben el desarrollo de biopelículas y la motilidad por natación (*swimming*) asociadas a QS. Tras examinar los cambios producidos en la expresión de algunos genes clave en la síntesis de AHLs (*yenI* y *yenR*) o relacionados con la motilidad (*flhDC*, *fliA*, *fleB*), no encontramos que se hubiese producido una represión de la expresión de estos genes que

podiese explicar la inhibición observada. Nuestros resultados sugieren que las urolitinas podrían ejercer efectos antipatogénicos en el intestino frente a *Y. enterocolitica* mediante la regulación de mecanismos de *QS*. Estos procesos son, sin embargo, muy complejos y requieren una investigación más a fondo de las propiedades antipatogénicas *in vivo* de metabolitos derivados de plantas como es el caso de las urolitinas.

1. – INTRODUCCIÓN

Se denomina *QS* a un proceso de comunicación bacteriana que se basa en la producción y respuesta a pequeñas moléculas llamadas autoinductores que se acumulan durante el crecimiento bacteriano y al alcanzar una concentración crítica se unen a receptores que regulan la expresión de genes y controlan procesos como la virulencia, formación de biopelículas y motilidad (Antunes *et al.*, 2010). Bacterias patógenas Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* o bacterias del género *Yersinia*, producen unos autoinductores conocidos como AHLs (Hardman *et al.*, 1998).

Y. enterocolitica es un microorganismo enteropatógeno de humanos y roedores que provoca infecciones gastrointestinales tras el consumo de alimentos contaminados (Hoffmann *et al.*, 2004). Entre las AHLs que esta bacteria sintetiza, se han identificado dos principales, C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL, y otras 3 de cadena más larga (Atkinson *et al.*, 2006a; Atkinson *et al.*, 2006b; Troup *et al.*, 1995). A nivel molecular, el proceso de *QS* regulado por AHLs requiere: i) de una sintasa que produzca las AHLs, y ii) de un sistema de transducción de la señal que responde a estas moléculas y que implica a una proteína reguladora o sensor (Atkinson *et al.*, 2006a). En *Y. enterocolitica* se han identificado: i) un gen que codifica la sintasa de las AHLs, *yenI*, con una elevada homología con la familia de proteínas LuxI y ii) el gen *yenR* con elevada analogía con los activadores transcripcionales de la familia LuxR. En un estudio llevado a cabo por

Troup *et al.* (1995) se observó que la inserción de una mutación en el gen *yenI* provocaba una inhibición de la síntesis de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL, lo que indicaba que la función principal de este gen era la síntesis de estas AHLs. Por otra parte, se conocen también tres clases principales de genes flagelares (implicados en la formación de flagelos) organizados en sistema de cascada jerárquica y que controlan los sistemas de motilidad como la natación o ‘swimming’ en *Y. enterocolitica* frente a diversos factores ambientales. Entre ellos, el operón *flhDC* (clase I) se encuentra, jerárquicamente, en la parte más alta del sistema regulador controlando la expresión de los genes de clase II, entre los que se encuentran los que codifican proteínas estructurales y de ensamblaje como el gen *fliA* que codifica el factor sigma específico flagelar σ^{28} . Los genes de clase III se transcriben a partir de promotores dependientes de *fliA* y codifican un grupo de genes de flagelina dispuestos en tándem como *fleA*, *fleB* y *fleC* (Atkinson *et al.*, 2006a; Atkinson *et al.*, 2008).

El sistema inmune innato de eucariotas tiene como una de sus principales funciones la de responder al ataque de microorganismos patógenos. Dado que los mecanismos de QS están implicados en la invasión bacteriana y que parecen jugar algún papel en el establecimiento de infecciones crónicas, se ha desarrollado un gran interés y un incremento importante en el número de estudios que investigan las posibles interacciones entre las moléculas inductoras de QS, AHLs, y las células eucariotas. Estudios previos sugieren que algunas AHLs de cadena más larga (11-13 carbonos) y con grupos 3-oxo o 3-OH pueden llegar a suprimir la actividad inmune (Chhabra *et al.*, 2003). Sin embargo, en general, no se conocen aún los efectos de la combinación de las distintas AHLs producidas por bacterias patógenas sobre las células eucariotas. La inhibición del QS se ha convertido recientemente en un objetivo clave en la lucha contra la virulencia bacteriana (Roy *et al.*, 2011).

Se ha descrito que algunos fitoquímicos presentes en plantas y extractos naturales derivados de frutos inhiben procesos relacionados con el QS en patógenos de humanos (Adonizio *et al.*, 2008; Taganna *et al.*, 2011; Vатtem *et al.*, 2007; Vikram *et al.*, 2010a; Vikram *et al.*, 2010b). La actividad anti-QS de los productos vegetales podría ser de interés terapéutico. De confirmarse estos efectos *in vivo*, el consumo regular de estos productos o compuestos podría reducir o prevenir la invasión del intestino por patógenos. Entre los productos vegetales estudiados, algunos derivados de granada y de varios tipos de bayas inhiben la síntesis y actividad de diversas AHLs así como la motilidad en enjambre (*swarming*) en *E. coli* y *P. aeruginosa*, sugiriendo que algunos de sus constituyentes tienen actividad anti-QS (O'May y Tufenkji, 2011; Vатtem *et al.*, 2007). La granada y las bayas son ricos en ETs como la punicalagina (granada) y el ácido elágico (EA) y alcanzan concentraciones que pueden llegar a los 300 mg/100 g producto (Larrosa *et al.*, 2010a). Los ETs se hidrolizan en el intestino dando lugar a EA que a su vez se metaboliza por acción de la microbiota colónica dando lugar a Uro-A y Uro-B. Las urolitinas pueden acumularse en el intestino alcanzando concentraciones en el rango μM (Cerdá *et al.*, 2005a; Espín *et al.*, 2007a; González-Sarrías *et al.*, 2009b). Estudios previos han demostrado que la Uro-A es capaz de modular el crecimiento de bacterias en el intestino de ratas tanto antes como después de un proceso inflamatorio inducido (Larrosa *et al.*, 2010b).

Objetivos. Para entender cómo determinados productos naturales de origen vegetal o algunos de sus constituyentes pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud intestinal, y en particular, efectos protectores frente a la colonización del intestino por bacterias patógenas, es esencial conocer si los metabolitos derivados que realmente se forman y acumulan en el intestino *in vivo* tienen efectos antipatogénicos o anti-QS. En este capítulo se investigaron los efectos de Uro-A y Uro-B, principales metabolitos

microbianos derivados de ETs, sobre la señalización mediada por QS en *Y. enterocolitica*. Para ello investigamos la capacidad de estos metabolitos para: i) inhibir o reducir la producción de las dos principales AHLs producidas por este patógeno, ii) inhibir la motilidad y la formación de biopelículas por este microorganismo. Para determinar algunos de los mecanismos moleculares que subyacen al posible efecto anti-QS de estas moléculas frente a *Y. enterocolitica*, analizamos los cambios en los niveles de expresión de un grupo de genes clave implicados en la síntesis de AHLs y con la motilidad. Adicionalmente y para intentar elucidar algunos posible mecanismos de interacción entre las AHLs producidas por el patógeno y las células del sistema inmune, decidimos investigar los efectos de una mezcla de las dos principales AHLs producidas por *Y. enterocolitica* sobre la producción de la citoquina anti-inflamatoria, TNF- α , en macrófagos activados con LPS (lipolisacárido presente en la membrana de bacterias Gram negativas).

2. – MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. – Materiales.

En este estudio se utilizaron los metabolitos Uro-A y Uro-B y las lactonas C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL descritas en el capítulo 3, **apartado 3.1**. Los reactivos de uso general están descritos en el **apartado 3.1** del capítulo general de Materiales y Métodos. Los metabolitos se disolvieron en DMSO (solución stock = 1,8 mg/mL) y las AHLs se prepararon en agua a una concentración de 20 mM.

2.2. – Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y crecimiento.

Para el desarrollo de los trabajos relacionados con las propiedades anti-QS se utilizaron esencialmente dos líneas de células procariotas: *Yersinia enterocolitica* y

Chromobacterium violaceum. Ambas líneas están descritas en el **apartado 3.2.5** del capítulo de Materiales y Métodos. Las condiciones de cultivo y el análisis del crecimiento bacteriano están descritos en capítulo 3 (**apartados 3.2.5.1, 3.2.5.2 y 3.2.5.4**).

2.3. – Ensayo con *Chromobacterium violaceum*.

Como ensayo preliminar rápido para determinar la actividad anti-*QS* de las urolitinas, se estudió su capacidad para reducir la producción de violaceína en *C. violaceum* (Truchado *et al.*, 2009b) (capítulo 3, **apartado 3.2.5.5**). Las concentraciones finales en el medio de cultivo de Uro-A y Uro-B utilizadas fueron aproximadamente 4, 6 y 8 μM . Los resultados se presentan como la media aritmética \pm desviación estándar (DE) de un $n = 3$ (2 réplicas por ensayo).

2.4. – Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano

La actividad antimicrobiana de Uro-A y Uro-B (a la concentración de 4 μM) se determinó mediante contaje en placa de agar como se describe en el capítulo 3 (**apartado 3.2.5.3**). Los recuentos microbianos se expresaron como \log_{10} UFC/mL. Los resultados se muestran como la media aritmética \pm DE de un $n = 3$ (2 réplicas por ensayo).

2.5. – Formación de biopelículas

Los efectos de las urolitinas sobre la formación de biopelículas por *Y. enterocolitica* se evaluó utilizando el ensayo de cristal violeta (Girenavar *et al.*, 2008) con algunas modificaciones (Truchado *et al.*, 2009b). La concentración de cada urolitina utilizada en el ensayo fue de 4 μM . El procedimiento está descrito en el

capítulo 3 (**apartado 3.2.5.6**). Los resultados se muestran como la media aritmética \pm DE de un $n = 3$ (2 réplicas por ensayo).

2.6. – Motilidad

La migración tipo natación (*swimming*) se midió siguiendo el método publicado por Atkinson y col. (**2006a**) con algunas modificaciones. El efecto de las urolitinas se ensayó a la concentración de 4 μ M como se describe en el capítulo 3 (**apartado 3.2.5.7**). Los resultados se muestran como la media aritmética \pm DE de un $n = 3$ (2 réplicas por ensayo).

2.7. – Análisis de las AHLs producidas por *Yersinia enterocolitica* mediante

HPLC-MS/MS

Para determinar el efecto inhibitorio específico de las urolitinas sobre la producción de AHLs en *Y. enterocolitica*, se incubó la bacteria en presencia de Uro-A o Uro-B a la concentración de 4 μ M a 30 °C durante 48 h y se midieron los niveles de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL en el medio de cultivo en comparación con medios control (sin urolitina). El proceso de extracción y análisis de las AHLs está descrito en el capítulo 3 (**apartado 3.2.5.8**).

Para determinar una posible interacción entre las AHLs y las urolitinas que pudiera producir alguna transformación y/o degradación de las lactonas por reacción directa con los compuestos, se incubaron cantidades conocidas de las lactonas sintéticas, C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL, con cada una de las urolitinas en ausencia de bacterias. Mediante análisis por HPLC-MS/MS (**apartado 3.5.3.1**) (Morin *et al.*, **2003**; Truchado *et al.*, **2009a**) se determinaron los niveles de las lactonas al inicio y final de la incubación. Los resultados se muestran como la media aritmética \pm DE de un $n = 3$ (2 réplicas por ensayo).

2.8. – Extracción del ARN de las bacterias

En este estudio, se extrajo el ARN de muestras control y tratadas con Uro-A o Uro-B (4 μ M) a 3 tiempos distintos: 6, 14 y 24 h. Estos tiempos se corresponden con la fase de adaptación (6 h), fase exponencial (14 h) y fase estacionaria (24 h) de la curva de crecimiento de *Y. enterocolitica*. El ARN se extrajo con un kit comercial MICROBexpress (Ambiom, Applied Biosystem, Foster City, USA) (capítulo 3, **apartado 3.4.1.2**). La pureza y concentración de las muestras se midió en una placa Nanoquant utilizando un lector de placas (Infinite M200, Tecan, Grodig, Austria) midiendo la A_{260} y A_{280} (capítulo 3, **apartado 3.4.1.3**).

2.9. – Análisis de expresión génica

En este ensayo seleccionamos un total de 5 genes que se expresan en *Y. enterocolitica* y que están relacionados con la síntesis de AHLs (*yenR* y *yenI*) y con la motilidad (*flhDC*, *fliA* y *fleB*) (Atkinson *et al.*, **2006a**; Atkinson *et al.*, **2008**). Los cebadores y las sondas se diseñaron (Custom Taqman Assay Design Tool, Applied Biosystems, ABI) de acuerdo con sus secuencias codificantes: *yenI* (YP_001005892), *yenR* (AM286415), *fliA* (AM286415.1), *fleB* (L33468.1) y *flhDC* (AF081587). La expresión relativa se midió mediante RT-PCR cuantitativa (capítulo 3, **apartado 3.4.3.1**). El gen endógeno utilizado para la normalización de los datos fue el ARN 16S (AM286415) y se utilizó el método de la curva estándar para la cuantificación relativa (capítulo 3, **apartado 3.4.3.1.1**). Los resultados se presentan como la media aritmética \pm DE de un mínimo de 4 experimentos independientes ($n = 4 - 7$; 3 réplicas por ensayo).

2.10. – Cultivo y tratamiento de macrófagos humanos con LPS y AHLs

El proceso de diferenciación de macrófagos a partir de monocitos THP-1 está descrito en el capítulo 3 (**apartado 3.2.1.3.3**). Una vez diferenciados, los macrófagos se

trataron con LPS (10 µg/mL) y las AHLs como se indica: i) 100 µM de C6-HSL, ii) 100 µM de 3-oxo-C6-HSL y iii) una mezcla de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL a las concentraciones finales de 1, 10, 50 y 100 µM. Tras 24 h de incubación, se separó el medio de cultivo y se congeló a -80 °C hasta su análisis. El ensayo se repitió n = 3 veces tomando el medio de cultivo de 6 pocillos independientes en cada ensayo.

2.11. – Viabilidad de los macrófagos humanos

El ensayo de MTT se utilizó para evaluar los efectos del LPS y de las AHLs sobre la viabilidad de los macrófagos. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una concentración de $3,5 \times 10^5$ células/pocillo y se trataron como se describe en el apartado anterior. La determinación de la viabilidad está descrita en el (capítulo 3, **apartado 3.2.2.2**).

2.12. – Análisis de los niveles de TNF-α

Los niveles de TNF-α se midieron en el medio de cultivo utilizando un kit de ELISA (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EEUU) como se describe en el capítulo 3 (**apartado 3.4.4.5**). El ensayo se repitió n = 3 veces (3 pocillos por ensayo).

2.13. – Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado en los distintos ensayos de este estudio está descrito en el **apartado 3.6** de la sección general de Materiales y Métodos.

3. – RESULTADOS

3.1. – Efecto de las urolitinas sobre la capacidad de *C. violaceum* para producir violaceína

En este ensayo se determinó la capacidad de Uro-A y Uro-B para reducir la producción de violaceína por *C. violaceum* (Tabla 7.1). Los resultados indican que ambos compuestos, a las concentraciones ensayadas (rango μM) disminuyeron la capacidad de esta bacteria para producir el pigmento ($\sim 20 - 30\%$) ($p < 0,05$). De las tres concentraciones ensayadas, se seleccionó la más baja, 4 μM , para llevar a cabo el resto de los ensayos.

Tabla 7.1. Porcentaje de inhibición de la producción de violaceína por *C. violaceum* 494 cultivada en medio LB broth suplementado con distintas concentraciones de urolitinas durante 24h.

Concentración (μM)	% inhibición en presencia de Uro-A	% inhibición en presencia de Uro-B
4	27,4 \pm 3,0	22,8 \pm 6,6
6	28,3 \pm 2,9	28,8 \pm 3,7
8	32,2 \pm 2,6	32,6 \pm 4,9

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm DE de 3 ensayos independientes ($n = 3$; 2 réplicas por ensayo) Todos los valores son significativos respecto de los controles no tratados ($p < 0,05$).

3.2. – Efectos de las urolitinas sobre el crecimiento microbiano, formación de biopelículas y motilidad en *Y. enterocolitica*

El ensayo de contaje en placa evidenció que las urolitinas, a la concentración de 4 μM , ejercían un leve efecto antimicrobiano sobre *Y. enterocolitica*. En particular, la Uro-A inhibió el crecimiento un $5,4 \pm 1,9\%$ mientras que la Uro-B lo hizo un $4,1 \pm 2,8\%$ aunque estos datos no resultaron estadísticamente significativos respecto del grupo control (Figura 7.1A). Sin embargo, Uro-A y Uro-B redujeron de manera significativa ($p < 0,05$) la capacidad de la bacteria para formar biopelículas ($45,1 \pm 12,1\%$ en el caso de Uro-A y $38,6 \pm 11,1\%$ en el caso de Uro-B) (Figura 7.1B) así como la motilidad por natación (*swimming*) ($19,4 \pm 12,2\%$ en el caso de Uro-A y $11,3 \pm 14,7\%$ en el caso de Uro-B) (Figura 7.1C).

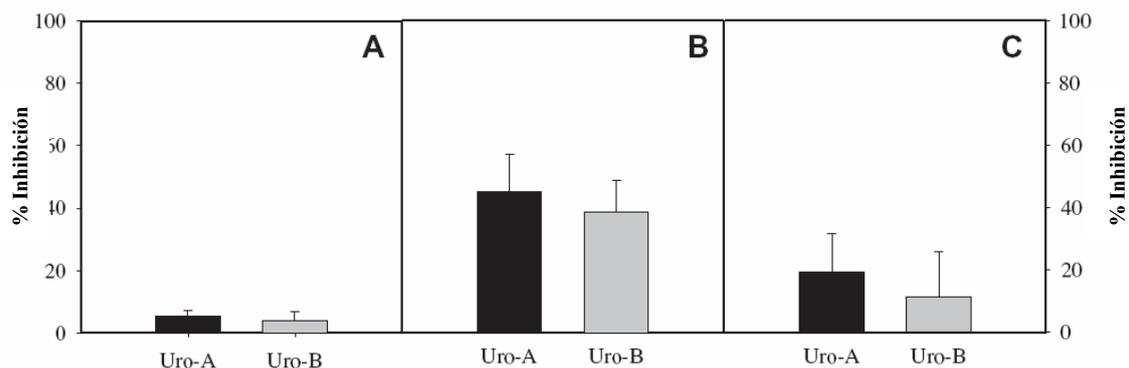


Figura 7.1. Porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano (A), formación de biopelículas (B) y motilidad (C) en *Y. enterocolitica* tras los tratamientos con las urolitinas (4 μ M) durante 24 h. Los valores se presentan como la media aritmética \pm DE (barras de error) de 3 experimentos independientes ($n = 3$; 2 réplicas por experimento). Los datos obtenidos para motilidad y biopelículas son significativos respecto a los controles ($p < 0,05$).

3.3. – Efecto de las urolitinas sobre los niveles de AHLs producidas por *Y. enterocolitica*

Para determinar si los efectos inhibitorios sobre la producción de biopelículas y la motilidad observados tras los tratamientos con las urolitinas eran debidos a una reducción de los niveles de AHLs, se midieron los niveles de estas lactonas en los medios de cultivo de cultivos control y cultivos tratados utilizando HPLC-MS/MS (capítulo 3, apartado 3.5.3.1). Los resultados indicaron que la exposición de la bacteria a las urolitinas (4 μ M) durante 24 h causaba una disminución significativa de los niveles de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL (**Figura 7.2**) y confirmaba los resultados preliminares obtenidos en el ensayo con *C. violaceum*. El análisis más específico mediante HPLC-MS/MS nos permitió establecer algunas diferencias en la capacidad inhibitoria de las dos urolitinas testadas y que no podían discernirse en el ensayo con *C. violaceum*. Uro-A redujo significativamente y de forma similar ambas AHLs ($36,4 \pm 4,5\%$ para 3-oxo-C6-HSL y $34,2 \pm 6,7\%$ para C6-HSL) mientras que Uro-B redujo en mayor medida los niveles de C6-HSL ($45,0 \pm 13,0\%$) que los de 3-oxo-C6-HSL ($18,5 \pm 10,7\%$).

La incubación de concentraciones conocidas de cada una de las dos AHLs en medio LB no inoculado con *Y. enterocolitica* en presencia y ausencia de Uro-A o Uro-B

demonstró que ambas urolitinas causaban por sí solas una pequeña disminución de los niveles de AHLs en el medio de cultivo. Uro-A y Uro-B redujeron significativamente los niveles de C6-HSL un $11,1 \pm 1,3\%$ y un $3,7 \pm 0,1\%$, respectivamente. Los niveles de 3-oxo-C6-HSL disminuyeron un $1,5 \pm 0,7\%$ en presencia de Uro-A y un $10,3 \pm 4,0\%$ en presencia de Uro-B (**Figura 7.2**).

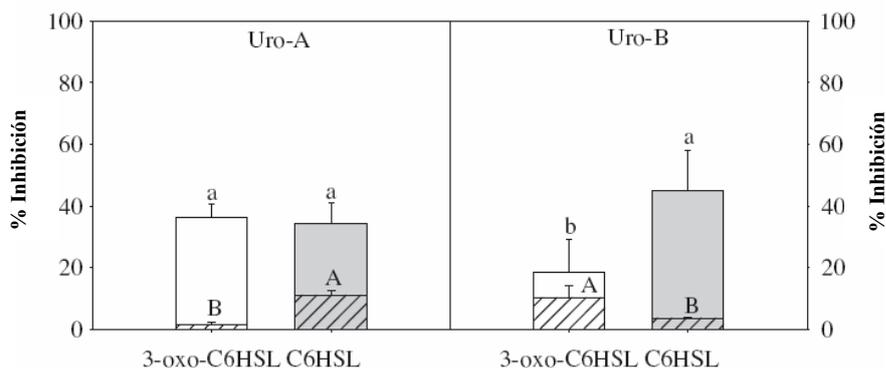


Figura 7.2. Porcentaje de inhibición de las lactonas producidas por *Y. enterocolitica*, 3-oxo-C6-HSL y la C6-HSL, en medio de cultivo LB suplementado con Uro-A o Uro-B (4 μ M) durante 48 h. Las barras rayadas indican el porcentaje de disminución medido en ausencia de *Y. enterocolitica*. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (barras de error) de 3 experimentos independientes (n = 3; 2 réplicas por experimento). Las diferentes letras de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.4. – Efectos de las urolitinas sobre los niveles de expresión génica

Para el estudio de los cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis de AHLs y con la motilidad en *Y. enterocolitica*, en primer lugar determinamos la variabilidad en la expresión de todos los genes seleccionados en ausencia de tratamiento, comparando los niveles de los transcritos entre réplicas control a cada uno de los tiempos estudiados ('variabilidad intrínseca en la expresión' o 'ruido de expresión'). Las diferencias (expresadas como el cociente entre réplicas) se encontraron en un rango de 0,7 – 1,3 para todos los genes, y por lo tanto, solo los valores que se encontraban fuera de ese rango (superiores a 1,3 o inferiores a 0,7) se consideraron indicativos de sobre-expresión o disminución como consecuencia de los tratamientos. También se examinaron los posibles cambios en los niveles de expresión de los genes asociados a la fase de crecimiento de la bacteria. Para esto, se compararon los niveles de

transcritos en las réplicas control a los 3 tiempos investigados. Los resultados indicaron que la expresión de *yenR* se inducía moderadamente a las 14 h ($1,9 \pm 0,5$; $p < 0,01$) y a las 24 h ($1,6 \pm 0,6$; $p = 0,10$) cuando se compararon con los niveles de expresión a las 6 h, mientras que los niveles de expresión de *yenI* permanecieron dentro del rango de variabilidad establecido ($0,9 \pm 0,3$ y $0,7 \pm 0,3$ a las 14 y 24 h respectivamente) (**Figura 7.3A**) y por tanto se consideró que no cambiaba en el tiempo.

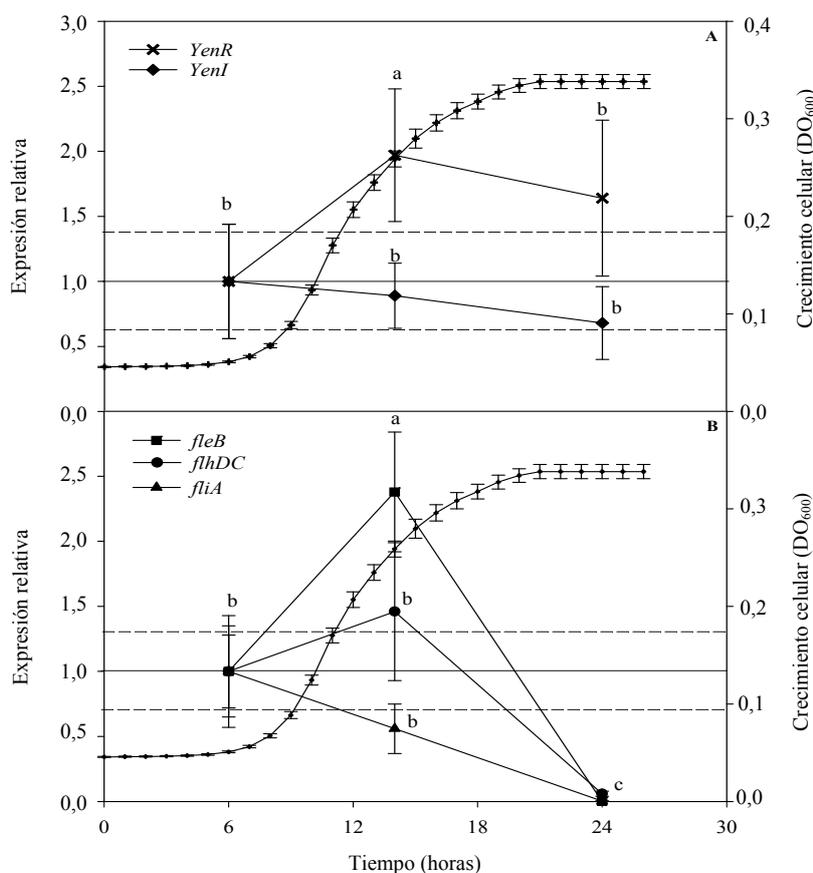


Figura 7.3. Expresión relativa de los genes relacionados con la síntesis de AHLs, *yenR* y *yenI* (A), y con la motilidad, *flhDC*, *fleB* y *fliA* (B) en función del crecimiento celular. Las muestras de ARN de los cultivos control se extrajeron a los 3 tiempos de estudio (6, 14 y 24 h) que se correspondían con las fases de adaptación, exponencial y de latencia, respectivamente. Los cambios relativos en la expresión génica a las 14 y las 24 h se determinaron respecto a las 6 h. Las líneas discontinuas indican los valores máximo (1,3) y mínimo (0,7) de variabilidad intrínseca de expresión. Los datos representan la media aritmética \pm DE (barras de error) de un mínimo de 4 experimentos independientes ($n = 4 - 7$; 3 réplicas por experimento). Las diferentes letras indican diferencias significativas frente a los valores a 6 h ($p < 0,01$). El crecimiento bacteriano se representa como la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) frente al tiempo y los valores se expresan como la media aritmética \pm DE (barras de error) de 4 réplicas distintas ($n = 4$).

Los niveles de expresión de *fleB* y *flhDC* aumentaron a las 14 h respecto a las 6 h (**Figura 7.3B**) ($2,4 \pm 0,5$; $p < 0,01$ y $1,4 \pm 0,5$; $p < 0,14$; respectivamente). A las 24 h de crecimiento los niveles de estos dos genes disminuyeron hasta niveles muy bajos o no detectables. La expresión de *fliA* se redujo a las 14 y a las 24 h de crecimiento respecto a las 6 h (**Figura 7.3B**).

Una vez determinada la expresión basal de los genes estudiados, se investigó el efecto de las urolitinas (4 μ M) sobre la expresión de *yenR* y *yenI* a los 3 tiempos de estudio (6, 14 y 24 h) (**Figura 7.4**). Los análisis por RT-PCR indicaron que en las células tratadas con Uro-A, los niveles de expresión de *yenR* aumentaban moderadamente a las 14 h de crecimiento ($p < 0,01$) y se mantenían a las 24 h. La expresión de *yenI* no se modificó por el tratamiento con Uro-A a ninguno de los tiempos estudiados. El tratamiento con Uro-B se asoció con un notable incremento de la expresión tanto de *yenR* como de *yenI* a las 6 h y 24 h. En concreto, la expresión de *yenR* se incrementó 3,6 veces a las 6 h, mientras que la de *yenI* lo hizo 3,3 veces.

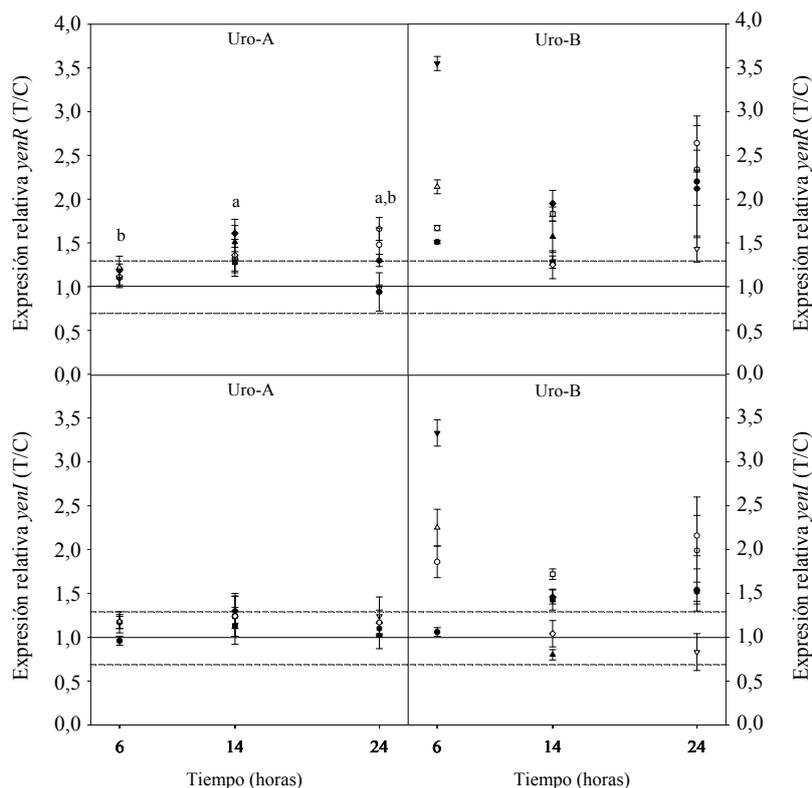


Figura 7.4. Expresión de *ycnR* y *ycnI* a las 6, 14 y 24 h del crecimiento de *Y. enterocolitica* en presencia y ausencia de Uro-A y Uro-B (4 μ M). El cambio relativo en la expresión de las células tratadas se calculó frente a las células control (tratado/control; T/C) a los mismos tiempos indicados. Las líneas discontinuas indican el mínimo (0,7) y el máximo (1,3) valor de variabilidad intrínseca de expresión. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (barras de error) de al menos 4 ensayos independientes ($n = 4 - 7$; 3 réplicas por ensayo). Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$ y $p < 0,01$).

Una vez estudiados los efectos de las urolitinas sobre *ycnR* y *ycnI*, investigamos si los cambios observados en estos genes y el tratamiento con las urolitinas influenciaban la expresión de genes reguladores clave de la cascada flagelar implicados en la motilidad bacteriana: *flhDC*, *fleB* y *fliA*. Los análisis por RT-PCR (**Figura 7.5**) revelaron que los niveles de expresión de *flhDC* eran ligeramente superiores, aunque no significativamente, tras 6 y 24 h de tratamiento con Uro-A, mientras que Uro-B indujo significativamente la expresión este gen a las 6 h ($p < 0,05$) y a las 24 h ($p < 0,05$) de tratamiento. La expresión de *fliA* no se vio modificada tras el tratamiento con Uro-A pero se indujo ligeramente tras el tratamiento con Uro-B a las 14 y 24 h (resultados no significativos). Los niveles de expresión de *fleB* disminuyeron levemente (no

significativo) a las 6 h de tratamiento con Uro-A y se continuó con un incremento pequeño pero significativo a las 14 h ($p < 0,05$) y 24 h ($p < 0,01$). El tratamiento con Uro-B se asoció con un incremento en la expresión de *fleB* después de 14 y 24 h de tratamiento (resultados no significativos).

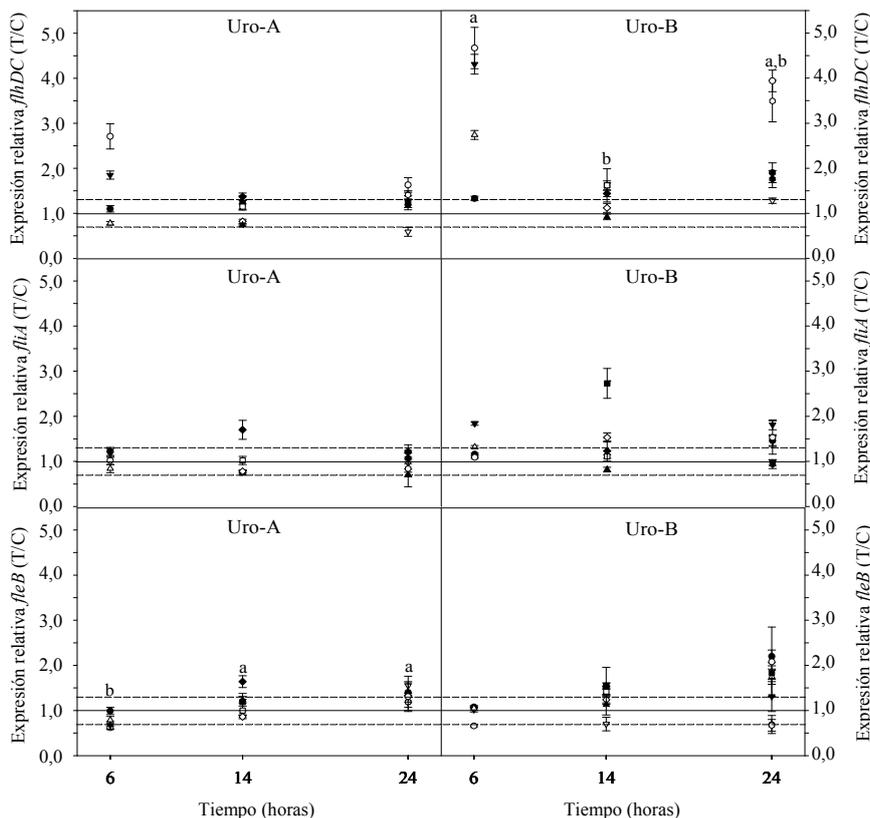


Figura 7.5. Expresión de *yenR* y *yenI* a las 6, 14 y 24 h del crecimiento de *Y. enterocolitica* en presencia y ausencia de Uro-A y Uro-B (4 μ M). Cambio relativo en la expresión de las células tratadas se calculó frente a las células control (T/C) a los mismos tiempos indicados. Las líneas discontinuas indican el mínimo (0,7) y el máximo (1,3) valor de variabilidad intrínseca de expresión. Los datos se presentan como la media aritmética \pm DE (barras de error) de al menos 4 ensayos independientes ($n = 4 - 7$; 3 réplicas por ensayo). Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$ y $p < 0,01$).

3.5. – Efecto de las AHLs, C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL, sobre macrófagos humanos activados con LPS.

El tratamiento de los macrófagos con la endotoxina de origen bacteriano LPS y/o las AHLs no afectó a la viabilidad de estas células, incluso a las concentraciones más altas (100 μ M para las AHLs y 10 μ g/mL para el LPS). En ausencia de LPS, ni las lactonas de manera individual ni la mezcla de ambas tuvieron efecto sobre los niveles de

TNF- α liberados por macrófagos al medio de cultivo. Sin embargo, como se indica en la **Figura 7.6**, tras la exposición de los macrófagos a LPS los niveles de TNF- α aumentaron significativamente respecto al grupo control. Los niveles de la citoquina pro-inflamatoria disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) en el medio de cultivo cuando las células que se trataron con una mezcla AHLs tanto a 50 como a 100 μ M. Individualmente, C6-HSL a una concentración de 100 μ M también produjo una disminución significativa de la secreción de TNF- α ($p < 0,05$) (**Figura 7.6**).

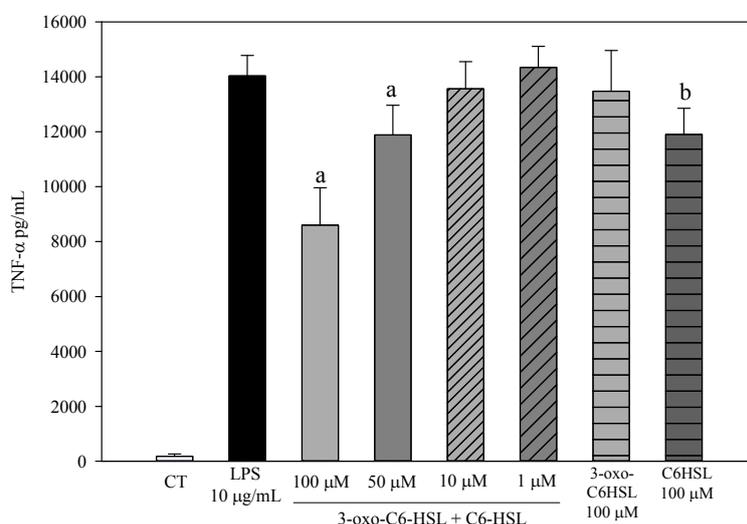


Figura 7.6. Niveles de TNF- α determinados por ensayo de ELISA en los medio de cultivo de macrófagos expuestos a LPS (10 μ g/mL) y a las AHLs de cadena corta producidas por *Y. enterocolitica*. Los datos se presentan como media aritmética \pm DE de $n = 3$ ensayos independientes (3 réplicas por ensayo). Las letras indican diferencias significativas respecto del tratamiento con LPS (10 μ g/mL). Todos los tratamientos son significativos respecto del grupo control.

4. – DISCUSIÓN.

En este estudio hemos establecido por primera vez que las urolitinas Uro-A y Uro-B, metabolitos microbianos principales derivados de ETs (Cerdá *et al.*, 2005a; Espín *et al.*, 2007b), son capaces de inhibir procesos bacterianos asociados al mecanismo de QS (20 – 40%) y de reducir los niveles de AHLs producidas por *Y. enterocolitica* (~35 – 45%) sin afectar, de manera significativa, a la capacidad de crecimiento de la bacteria. Se ha descrito que extractos ricos en ETs, como los de ciertas

bayas o los de granada, pueden inhibir la motilidad mediada por *QS* en *P. aeruginosa* (~30 – 50%) utilizando elevadas concentraciones de extracto (0,1 – 10 mg/mL) (O'May & Tufenkji, 2011; Vattem *et al.*, 2007). Aunque estos efectos no se pueden atribuir en su totalidad a los ETs que pueden estar presentes en el extracto (μ moles), los resultados sugerían que extractos ricos en ETs parecen tener propiedades anti-*QS* frente a bacterias patógenas. Sin embargo, es bien sabido que los ETs se hidrolizan y metabolizan en el intestino dando lugar a las urolitinas (Espín *et al.*, 2007b). Nuestros resultados indican que algunas de estas urolitinas, a concentraciones relativamente bajas y que pueden encontrarse en el intestino, podrían ser potentes inhibidores de los sistemas de *QS in vivo*.

La inhibición de *QS* en bacterias puede tener lugar a través de diversos mecanismos: i) inhibición de la síntesis de las AHLs, ii) inhibición del transporte y/o secreción de AHLs, iii) secuestro o degradación enzimática/no enzimática de las AHLs; iv) antagonismo de los receptores de AHLs, v) inhibición de la ruta de activación tras la unión de la AHLs a su receptor (Ni *et al.*, 2009; Vattem *et al.*, 2007). En general se cree que los extractos naturales pueden inhibir los mecanismos de *QS* mediante una combinación de los mecanismos descritos anteriormente, principalmente por interferencia con la actividad de las AHLs y alteración de su síntesis (Vattem *et al.*, 2007). Durante este estudio, se intentó esclarecer algunos de los posibles mecanismos por los cuales Uro-A y Uro-B ejercían sus efectos anti-*QS*. Así pues, primero determinamos la capacidad de estos compuestos de reducir la producción y secreción de AHLs al medio de cultivo por *Y. enterocolitica*. Es importante tener en cuenta que la producción de lactonas está afectada por factores como pH, composición del medio y temperatura. Además, es un proceso dependiente de la densidad celular, con bajos niveles de AHLs en las fases de adaptación y exponencial de la curva de crecimiento

que se incrementan y acumulan en el medio de cultivo conforme se produce un incremento de la densidad celular (Roy *et al.*, 2011). Se ha descrito que en medios de cultivo convencionales ricos en nutrientes se produce en general una baja actividad de las AHLs (Baiton *et al.*, 1992). En este capítulo, la cuantificación de las AHLs en nuestro medio de cultivo (rico en nutrientes) se realizó tras 48 h de crecimiento de la bacteria (fase estacionaria) para asegurarnos de que los niveles fueran detectables. Además utilizamos un sistema de análisis por HPLC-MS/MS que permite detectar e identificar de manera específica niveles muy bajos de AHLs en medio de cultivo producidas por especies de *Yersinia* (Ortori *et al.*, 2007; Throup *et al.*, 1995). En un estudio reciente nuestro grupo determinó la capacidad anti-QS de la miel de castaño mediante este sistema de HPLC-MS/MS (Truchado *et al.*, 2009a). Los resultados presentados en este capítulo indican que el tratamiento con las urolitinas causó una reducción significativa en los niveles de C6-HSL y de 3-oxo-C6-HSL producidos por *Y. enterocolitica* y que se observaban ciertas diferencias entre la capacidad inhibitoria de Uro-A y la de Uro-B. Para descartar que la disminución de los niveles de AHLs fuese consecuencia de una degradación de naturaleza química por interacción directa de las AHLs con las urolitinas, se incubaron concentraciones conocidas de C6-HSL y de 3-oxo-C6-HSL en presencia y ausencia de Uro-A y Uro-B (en ausencia de la bacteria). Nuestros resultados indicaron que la presencia de las urolitinas por sí solas causaba una pequeña disminución en los niveles de las lactonas y corroboraba que Uro-A y la Uro-B reaccionaban de distinta manera con cada una de las AHLs. En relación al pH, Yates *et al.* (2002) indicaron que la hidrólisis e inactivación de las AHLs podría ocurrir como consecuencia de una lactonólisis asociada a la alcalinización del medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano. Estos autores observaron que la velocidad a la que se hidrolizan las AHLs aumenta rápidamente a valores de pH por encima de 6,0, a

temperaturas más elevadas y a menor longitud de la cadena de las AHLs. En concreto, describieron que la lactona C4-HSL no se alteraba hasta que el pH alcanzaba un valor de 6,0 y que la velocidad de hidrólisis de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL era menor que la de C4-HSL. En nuestro estudio se determinó el pH en el medio de cultivo, tanto en presencia como en ausencia de *Y. enterocolitica* y/o urolitinas, y se observó que tras 24 – 48 h de incubación con la bacteria, el pH inicial (6,92 – 6,99) se acidificó ligeramente hasta 5,88 – 6,19. Tanto Uro-A como Uro-B permanecieron intactas en el medio de cultivo y no afectaron al pH del medio de cultivo. Estos resultados indican que en las condiciones de nuestros ensayos, pH ~6,0 y temperatura de 30 °C, la lactonólisis de las AHLs producidas por *Y. enterocolitica* dependiente de pH, probablemente no fuese significativa. Otros posibles mecanismos de degradación de las AHLs son: i) la oxidación por radicales (Frey *et al.*, 2010) y ii) la degradación espontánea mediante la reacción irreversible tipo Claisen que produce ácidos tetraméricos (Hosono Honda *et al.*, 2011). Aunque no se ha demostrado una interacción directa entre las urolitinas y las AHLs, no se puede descartar que algunas de estas reacciones puedan producirse en las condiciones de nuestros ensayos contribuyendo a los resultados obtenidos.

A continuación, investigamos los posibles efectos de las urolitinas sobre la síntesis de las AHLs analizando los cambios en la expresión de genes específicos implicados en la síntesis. Una parte de los estudios publicados sugieren que algunos de los fitoquímicos presentes en los alimentos de origen vegetal podrían modular la capacidad de las bacterias para sintetizar AHLs a través de mecanismos que alteren la expresión de la familia de proteínas LuxI y LuxR responsables de su síntesis (Vattem *et al.*, 2007). Se ha descrito, por ejemplo, que la curcumina, un compuesto fenólico de la planta *Curcuma longa*, atenúa la virulencia de *P. aeruginosa* reduciendo la expresión del gen *lasI* que está implicado en la síntesis de *N*-(3-oxododecanoil)-L-homoserín

lactona (Rudrappa y Bais, 2008). El flavonoide catequina también reduce de forma significativa la expresión de *lasI* y de *rhII*, relacionados ambos con la síntesis de AHLs, en *P. aeruginosa* (Vandeputte *et al.*, 2010). En nuestro estudio, ni Uro-A ni Uro-B disminuyeron la expresión de *yenI* y/o *yenR* en *Y. enterocolitica* a los tiempos estudiados. Al contrario de esto, observamos una ligera inducción de la expresión de estos genes más marcada en el caso del tratamiento con Uro-B. Estos resultados nos llevaron a hipotetizar que si la reducción de los niveles de AHLs observadas se produce realmente a través de una bajada en la expresión de estos genes, ésta tendría que haber tenido lugar a tiempos anteriores a los estudiados. El aumento observado en la expresión de estos genes, especialmente tras el tratamiento con Uro-B, podría entonces deberse a una respuesta de la bacteria a esta supuesta inducción inicial. El sistema de expresión de los genes regulado por QS, tanto en *Y. enterocolitica* como en otros patógenos Gram-negativos, es un sistema muy complejo que todavía no se conoce bien. En general, parece que en estos patógenos Gram-negativos la transcripción del gen *luxI* está regulada por un proceso de retroalimentación positiva mediante la unión entre la proteína LuxR a AHLs específicas (Hardman *et al.*, 1998). Sin embargo, en *Y. enterocolitica*, se cree que *yenR* funciona como una apo-proteína activa en ausencia de sus AHLs específicos que activa la expresión de pequeños fragmentos de ARN no traducidos (*yenS*) que inhiben la producción de *yenI* (Tsai y Winans, 2011). Estos autores sugieren un modelo en el cual a bajas densidades de población (bajos niveles de AHLs), se acumula apo-*yenR* que activa a *yenS*, el cual inhibe la transcripción de *yenI*. Sin embargo, a elevadas densidades celulares (altos niveles de AHLs), *yenR* se inactiva reduciendo los niveles de expresión de *yenS*, lo que genera un aumento en la expresión de *yenI*. En nuestro estudio analizamos la expresión de *yenR* y *yenI* a 3 tiempos de relacionados con el crecimiento de la bacteria: i) final de la fase de adaptación (baja

densidad celular), ii) fase exponencial y iii) fase estacionaria (elevada densidad celular). Nuestros resultados revelaron que concentraciones celulares elevadas se asociaban a un incremento en la expresión de *yenR* mientras que los niveles de *yenI* permanecían constantes o ligeramente más bajos (**Figura 7.3A**) lo que, a diferencia del modelo propuesto anteriormente, indicaba que *yenI* se expresa constitutivamente y de manera independiente a la fase de crecimiento (Atkinson *et al.*, **2006b**; Throup *et al.*, **1995**). En el año **2011**, un estudio de Tsai y Winans proponía que *yenR* y *yenS* podían regular otros genes, actuando *yenR* como represor o activador de éstos. Estas teorías nos llevan a pensar que Uro-A y Uro-B pueden estar regulando otros genes aún no definidos y actuando mediante rutas alternativas. No obstante, tampoco se puede descartar que la disminución en la producción de las AHLs por las urolitinas pudiera deberse a mecanismos alternativos como: i) la inhibición del transporte y secreción de lactonas (Ni *et al.*, **2009**), ii) la inhibición de la actividad enzimática sintasa o iii) la degradación enzimática por acción de las lactonasas, acilasas y/o reductasas (Czalkowski y Jafra, **2009**).

La motilidad bacteriana por natación o enjambre son procesos implicados en la formación de biopelículas y en la patogénesis (Fraser y Hughes, **1999**). Nuestros resultados indicaron que el tratamiento de *Y. enterocolitica* con Uro-A o Uro-B inhibía su capacidad para migrar por natación y para formar biopelículas. En esta bacteria, el proceso de *QS* dependiente de AHLs está implicado en el control de la motilidad por natación y movimiento en enjambre mediante la regulación de la cascada flagelar, la cual incluye al operón *flhDC*, el activador *fliA* y genes relacionados con la síntesis de flagelina como *fleB* (Atkinson *et al.*, **2006b**). En un mutante para el gen *yenI* de una cepa de *Y. enterocolitica* (90/54, serotipo O:9) se observó que además del bloqueo en la síntesis de las AHLs, el mutante carecía de la proteína FleB y era incapaz de desplazarse

por natación o movimiento en enjambre, lo que indicaba que genes relacionados con QS pueden regular, al menos en parte, la motilidad. Además, este mutante mostraba una expresión deficiente de *fleB*, aunque la transcripción de *flhDC* o de *fliA* no estaba afectada (Atkinson *et al.*, 2006a). En el caso de *Y. pseudotuberculosis* se ha visto que la motilidad por natación se modula por una compleja interacción entre sus sistemas de QS que controlan la expresión de *flhDC* y *fliA* (Atkinson *et al.*, 2008). En este capítulo, investigamos los cambios en la expresión de *flhDC*, *fliA* y *fleB* a tres tiempos distintos de la curva de crecimiento (6, 14 y 24 h) en bacterias control y en bacterias tratadas con urolitinas. De acuerdo con los resultados obtenidos en otros estudios (Atkinson *et al.*, 2006), nuestros resultados evidenciaron que tanto *fleB* como *fliA* se expresaban en células control a las 14 h, y que a las 24 h la expresión de estos dos genes disminuía a niveles muy bajos. Sin embargo, y en contra de lo descrito por Atkinson *et al.* (2006), en nuestro estudio si pudimos detectar expresión de *flhDC* a las 14 h. Esta diferencia podía deberse a que los métodos de análisis utilizados fueron diferentes, Northern blot vs RT-PCR. Por otro lado, y a diferencia de la disminución en la expresión de *fleB* observada en el mutante para el gen *yenI* no-móvil, el tratamiento con urolitinas que también causó una reducción significativa de la motilidad de las bacterias produjo, sin embargo, una ligera inducción en la expresión de *fleB*. Uro-B también indujo un aumento en la expresión de *fliA* y *flhDC*. No podemos descartar que haya tenido lugar una represión de la expresión de estos genes asociados a la motilidad en etapas más tempranas del crecimiento celular y que la inducción observada, especialmente tras el tratamiento con Uro-B, pudiera deberse a un contra-efecto.

Estudios previos han descrito que Uro-A actúa como un potente agente anti-inflamatorio en un modelo de inflamación intestinal de rata y que este efecto podría estar asociado a efectos moduladores sobre la microbiota colónica (Larrosa *et al.*,

2010a). En particular, Uro-A indujo el crecimiento de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium* mientras que disminuyó el número total de enterobacterias y, en concreto, de *E. coli*. La disminución en el crecimiento de patógenos se asoció a la inducción paralela de bacterias beneficiosas, pero no se conoce aún cuál es el mecanismo por el que Uro-A influencia el crecimiento de las bacterias. *Y. enterocolitica* es un microorganismo que causa infecciones gastrointestinales invadiendo la mucosa intestinal y penetrando en los tejidos linfoides (placas de Peyer) donde entra en contacto con los monocitos y los macrófagos e induce múltiples respuestas transcripcionales contra la infección (Hoffmann *et al.*, **2003**). Se ha detectado la presencia de 3-oxo-C6-HSL en tejidos como el hígado, el bazo y las placas de Peyer de ratones infectados con *Y. enterocolitica* lo que demuestra la producción de AHLs por parte de la bacteria durante los procesos infecciosos (Jacobi *et al.*, 2003) aunque el papel de las AHLs en modelos *in vivo* aun no se conoce con claridad. Algunos estudios previos han demostrado que 3-oxo-C6-HSL no tiene actividad sobre macrófagos activados por LPS (Hooi *et al.*, **2004**; Telford *et al.*, **1998**). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en nuestro estudio en los que observamos que 3-oxo-C6-HSL no afectaba a los niveles de TNF- α en macrófagos activados con LPS. Sin embargo, sí detectamos que los niveles de esta citoquina disminuían en presencia de C6-HSL sola o en combinación con 3-oxo-C6-HSL. A pesar de que la concentración de AHLs que inhibía la producción de TNF- α en los macrófagos activados parece algo elevada (50 – 100 μ M), se han llegado a detectar concentraciones de hasta 600 μ M de AHLs en biopelículas de otras bacterias (Charlton *et al.*, **2000**) por lo que no se puede descartar que en las biopelículas de *Y. enterocolitica* los niveles de AHLs puedan alcanzar concentraciones bioactivas. Los resultados de este estudio indican que las urolitinas son capaces de reducir los niveles de AHLs producidas por *Y. enterocolitica* y, por lo tanto,

podrían intervenir en la respuesta inflamatoria aguda disminuyendo la capacidad de supervivencia del patógeno y la de generar infecciones reguladas por *QS*. Es importante destacar que las concentraciones de urolitinas utilizadas en este estudio capaces de inhibir los mecanismos de *QS* en *Y. enterocolitica* eran relativamente bajas (4 – 8 μM). Existen estudios que indican que tras el consumo de un extracto de granada en ratas, las concentraciones detectadas en el colon de Uro-A y de Uro-B varían en los rangos de 7 – 34 μM y 2 – 65 μM , respectivamente (González-Sarrías *et al.*, 2009b) lo cual indica que las concentraciones inhibitorias de *QS* utilizadas en este estudio pueden alcanzarse en el intestino gracias al consumo a través de la dieta y sugiere que el consumo de alimentos ricos en ETs podría ejercer efectos anti-*QS* *in vivo* en el intestino.

Los resultados presentados en este trabajo nos permiten concluir que Uro-A y Uro-B, principales metabolitos microbianos derivados de los ETs de la dieta y que se generan en el intestino, son capaces de inhibir procesos regulados por *QS* como la formación de biopelículas y la motilidad tipo natación en *Y. enterocolitica* sin alterar el crecimiento de la bacteria. Este efecto inhibitorio podría estar mediado, al menos en parte, por una reducción de los niveles de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL producidas por la bacteria. Aunque las respuestas fenotípicas inducidas por ambas urolitinas fueron similares, la eficiencia en la reducción de los niveles de cada una de las AHLs individuales fue distinta para cada urolitina. Nuestros resultados subrayan que en *Y. enterocolitica*, Uro-B inducía más marcadamente la expresión de genes relacionados con la motilidad y *QS* que Uro-A. La regulación génica del sistema de comunicación célula-célula sigue un mecanismo complejo y jerarquizado que todavía no se comprende muy bien. El uso del transcriptoma como herramienta de investigación podría ser una técnica muy útil para ayudar a comprender los mecanismos utilizados por las urolitinas para inhibir el proceso de *QS* en *Y. enterocolitica*.

ANEXO I

Tabla suplementaria S1. Los cebadores y sondas utilizadas en los análisis de RT-PCR fueron diseñados a través del servicio de Custom Taqman Assay Design Tool de Applied Biosystems (ABI) utilizando las secuencias codificantes encontradas en NCBI: *yenI* (YP_001005892), *yenR* (AM286415), *fliA* (AM286415.1), *fleB* (L33468.1) y *flhDC* (AF081587)

<i>Gen</i>	Proteína codificada	Secuencias codificantes NCBI	Cebadores	Reportero (FAM)
<i>yenI</i>	Sintasa de AHLs	YP_001005892.1	Directo:GATGTGAGCCTACCTATTGATGGTT Inverso:CCCACCATATCTCTTGCTAATGCTT	CCAGCCGATTCTTTG
<i>yenR</i>	Activador transcripcional del <i>QS</i>	AM286415.1	Directo:CCGGTTATATTGACGGCGAAAGATA Inverso:CGGCGGAATCCGTCGAT	CTGGGACGATAATTCC
<i>fliA</i>	Factor σ de la ARN polimerasa para el operón flagelar	AM286415.1	Directo:AACAACGGCTCGGACGT Inverso:CTGGCGGTACTCAGTCAAATCAATA	AAGTCGCACAAAATC
<i>fleB</i>	Proteína de motilidad termorregulada	L33468.1	Directo:GGCGGTCGAAAGATAATGAACAAAT Inverso: AGATTCCAGCCAGAACTTGCA	CCAATCGCCAATGCTG
<i>flhDC</i>	Operón regulador maestro de la motilidad	AF081587.1	Directo:GCGCGCTTGCAGATGTT Inverso:GCTGCCTCTCAGCTCTTTATAGA	TTGCGTCTCGCTTTCT
<i>16S</i>	16S ARNr	AM286415.1	Directo: GCCCCCTGGACAAAGACT Inverso:GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT	TCCCCACGCTTTCG

CAPÍTULO 8

Un extracto de naranja rico en flavanonas glicosiladas inhibe de forma moderada la actividad *Quorum sensing* (QS) en *Yersinia enterocolitica*: efectos fenotípicos y moleculares.

Truchado P, **Giménez-Bastida JA**, “Inhibition of *Quorum sensing* (QS) in *Yersinia enterocolitica* by orange extract rich in glycosylated flavanones”, *J. Agric Food Chem.*, 2012, doi: [dx.doi.org/10.1021/jf301365a](https://doi.org/10.1021/jf301365a)

Un extracto de naranja rico en flavanonas glicosiladas inhibe de forma moderada la actividad *Quorum sensing* (QS) en *Yersinia enterocolitica*: efectos fenotípicos y moleculares.

RESUMEN

Se ha determinado que algunas flavanonas, flavonoides abundantes en cítricos, pueden interferir con los mecanismos de QS y procesos fisiológicos relacionados. En este capítulo, hemos investigado los efectos anti-QS de un extracto de naranja enriquecido en flavanonas O-glicosiladas (principalmente naringina, neohesperidina y hesperidina). En concreto, se investigaron los efectos anti-QS del extracto y de sus principales flavanonas sobre i) la capacidad de disminuir la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum*; ii) la reducción de los niveles de lactonas autoinductoras producidas por *Y. enterocolitica* utilizando HPLC-MS/MS; iii) la inhibición de la formación de biopelículas y iv) la inhibición de la motilidad por natación (*swimming*) y por enjambre (*swarming*). Además, mediante RT-PCR, se estudiaron los cambios en la expresión de genes específicos implicados en la síntesis de lactonas (*yenI* y *yenR*) y en el sistema regulador de la síntesis flagelar (*flhDC*, *fleB*, *fliA*). Tanto el extracto de naranja como sus principales flavanonas exhibieron capacidad anti-QS disminuyendo la producción de violaceína en *C. violaceum*, reduciendo los niveles de lactonas secretadas por *Y. enterocolitica* y disminuyendo la formación de biopelículas asociadas a QS, todo ello sin modificar el crecimiento celular de la bacteria. Entre los compuestos individuales estudiados, solamente la naringina fue también capaz de inhibir la motilidad por natación de *Y. enterocolitica*. Desde el punto de vista de la expresión génica, el tratamiento con el extracto de naranja y/o la naringina causó una inducción en

los niveles de transcripción de *yenR*, *flhDC* y *fliA*. En este capítulo se exponen los efectos anti-*QS in vitro* de un extracto de naranja enriquecido en flavanonas, a dosis que se pueden alcanzar a través de la dieta, frente al enteropatógeno humano *Y. enterocolitica*. Estos datos sugieren que el consumo de estos extractos naturales podría tener un efecto antimicrobiano beneficioso.

1. – INTRODUCCIÓN.

En general, se acepta que los compuestos fenólicos presentes en alimentos vegetales y plantas medicinales ejercen efectos beneficiosos frente a enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares (ECVs) o procesos inflamatorios (Larrosa *et al.*, 2010a). Los flavonoides son un grupo abundante de compuestos fenólicos que se subdividen en antocianos, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavan-3-oles, proantocianidinas e isoflavonas. Los cítricos son la principal fuente dietética de flavanonas, encontrándose principalmente en su forma glicosilada y siendo las más abundantes hesperidina (hesperetina-7-*O*-rutinósido) y naringina (naringenina-7-*O*-rutinósido), con concentraciones en el zumo de naranja que varían desde los 200 hasta los 590 mg/L y desde los 16 hasta los 84 mg/L, respectivamente (Tomás-Barberán, 2000). Hesperidina y naringina presentan una absorción muy baja, ya que el grupo glicósido solo se hidroliza en la región distal del intestino (Ameer *et al.*, 1996). Estos glicósidos pueden pues alcanzar el colon en su forma molecular original (como ya se corroboró en el **capítulo 6**) y ejercer, entre otros posibles efectos biológicos, un efecto modulador sobre la microbiota intestinal (Mullen *et al.*, 2008). Estudios recientes indican que determinados flavonoides pueden interferir con los mecanismos de *QS* de las bacterias patógenas inhibiendo su virulencia (Truchado *et al.*, 2012, Vandeputte *et al.*, 2010). El *QS* es un proceso que permite a una población bacteriana coordinar la

expresión de un grupo específico de genes, además de amplificar la virulencia bacteriana estimulando la expresión de fenotipos como la motilidad, formación de biopelículas y secreción de factores de virulencia generando infecciones y estados patológicos (Atkinson y Williams, **2009**).

El género *Yersinia* engloba a un grupo de bacterias patógenas de humanos entre las que se encuentra *Yersinia enterocolitica*. Este microorganismo es una γ -proteobacteria de importancia médica y científica que coloniza el intestino delgado generando dolor gastrointestinal, diarrea e incluso septicemia en pacientes inmunodeprimidos (Matsumoto y Young, **2009**). *Y. enterocolitica* utiliza las *N*-acil-homoserín-lactonas (AHLs) como moléculas de señalización de *QS* para coordinar la expresión de grupos de genes (Hardman *et al.*, **1998**). La síntesis de AHLs en esta bacteria está regulada por dos genes: i) *yenI* que codifica una sintasa de las AHLs y ii) *yenR* que codifica un activador transcripcional (Throup *et al.*, **1995**). El sistema *QS* en *Y. enterocolitica* está implicado en la regulación de las 3 principales clases de genes flagelares que controlan la motilidad por natación (migración en ambientes fluidos) y en enjambre (proceso dependiente de flagelos que facilita la migración bacteriana en superficies sólidas) (Atkinson *et al.*, **2006a,b**). Una buena parte de publicaciones indican que las biopelículas bacterianas juegan un papel muy importante en la patogénesis de muchas infecciones humanas y que incrementan la resistencia de los microorganismos a agentes antimicrobianos (Lewis, **2010**). Numerosas investigaciones sugieren que los mecanismos de *QS* puede tener un papel destacado en la formación de biopelículas maduras completamente desarrolladas en distintas bacterias (Girenavar *et al.*, **2008**; Moons *et al.*, **2006**).

El importante papel que tienen los mecanismos de *QS* en la regulación de procesos como la motilidad y la formación de biopelículas ha hecho de la inhibición de

estos mecanismos una estrategia clave para intentar reducir la virulencia de bacterias patógenas (McDougald *et al.*, 2007; Njoroge y Sperandio, 2009; Vandeputte *et al.*, 2010). Estudios previos han descrito que algunos de los flavonoides presentes en cítricos son capaces de inhibir algunos de los mecanismos de *QS*, como la señalización célula-célula y la formación de biopelículas, en *Vibro harveyi* y en *Escherichia coli* O157:H7 (Vikram *et al.*, 2010). Estos autores también han demostrado que algunos flavonoides tienen capacidad para alterar la expresión de genes que codifican el sistema de secreción “tipo III” en *V. harveyi*. En relación a estos resultados, Vandeputte *et al.*, (2011) demostraron que la naringenina reducía drásticamente la producción de *N*-(3-oxododecanoil)-*L*-homoserín lactona (3-oxo-C12-HSL) y *N*-butanoil-*L*-homoserín lactona (C4-HSL) así como la expresión de varios genes controlados por *QS* (por ejemplo *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *lasA*, *lasB*, *phzA1* y *rhlA*) en *P. aeruginosa* PAO1.

Objetivos. La problemática actual asociada al uso de antibióticos como tratamiento de infecciones bacterianas, así como el descubrimiento de la implicación de los mecanismos de *QS* en los procesos de infección bacteriana ha convertido la búsqueda de productos naturales inhibidores de *QS* en un campo de gran interés. En este capítulo hemos querido ahondar en la investigación sobre las propiedades y mecanismos anti-*QS* de un extracto natural de naranja rico en flavanonas y de varias de sus principales flavanonas. Para ello nos propusimos estudiar: i) la capacidad del extracto de naranja para inhibir la producción de las moléculas autoinductoras de *QS*, AHLs, ii) la inhibición de la formación de biopelículas controladas por *QS* y iii) la disminución de la motilidad en el patógeno *Y. enterocolitica*. Al igual que en el capítulo anterior, evaluamos algunos de los cambios moleculares asociados a la síntesis de AHLs y a la motilidad de la bacteria tras el tratamiento con el extracto de naranja o con la naringina

mediante el análisis de los niveles de expresión de varios genes clave implicados en ambos procesos.

2. – MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. – Materiales.

En este estudio se han utilizado el extracto soluble de naranja amarga rico en flavanonas, varias flavanonas sintéticas individuales (naringina, neohesperidina y hesperidina) y las dos AHLs principales producidas por *Y. enterocolitica* (C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL) descritas en el capítulo 3, **apartado 3.1**. La solución stock de extracto se preparó disolviendo 0,1 g del extracto en 50 mL de agua (2 mg/mL). Las soluciones stock de las flavanonas se disolvieron en DMSO a una concentración de 160 mg/mL. Las soluciones de AHLs se disolvieron en agua a una concentración 20 mM.

2.2. – Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y crecimiento.

Para el desarrollo de los trabajos relacionados con las propiedades anti-QS se utilizaron esencialmente dos líneas de células procariontas: *Yersinia enterocolitica* y *Chromobacterium violaceum*. Ambas líneas están descritas en el en el **apartado 3.2.5** del capítulo de Materiales y Métodos. Las condiciones de cultivo y el análisis del crecimiento bacteriano están descritos en capítulo 3 (**apartados 3.2.5.1, 3.2.5.2 y 3.2.5.4**).

2.3. – Ensayo con *Chromobacterium violaceum*.

Como ensayo preliminar para determinar la actividad anti-QS del extracto de naranja y de sus principales flavanonas (naringina, neohesperidina y hesperidina), se estudió su capacidad para reducir la producción de la violaceína en *C. violaceum*

(Truchado *et al.*, 2009b) (capítulo 3, apartado 3.2.5.5). Las concentraciones de extracto de naranja y de sus principales flavanonas utilizadas fueron 100, 200 y 400 µg/mL. El ensayo se realizó n = 3 veces (2 réplicas por ensayo).

2.4. – Análisis de las AHLs producidas por *Y. enterocolitica* mediante HPLC-MS/MS.

Para determinar el efecto inhibitorio específico del extracto de naranja (200 µg/µL), de sus principales flavanonas individuales (200 µg/µL) y de una mezcla de naringina y neohesperidina (49 µg/mL y 22,8 µg/mL, respectivamente) sobre la producción de AHLs en *Y. enterocolitica*, se incubó la bacteria con estos compuestos a 30 °C durante 48 h y se midieron los niveles de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL en el medio de cultivo en comparación con medios control (bacterias no tratadas). El proceso de extracción y análisis de las AHLs ha sido descrito en el capítulo 3 (apartado 3.2.5.8).

Además, se investigó la posibilidad de interacción entre el extracto de naranja o las flavanonas y las AHLs (en ausencia de bacterias) que pudiese causar una disminución en la concentración de las lactonas no mediada por efecto sobre las bacterias sino por interacción química entre los compuestos. Se utilizó igualmente el análisis por HPLC-MS/MS (apartado 3.5.3.1) (Morin *et al.*, 2003; Truchado *et al.*, 2009a) para medir los niveles de las lactonas al inicio y final de la incubación. Se compararon concentraciones conocidas de C6-HSL y de 3-oxo-C6-HSL (50 nM, 10 ng/mL) en medio de cultivo en presencia y ausencia de: i) extracto de naranja a una concentración de 200 µg/mL (49 µg/mL, 84,5 µM de naringina; 22,8 µg/mL, 37,0 µM de neohesperidina; 3,4 µg/mL, 5,6 µM de hesperidina) o ii) flavanonas individuales (a la concentración equivalente a la del extracto) en ausencia de la bacteria. Los ensayos se realizaron n = 3 veces con 2 réplicas por ensayo.

2.5. – Formación de biopelículas.

Los efectos del extracto de naranja y de las flavanonas individuales sobre la formación de biopelículas por *Y. enterocolitica* se evaluaron utilizando el ensayo de cristal violeta (Girenavar *et al.*, 2008) con modificaciones (Truchado *et al.*, 2009b) conforme se ha descrito en el capítulo 3, **apartado 3.2.5.6**. La concentración de extracto de naranja y de flavanonas individuales utilizada fue 200 µg/mL. Como controles positivos se utilizaron naringenina (95 µg/mL) y cinamaldehído (50 µg/mL) (Vikram *et al.*, 2010; Brackman *et al.*, 2011). El ensayo se realizó n = 3 veces con 2 réplicas por ensayo.

2.6. – Motilidad.

El ensayo de motilidad bacteriana se realizó siguiendo el método publicado por Atkinson *et al.* (2006a) con algunas modificaciones como se describe en el capítulo 3 (**apartado 3.2.5.7**). Las concentraciones utilizadas de extracto de naranja y sus principales flavanonas fueron 200 y 400 µg/mL. Como control positivo se utilizó cinamaldehído (50 µg/mL) (Brackman *et al.*, 2011). El ensayo se realizó n = 3 veces con 2 réplicas por ensayo.

2.7. – Extracción de ARN bacteriano.

Para el análisis de cambios en la expresión de genes asociados a la síntesis de AHLs o a la motilidad, las bacterias se cultivaron a 30 y 25 °C, respectivamente. Las concentraciones de extracto de naranja y naringina utilizadas fueron 200 y 400 µg/mL para cada uno. La extracción se realizó con un kit comercial MICROBexpress (Ambiom, Applied Biosystem, Foster City, USA) (capítulo 3, **apartado 3.4.1.2**) y se realizó a las 6, 14 y 24 h de tratamiento.

2.8. – Análisis de expresión de genes.

Se analizaron 5 genes que se expresan en *Y. enterocolitica* relacionados con la síntesis de AHLs (*yenR* y *yenI*) y con la motilidad (*flhDC*, *fliA* y *fleB*) (Atkinson *et al.*, **2006a**; Atkinson *et al.*, **2006b**, Atkinson *et al.*, **2008**). Los cebadores y las sondas se diseñaron (Custom Taqman Assay Design Tool, Applied Biosystems, ABI) de acuerdo a sus secuencias codificantes, las cuales se indican en la Tabla suplementaria del capítulo anterior. El análisis por RT-PCR ha sido descrito en el capítulo 3, **apartado 3.4.3**. El gen utilizado para normalizarlos datos fue el ARN 16S (AM286415) mediante el método de la curva estándar de cuantificación relativa (capítulo 3, **apartado 3.4.3.1.1**). El ensayo se realizó un mínimo de 4 veces ($n = 4 - 6$) con 2 réplicas por ensayo.

2.9. – Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software PASW statistics 18 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Según el test de Kolmogorov-Smirnov, nuestros datos se ajustaron a una distribución normal. Para determinar la homogeneidad de varianzas se utilizó el test de Levene, mientras que para determinar la existencia o no de diferencias significativas se usó el test de la *t* de *Student* (2 colas) y siendo el nivel de significación de $p < 0,05$ y $p < 0,01$.

3. – RESULTADOS.

3.1. – Efecto del extracto soluble de naranja rico en flavanonas y sus principales flavanonas sobre la capacidad de *Chromobacterium violaceum* para producir violaceína.

La **Tabla 8.1** muestra los efectos del extracto de naranja y de sus principales flavanonas: naringina, neohesperidina y hesperidina sobre la producción de violaceína por *C. violaceum*. El tratamiento de las bacterias con el extracto de naranja o cada una de las flavanonas individuales produjo una inhibición moderada pero significativa de la producción de violaceína a las concentraciones estudiadas (100, 200 y 400 µg/mL). No se observaron diferencias significativas en los % de inhibición de violaceína entre flavanonas y extracto de naranja, excepto para la hesperidina que exhibió una menor capacidad inhibitoria que el extracto a las concentraciones más elevadas (200 y 400 µg/mL).

Tabla 8.1. Porcentaje de inhibición en la producción de violaceína por *C. violaceum* 949 tras 24 h de tratamiento con el extracto de naranja rico y sus flavanonas mayoritarias en medio LB Broth.

Concentración (µg/mL)	% de inhibición			
	Extracto de naranja	Naringina	Neohesperidina	Hesperidina
100	12,85 ± 6,43	6,47 ± 1,83	10,50 ± 0,59	5,04 ± 4,14
200	22,79 ± 3,69	20,11 ± 8,49	13,20 ± 0,66	8,79 ± 3,83
400	29,70 ± 6,83	19,95 ± 6,43	18,95 ± 2,64	9,34 ± 9,92

Los resultados se presentan como la media aritmética ± desviación estándar (DE) (n = 3; 2 réplicas por ensayo). Todos los tratamientos fueron significativos respecto del control ($p < 0,05$).

3.2. – Determinación de los efectos del extracto de naranja y sus flavanonas sobre los niveles de AHLs producidos por *Y. enterocolitica*.

Para determinar si el extracto de naranja y/o sus principales flavanonas (naringina, neohesperidina y hesperidina) ejercían efectos anti-QS sobre *Y. enterocolitica*, se cuantificó la producción de las AHLs por la bacteria tras el

tratamiento con estos compuestos (200 µg/mL; 48 h). El análisis por HPLC-MS/MS de los sobrenadantes del cultivo bacteriano confirmó que las dos principales AHLs producidas por *Y. enterocolitica* eran 3-oxo-C6HSL y C6HSL (**Figura 8.1A**) y que el tratamiento con el extracto o las flavanonas disminuía los niveles de estas dos moléculas corroborando el efecto anti-QS observado en el ensayo con *C. violaceum* (**Figura 8.1B-E**).

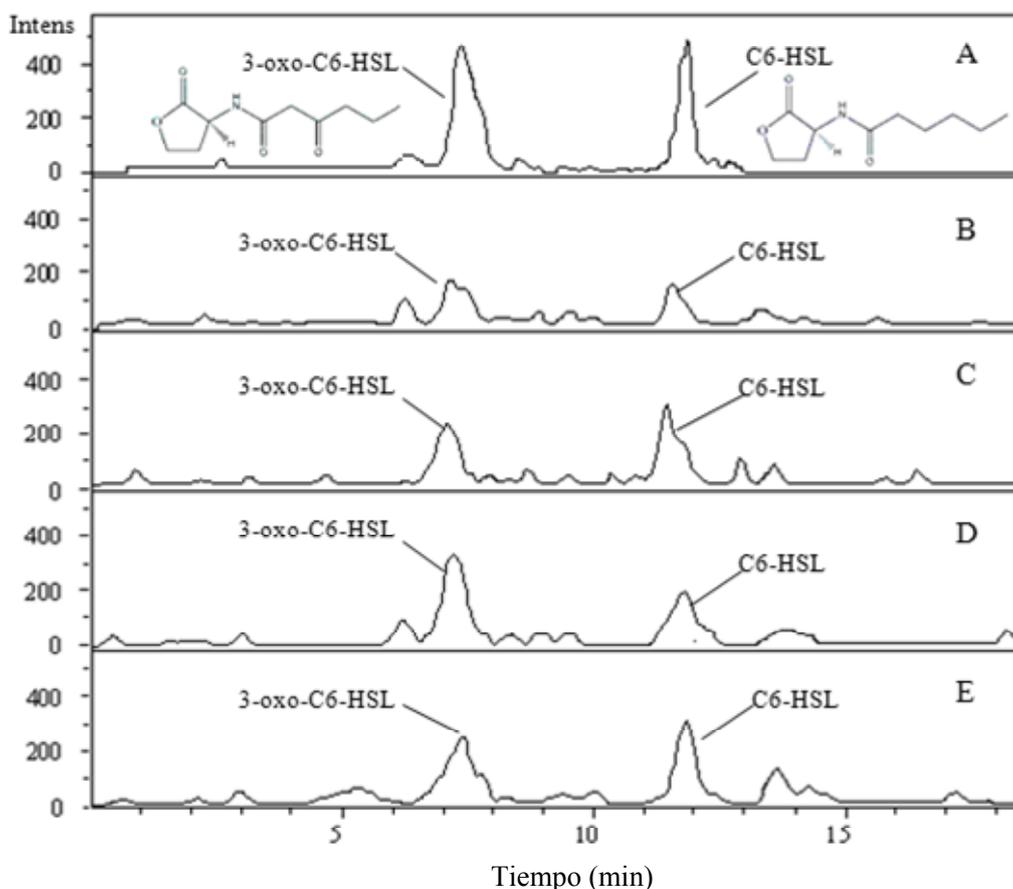


Figura 8.1. Cromatogramas HPLC-MS/MS de las AHLs 3-oxo-C6-HSL y C6-HSL analizados en el sobrenadante de los medios de cultivo de *Y. enterocolitica*. Tratamientos: (A) control; (B) extracto de naranja; (C) naringina; (D) neohesperidina; (E) hesperidina. Todos los tratamientos se realizaron a una concentración de 200µg/mL a 30 °C durante 48 h.

Los porcentajes de inhibición en la producción de AHLs respecto de las muestras control (bacterias no tratadas) se presentan en la **Figura 8.2**. A diferencia de lo observado en el ensayo de violaceína, con este análisis se observó una diferencia

significativa entre el efecto inhibitorio causado por el extracto de naranja (68,5% y 64,4% para 3-oxo-C6HSL y C6HSL, respectivamente) y el de las flavanonas individuales (porcentajes de inhibición entre 24,2% y 36,5%). El tratamiento con una mezcla de las dos flavanonas mayoritarias, naringina y neohesperidina, a las concentraciones presentes en el extracto no inhibió la producción de las AHLs (17,0% para 3-oxo-C6HSL y 20,4% para C6HSL). No podemos excluir que otros componentes del extracto podrían contribuir al efecto inhibitorio observado.

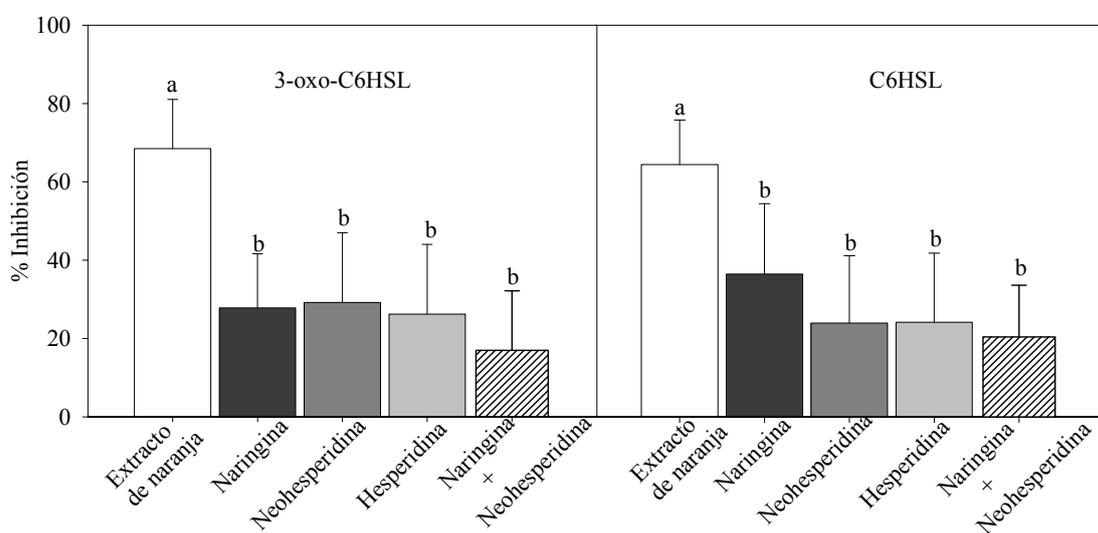


Figura 8.2. Porcentaje de inhibición de la producción de 3-oxo-C6-HSL y C6-HSL en *Y. enterocolitica* crecida en medio LB broth suplementado con el extracto de naranja, naringina, neohesperidina, hesperidina o la mezcla de naringina y neohesperidina. Los porcentajes de inhibición respecto de la cantidad de AHLs presentes en los cultivos control (bacterias no tratadas) se representan como la media aritmética \pm DE (barras de error) de 3 ensayos independientes ($n = 3$; 2 réplicas por experimento). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Todos los valores fueron significativos respecto a los controles.

Para descartar que la disminución observada en los niveles de AHLs pudiese ser debida a una degradación y/o transformación de las AHLs por interacción directa con el extracto de naranja o las flavanonas (y no por efecto sobre la bacteria), se incubaron concentraciones conocidas de cada una de las lactonas en medio LB no inoculado con la bacteria, en ausencia o presencia del extracto o las flavanonas. Nuestros resultados revelaron que tanto extracto de naranja como sus principales flavanonas exhibían cierta

capacidad para disminuir los niveles de 3-oxo-C6HSL y C6HSL en ausencia de *Y. enterocolitica* indicando cierta reactividad de naturaleza química (entre 2 – 10% de la inhibición observada en presencia de la bacteria). Estos resultados indican que la actividad anti-*QS* causada por el extracto de naranja y las flavanonas frente a *Y. enterocolitica* podría deberse, al menos en parte, a una interferencia con la producción de las AHLs por parte de la bacteria, aunque no se puede descartar que otros procesos contribuyan a la disminución observada.

3.3. – Efecto del extracto de naranja y de la naringina sobre el crecimiento de *Y. enterocolitica*.

Para descartar que los efectos anti-*QS* observados fuesen consecuencia de un proceso inhibitorio en el crecimiento de *Y. enterocolitica*, se realizó una cinética de crecimiento de la bacteria en presencia de extracto de naranja y de su flavanona mayoritaria, naringina. En los resultados obtenidos (**Tabla 8.2**) no se detectaron cambios significativos en el crecimiento específico máximo (μ_{max}) a las 3 concentraciones estudiadas. Además, no hubo diferencias significativas en los valores máximos de absorbancia alcanzados en la fase estacionaria ($A_{m\acute{a}x}$) de la bacteria crecida en presencia de extracto de naranja respecto del control (ausencia de compuestos). De igual manera, tampoco se observaron cambios durante la fase de adaptación (λ) en presencia del extracto de naranja o la naringina.

Tabla 8.2. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Y. enterocolitica* a 30 °C en ausencia de compuestos (control) y en presencia de extracto de naranja o naringina.

Velocidad de crecimiento específica máxima (h ⁻¹)				
	A _{máx}	μ _{max}	λ (h)	R ²
Control	0,30 ± 0,04	0,02 ± 0,02	12,08 ± 2,67	0,99
Extracto de naranja				
100 μg/mL	0,33 ± 0,06	0,02 ± 0,01	12,20 ± 2,41	0,98
200 μg/mL	0,34 ± 0,07	0,02 ± 0,00	11,27 ± 4,08	0,98
400 μg/mL	0,29 ± 0,04	0,02 ± 0,00	14,29 ± 0,27	1,00
Naringina				
100 μg/mL	0,36 ± 0,02	0,02 ± 0,01	10,16 ± 0,47	0,98
200 μg/mL	0,36 ± 0,00	0,02 ± 0,01	11,69 ± 2,37	0,99
400 μg/mL	0,32 ± 0,04	0,02 ± 0,01	11,82 ± 2,15	0,98

Los valores se presentan como media aritmética ± DE de 3 experimentos independientes (n = 3) Abreviaturas: A_{máx}: valor máximo de absorbancia alcanzado en fase estacionaria; μ_{max}: crecimiento específico máximo; λ: fase de adaptación; R²: coeficiente de correlación.

Estos resultados indican que la velocidad de crecimiento de *Y. enterocolitica* no se vio afectada por los tratamientos con el extracto o naringina a las concentraciones estudiadas y, por lo tanto, la disminución de la concentración de AHLs no parece ser consecuencia de un efecto bactericida o bacteriostático. Basándonos en estos resultados, decidimos seleccionar la concentración de 200 μg/mL para el resto de los ensayos.

3.4. – Efecto del extracto de naranja sobre la expresión de *yenI* y *yenR*.

Para determinar si la disminución observada en los niveles de AHLs estaba asociada a un cambio en la expresión de genes relacionados con su síntesis, se comparó la expresión de *yenI* y *yenR* (genes específicos implicados en la síntesis de AHLs) antes y después de la exposición al extracto de naranja (200 μg/mL) durante 6, 14 y 24 h (**Figura 8.3**). En el capítulo anterior se estableció que el rango normal de expresión de estos genes en ausencia de tratamiento ('variabilidad intrínseca en la expresión' o 'ruido de expresión') varía entre 0,7 y 1,3 por lo que solo los valores que se encontraron fuera de este rango (indicados mediante líneas discontinuas) se consideraron indicativos de cambio en la expresión por los diferentes tratamientos.

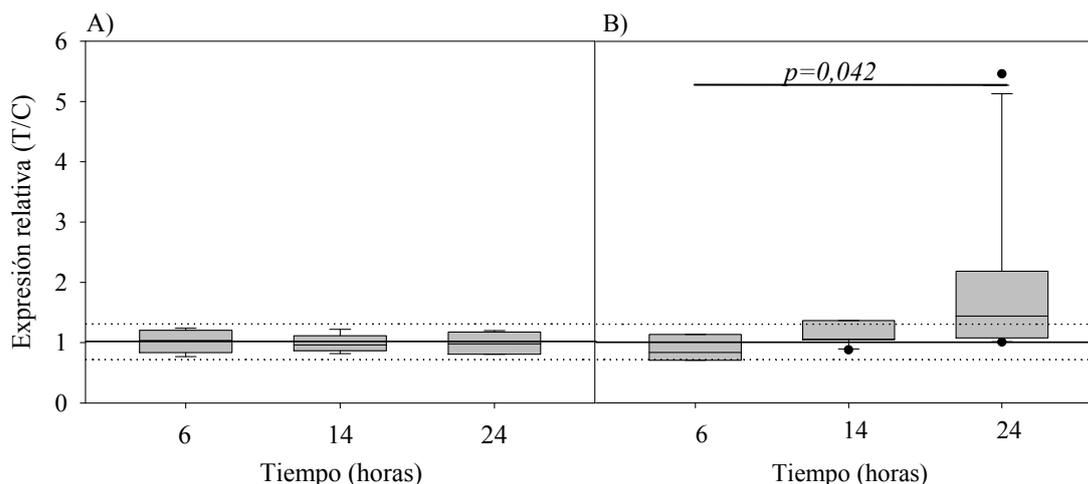


Figura 8.3. Expresión diferencial de *yenI* (A) y *yenR* (B) en *Y. enterocolitica* tras el tratamiento con extracto de naranja (200 µg/mL) durante el crecimiento bacteriano (6, 14 y 24 h) a 30 °C. Los cambios relativos en la expresión génica en las células tratadas (tratados/control; T/C) se determinaron frente a las células control a los mismos tiempos de análisis. Las líneas de puntos indican la variabilidad intrínseca de expresión de los genes estudiados (0,7 corresponde al valor mínimo y 1,3 al valor máximo). Los datos se expresan como la media aritmética ± DE (barras de error) de un mínimo de 4 ensayos independientes (n = 4 – 6; 3 réplicas por ensayo). Se indican las diferencias significativas entre los distintos tiempos ($p < 0,05$).

Los análisis por RT-PCR indicaron que la expresión de *yenI* no se modificó tras el tratamiento de las bacterias con el extracto. Sin embargo, en el caso de *yenR*, se detectó una inducción por el tratamiento con el extracto de naranja más significativamente a las 24 h (expresión relativa tratados/control: $1,8 \pm 1,4$) (**Figura 8.3**).

3.5. – Inhibición de la formación de biopelículas en *Y. enterocolitica* por el extracto de naranja y sus principales flavanonas.

El efecto del extracto de naranja y sus principales flavanonas sobre la formación de biopelículas por *Y. enterocolitica* se evaluó a la concentración de 200 µg/mL (**Figura 8.4**).

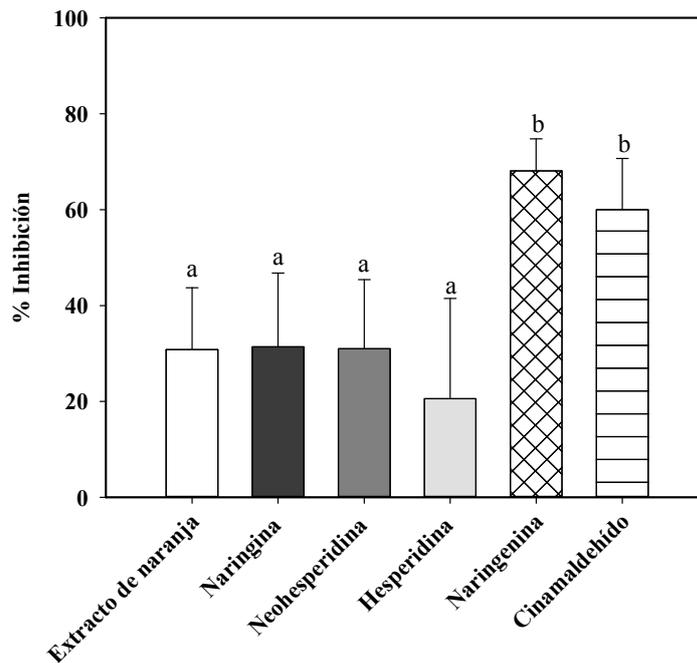


Figura 8.4. Porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas en *Y. enterocolitica* tratada con el extracto de naranja, naringina, neohesperidina o hesperidina durante 24 h. Se incluyeron naringenina (95 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cinamaldehído (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como controles positivos de inhibición de la formación de biopelículas. El porcentaje de inhibición respecto del control se representa como la media aritmética \pm DE (barras de error) de 3 experimentos independientes ($n = 3$; 2 réplicas por ensayo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Todos los tratamientos fueron significativos respecto del grupo control.

Tanto el extracto de naranja como las flavanonas, a la concentración estudiada, inhibieron la formación de biopelículas por *Y. enterocolitica* entre un 20 – 30%, no observándose diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Los controles positivos, naringenina (95 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cinamaldehído (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) también inhibieron la formación de biopelículas en un $68,1 \pm 6,7\%$ y un $60,0 \pm 10,7\%$, respectivamente. La adición de lactonas al medio, 3-oxo-C6HSL y C6HSL (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), no revertió la inhibición inducida por naringina, naringenina o cinamaldehído.

3.6. – Inhibición de la motilidad en *Y. enterocolitica* por el extracto de naranja y naringina.

El estudio del efecto del extracto de naranja y de naringina, neohesperidina y neohesperidina (200 y 400 $\mu\text{g/mL}$) sobre la motilidad tipo natación y tipo enjambre en *Y. enterocolitica* a 25 °C reveló que ningún tratamiento modificó la motilidad tipo enjambre y que solo naringina, a la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$, inhibió de forma significativa la motilidad tipo natación ($46,0 \pm 10\%$; **Figura 8.5**). El control positivo cinamaldehído confirmó la bondad del ensayo al inhibir significativamente la motilidad por natación ($59,0 \pm 11,5\%$).

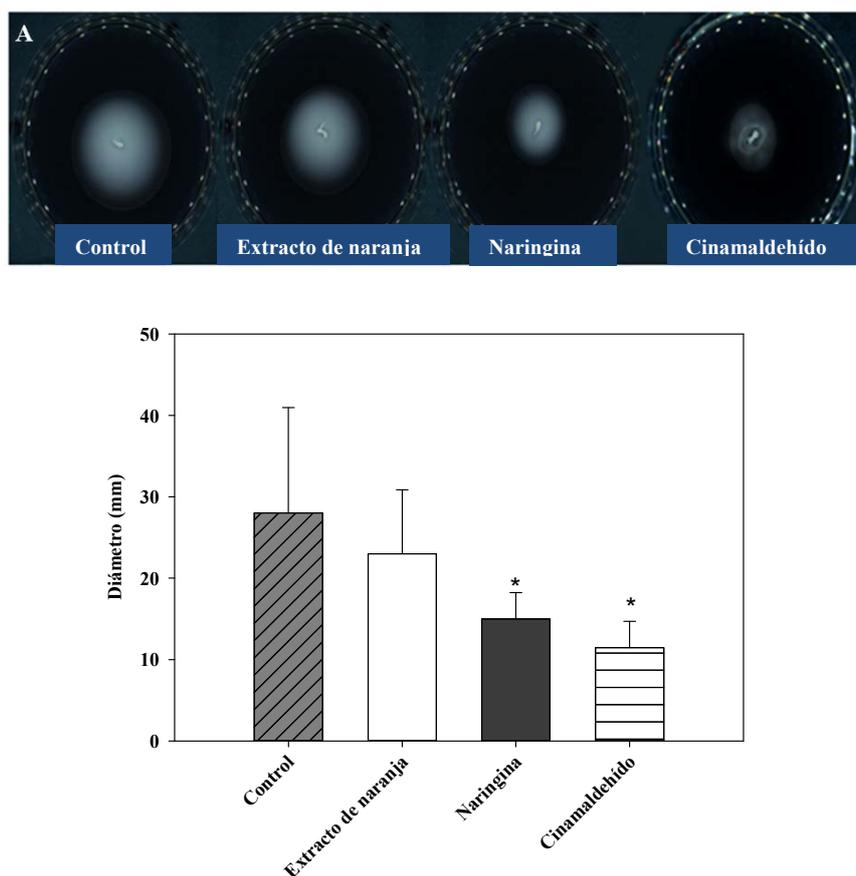


Figura 8.5. Motilidad tipo natación en *Y. enterocolitica* crecida a 25 °C en placas de agar al 0,3% (el inóculo se depositó en el centro de la placa). La motilidad se determinó midiendo el diámetro (mm) recorrido por las bacterias en placas control (no tratadas) y placas tratadas con el extracto de naranja y la naringina a 400 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h. Como control positivo de inhibición de la migración se utilizó cinamaldehído (50 $\mu\text{g/mL}$). Los valores se representan como la media aritmética \pm DE (barras de error) de un mínimo de 4 ensayos independientes ($n = 4 - 6$; 3 réplicas por ensayo). *Indican diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

La adición de 3-oxo-C6HSL y C6HSL (20 µg/mL) no revertió, sin embargo, la inhibición inducida por naringina, naringenina o cinamaldehído.

3.7. – Efecto del extracto de naranja y la naringina sobre la expresión de *flhDC*, *fliA* y *fleB*.

Otro de los objetivos de este estudio fue determinar si el extracto de naranja o la naringina afectaban a la expresión de genes clave en la regulación de la cascada flagelar: *flhDC*, *fliA* y *fleB*. Inicialmente, se investigó la expresión de estos genes en cultivos control, a 25 °C y a 3 tiempos de la curva de crecimiento 6 h (fase de adaptación), 14 h (fase exponencial) y 24 h (fase estacionaria) (**Figura 8.6**). Los resultados indican que los niveles de ARNm de estos 3 genes se inducían ligeramente a las 14 y 24 h de crecimiento respecto de las 6 h.

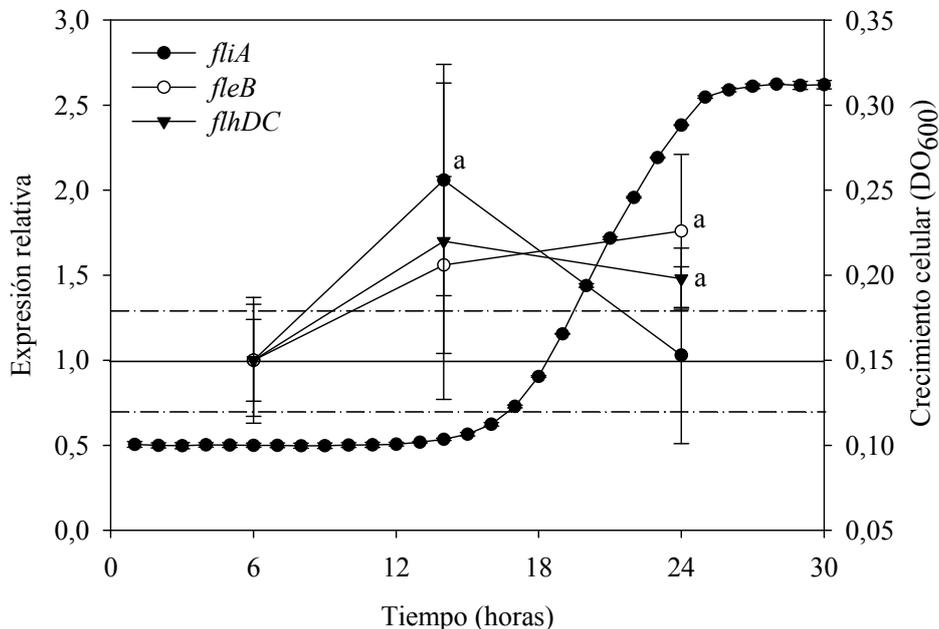


Figura 8.6. Niveles de expresión génica relativa en *Y. enterocolitica* de *flhDC*, *fliA* y *fleB* a 25 °C en función del crecimiento celular. Las líneas discontinuas indican la variabilidad intrínseca de expresión de los genes estudiados (0,7 - 1,3). Los valores se representan como la media aritmética ± DE (barras de error) de un mínimo de 4 experimentos independientes (n = 4 - 6; 3 réplicas por ensayo). Letras diferentes indican diferencias significativas respecto de la expresión a las 6 h (p < 0,01). La curva de crecimiento se representa como la absorbancia a 600 nm frente al tiempo y los valores se expresan como la media aritmética ± DE de 4 réplicas independientes (n = 4).

En la **Figura 8.7** se indican los cambios que se producen en los 3 genes relacionados con motilidad tras el tratamiento con el extracto de naranja o naringina.

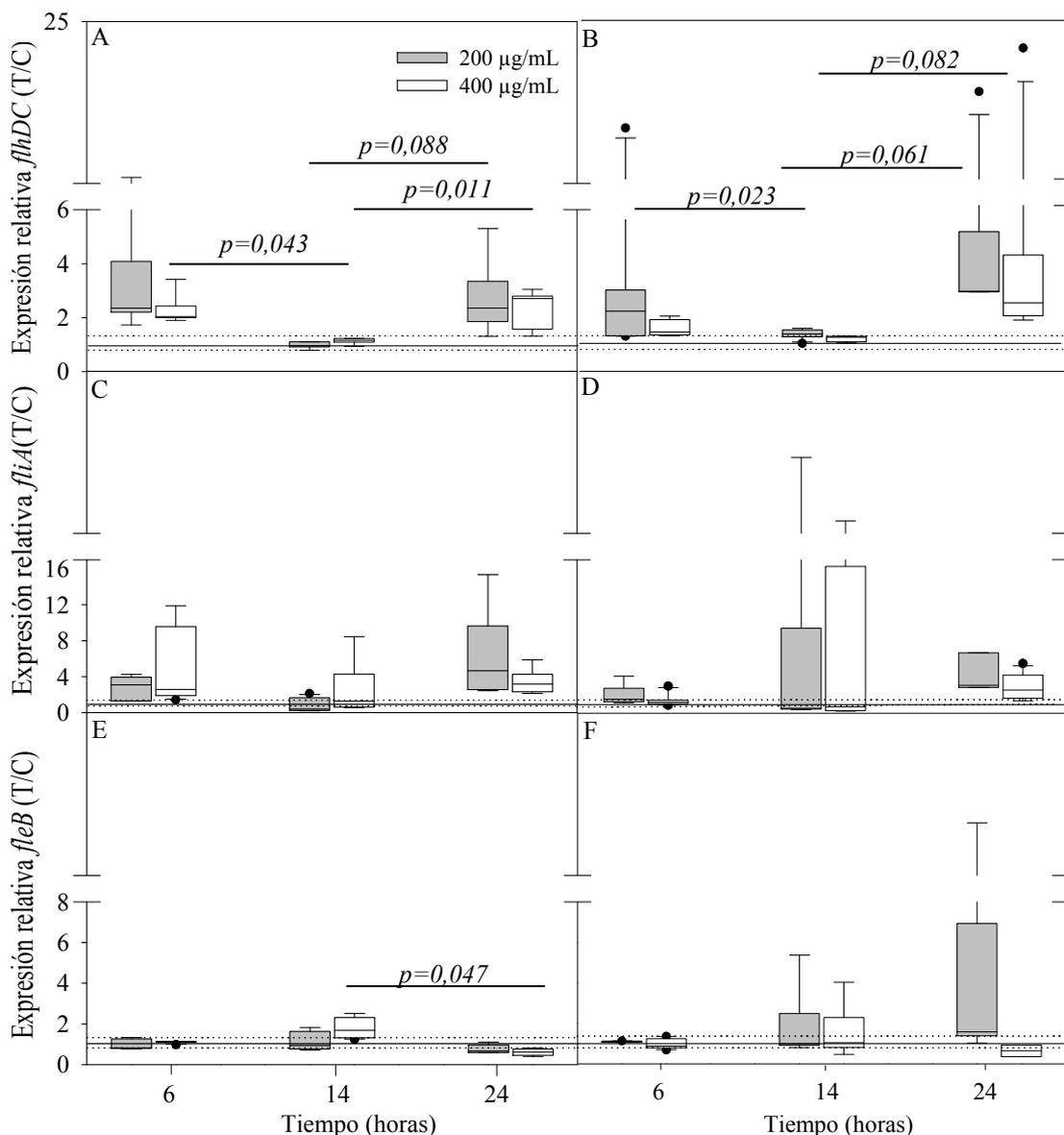


Figura 8.7. Expresión diferencial de *flhDC*, *fleB* y *fliA* en *Y. enterocolitica* a 6, 14 y 24 h de crecimiento a 25 °C en presencia del extracto de naranja (200 y 400 µg/mL) (A, C y E) o de naringina (200 y 400 µg/mL) (B, D y F). Las líneas discontinuas indican la variabilidad intrínseca de expresión de los genes estudiados (0,7 – 1,3). Los datos se representan como la media aritmética ± DE (barras de error) de un mínimo de 4 experimentos independientes (n = 4 – 6; 3 réplicas por ensayo). Se indican las diferencias significativas ($p < 0,1$ y $p < 0,05$) entre tiempos.

Los análisis por RT-PCR revelaron que los niveles de transcripción de *flhDC* resultaron más elevados tras el tratamiento con el extractos de naranja (200 y 400 µg/mL) durante 6 h (T/C: $3,8 \pm 2,9$ y $2,4 \pm 0,7$, respectivamente) y 24 h ($2,7 \pm 1,5$ y $2,3$

$\pm 0,7$, respectivamente), mientras que a 14 h el nivel de expresión de este gen se encontraba dentro de los niveles de variabilidad intrínseca (0,7 – 1,3) (**Figura 8.7A**). El tratamiento con naringina tuvo unos efectos similares, causando inducción significativa en la expresión de este gen a las 6 h ($3,4 \pm 0,6$ y $1,5 \pm 1,2$) y a las 24 h ($2,1 \pm 0,8$ y $1,5 \pm 1,0$) tanto a 200 como a 400 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (**Figura 8.7B**).

No se detectaron cambios significativos en la expresión del gen *fliA* aunque los niveles de expresión de este gen se mantuvieron por encima del límite de variabilidad intrínseca en los tres tiempos examinados, lo que sugiere que el gen se sobre-expresa tras el tratamiento con extracto o naringina (**Figura 8C,D**). El gen *fleB* se indujo ligeramente (aunque no significativamente) tras 14 h de tratamiento con el extracto ($1,7 \pm 0,5$ a 400 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 8E**) o naringina ($1,9 \pm 1,9$ y $1,6 \pm 1,4$ a 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (**Figura 8F**). El extracto de naranja disminuyó la expresión de *fleB* a las 24 h ($0,6 \pm 0,1$; $p < 0,05$) a la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$.

4. - DISCUSIÓN

Los Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades han descrito que aproximadamente el 60% del total de las infecciones que se producen en los países desarrollados están provocadas por biopelículas (comunidades bacterianas que se instalan y proliferan sobre superficies y se cubren de una matriz de exopolímero). Una elevada proporción de infecciones crónicas, normalmente intratables, se asocian con la formación de biopelículas que presentan una elevada resistencia a los antibióticos (Lazar, 2011). En este contexto, la búsqueda de productos naturales que atenúen la patogenicidad bacteriana sin alterar el crecimiento bacteriano ha adquirido un gran interés. Numerosos estudios publicados en los últimos años han descrito la capacidad de ciertas frutas, extractos vegetales y de algunos de sus componentes fenólicos para

inhibir la síntesis de moléculas autoinducidas de *QS* y/o atenuar procesos asociados a *QS* como la motilidad bacteriana, la formación de biopelículas o la secreción de factores de virulencia (Vattem *et al.*, 2007; Girenavar *et al.*, 2008; Truchado *et al.*, 2009; Vikram *et al.*, 2010a; Vikram *et al.*, 2010b; Vandeputte *et al.*, 2010; Vikram *et al.*, 2011; Vandeputte *et al.*, 2011; Chong *et al.*, 2011; Giménez-Bastida *et al.*, 2011; Truchado *et al.*, 2012).

Recientemente, se han descrito las propiedades anti-*QS* frente a *E. coli*, *V. Harveyi* y *P. aeruginosa* de ciertos flavanoides abundantes en cítricos destacando la forma no glicosilada (aglicona) de naringina, naringenina como un inhibidor eficiente de *QS* (Vikram *et al.*, 2010a; Vandeputte *et al.*, 2011). En cítricos como la naranja o en productos derivados, las flavanonas se encuentran principalmente como derivados *O*-glicosilados como la hesperidina y la naringina (Tomás-Barberán *et al.*, 2000) y no como agliconas. En este capítulo hemos investigado la capacidad anti-*QS* frente a *Y. enterocolitica* de un extracto soluble de naranja (rico en flavanonas glicosiladas) y de sus principales componentes: naringina, neohesperidina y hesperidina. Nuestros resultados indican que el extracto de naranja es capaz de reducir los niveles de AHLs producidas por la bacteria y de inhibir su capacidad para formar biopelículas. Además, la naringina fue la única molécula testada capaz de inhibir la motilidad por natación de esta bacteria.

En este trabajo hemos tratado *Y. enterocolitica* con extracto de naranja rico en flavanonas o con cada una de las flavanonas a una concentración de aproximadamente 200 µg/mL (equivalente a ~320 – 350 µM de flavanonas). Estas bajas concentraciones son susceptibles de encontrarse en el intestino incluso horas después de haber sido ingeridos, como se ha descrito en el **capítulo 6** de la presente Tesis Doctoral. A esta concentración, tanto el extracto como las flavanonas individuales inhibieron de forma

moderada (20 – 30%) la formación de biopelículas por *Y. enterocolitica*. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos sobre flavonoides naturales y compuestos fenólicos de cítricos. Según Vikram *et al.* (2010a) naringina, neohesperidina y hesperidina (a concentraciones de 100 µg/mL) inhiben la formación de biopelículas por *E. coli* (~50%, ~40% y ~5%, respectivamente). Los mismos autores (Vikram *et al.*, 2010b) han indicado que los limonoides presentes en cítricos a concentraciones similares (100 µg/mL) también inhiben la formación de biopelículas en *E. coli* (~20 – 35%). La catequina, a concentraciones 10 veces superiores (1000 µg/mL), llega a inhibir hasta un 45% la formación de biopelículas por *P. aeruginosa* (Chong *et al.*, 2011). En general, la efectividad anti-*QS* de los compuestos fenólicos parece variar en función de la concentración utilizada y/o de la especie bacteriana tratada. Nuestros resultados muestran que naringina inhibe la formación de biopelículas, la motilidad por natación y la producción de AHLs en *Y. enterocolitica*, sin embargo, este compuesto no inhibe los factores de virulencia mediados por el proceso de *QS* en *P. aeruginosa* (PAO1) (Vandeputte *et al.*, 2011). Naringenina que es capaz de inhibir la formación de biopelículas en *E. coli* y *V. harveyi* (~70 – 90% a una concentración de 100 µg/mL) (Vikram *et al.*, 2010a) no solo no resulta efectiva frente a *Salmonella typhimurium* en un rango de concentraciones entre 1,56 – 100 µg/mL sino que a concentraciones más altas (200 µg/mL) llega a causar el efecto opuesto, inducción de la formación de biopelículas por esta bacteria (Vikram *et al.*, 2011). Nuestros resultados junto con otros trabajos previamente publicados identifican las flavanonas como agentes naturales presentes en la dieta con efectos moduladores sobre los mecanismos *QS* en bacterias. Este efecto varía, sin embargo, dependiendo del tipo de bacteria y de la concentración utilizada.

A pesar de que los efectos inhibitorios observados (20 – 40%) pueden parecer moderados cuando se comparan con compuestos más efectivos que alcanzan valores de hasta el 90% (Kim *et al.*, 2008), debe tenerse en cuenta que establecer si un efecto determinado es significativo desde un punto de vista biológico no es una cuestión simple de resolver. Va a depender en buena parte de los efectos biológicos específicos estudiados. Por ejemplo, desde el punto de vista de las infecciones intestinales por bacterias patógenas como *Y. enterocolitica*, los efectos beneficiosos de pequeñas dosis de determinados componentes de la dieta podrían ser relevantes a largo plazo. En relación con la bioactividad de los compuestos fenólicos de la dieta y/o de sus derivados metabólicos se ha observado que, en general, estas moléculas, a las dosis relativamente pequeñas a las que se ingieren con la dieta, tienen efectos moderados o leves sobre células, tejidos y animales frente a los efectos que genera la ingestión de otros compuestos xenobióticos o fármacos a dosis por lo general más elevadas (Azorín-Ortuño *et al.*, 2011). Nuestros resultados sugieren que el consumo frecuente de un extracto de naranja rico en flavanonas o de flavanonas en cantidades que proporcionen concentraciones intestinales en el rango μM podría ejercer efectos reguladores de los mecanismos *QS* en las bacterias del intestino.

Puesto que tanto el extracto de naranja como las principales flavanonas presentes en el extracto interfieren con el sistema *QS* en *Y. enterocolitica*, a continuación nos planteamos la hipótesis de que esta interferencia se tradujese en cambios a nivel molecular, cambios en los niveles de expresión de genes implicados en *QS*. Primero investigamos el efecto del extracto de naranja sobre los niveles de expresión de los genes *yenI* y *yenR*, que están directamente involucrados en la regulación y síntesis de AHLs por *Y. enterocolitica* (Atkinson *et al.*, 2006a; Atkinson *et al.*, 2008). Es importante destacar que la expresión de estos genes exhibía una alta variabilidad

(‘ruido’) debida tanto a fluctuaciones naturales en la síntesis y degradación de ARNm (ruido intrínseco) y a fluctuaciones causadas por factores externos (ruido extrínseco) (Dong *et al.*, 2011). Otros estudios también han indicado una alta variabilidad en la expresión de genes relacionados con *QS* en bacterias tratadas con flavonoides con coeficientes de variación de hasta un 48% (Vandeputte *et al.*, 2011). En cultivos de bacterias llevados a cabo en frascos con agitación (como es el caso de nuestros ensayos), el perfil de expresión proteica presenta una mayor variabilidad que aquellas cultivadas en condiciones más controladas, como reactores y quimiostatos (Elias *et al.*, 2008). Para eliminar, al menos en parte, esta variabilidad ya en el capítulo anterior establecimos unos márgenes de expresión, 0,7 – 1,3, que se consideraron como “ruido intrínseco” o “variabilidad intrínseca” (datos determinados midiendo la expresión sólo en bacterias control no tratadas).

En general, los resultados publicados en la literatura sobre los efectos de compuestos fenólicos sobre la expresión de genes asociados a *QS* son escasos e incompletos. En algunos de los pocos ejemplos existentes se han asociado los efectos inhibitorios de *QS* con la reducción en la expresión de genes implicados. Tal es el caso de la catequina o la naringenina cuyos efectos anti-*QS* se han vinculado a una disminución de los genes relacionados con la síntesis y regulación de las moléculas autoinductoras de *QS*, las AHLs (Vandeputte *et al.*, 2010; Vandeputte *et al.*, 2011). Sin embargo, mirando estos datos más de cerca, se observa una clara dependencia entre la regulación de la expresión génica y el tiempo. Los resultados están enormemente influenciados por el momento en el que se realiza la medida de expresión. De hecho, medidas realizadas con tan solo 2 h de diferencia exhiben grandes diferencias en la expresión génica (Vikram *et al.*, 2010). En el caso mencionado de catequina y naringenina, la disminución en la expresión de los genes *lasI* (síntesis) y *lasR*

(regulación) en *P. aeruginosa* se midió a las 8 y 18 h de la curva de crecimiento (Vandeputte *et al.*, 2011). A diferencia de estos datos, en nuestro estudio detectamos una inducción significativa en la expresión del gen *yenR* (regulación) tras 24 h de tratamiento con el extracto de naranja (**Figura 8.3**). Más de acuerdo con esta observación, en el capítulo anterior también describimos como Uro-B (uno de los metabolitos derivados de ETs) inhibía la producción de AHLs en *Y. enterocolitica* al tiempo que inducía los niveles de ARNm de *yenR* a las 24 h de tratamiento. Aunque no tenemos una explicación para este comportamiento del gen, no podemos descartar que se haya producido una disminución en la expresión de *yenR* debido al tratamiento con el extracto de naranja o Uro-B en una etapa más temprana de la curva de crecimiento (no examinada en nuestro trabajo) y que la sobre-expresión que observamos a las 24 h sea una respuesta para contrarrestar la posible disminución inicial.

Al igual que en el capítulo anterior, en este capítulo también investigamos los efectos del extracto de naranja o de naringina sobre la expresión de los genes *flhDC*, *fliA* y *fleB*. Estos genes forman parte de una organización jerárquica involucrada en la regulación de la transcripción de los genes flagelares (cascada o regulón flagelar) en *Y. enterocolitica* y están implicados en los procesos de motilidad bacteriana y formación de biopelículas (Atkinson *et al.*, 2006). FlhDC es el regulador principal del regulón flagelar y está codificado por el operón *flhDC*, que se encuentra en la parte más alta de la cascada jerárquica afectando a la expresión de otros genes flagelares como *fliA* y *fleB* (Atkinson *et al.*, 2008). Los niveles más altos de expresión de *flhDC* en *Y. enterocolitica* se observan a 25 °C. Estos niveles se reducen a temperaturas superiores (Elias *et al.*, 2008). También, a temperaturas por debajo de 30 °C se induce la expresión coordinada de los genes flagelina *fliA* y *fleB*. De acuerdo con esta información y con otros estudios previos con diseños experimentales similares (Atkinson *et al.*, 2006a),

examinamos la expresión de estos tres genes en cultivos de *Y. enterocolitica* a 25 °C. Nuestros resultados indican que en bacterias crecidas a 25 °C en presencia del extracto de naranja se produjo un aumento de los niveles de transcripción de *flhDC* dependiente del tiempo, y una inducción de la expresión de *fliA* a los 3 tiempos examinados. Se detectaron también algunos cambios pequeños en los niveles de expresión de *fleB* (gen flagelina de clase III). Se desconoce por ahora el impacto de los moduladores transcripcionales de *flhDC* en *Y. enterocolitica* sobre la regulación de los genes flagelares. Se han propuesto diversos mecanismos que podrían regular la transcripción de *flhDC* en respuesta a factores ambientales. Recientemente, se ha descrito que OmpR, un factor de transcripción pleiotrópico que responde frente a señales ambientales, activa la expresión de *flhDC* en *Y. enterocolitica* (Raczkowska *et al.*, 2011). FlhDC afecta no solo a la expresión de genes flagelares sino que, al parecer, también está implicado en la regulación de genes relacionados con el metabolismo. Las condiciones nutricionales parecen modular la expresión del regulón flagelar, y así se ha visto que los ácidos grasos de cadena corta (compuestos derivados de la dieta) en el medio de cultivo inducen la expresión de *flhDC* en *Y. enterocolitica* (Tobe *et al.*, 2011). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que en presencia del extracto de naranja o de naringina en el medio de cultivo, el regulador OmpR podría activar la transcripción de *flhDC*. Se necesitan aún muchas más investigaciones para descifrar el papel del regulador OmpR en la regulación de la transcripción de *flhDC* en *Y. enterocolitica* en respuesta a señales ambientales como puede ser, por ejemplo, el tratamiento de bacterias con compuestos naturales con propiedades anti-QS.

Los resultados de este trabajo muestran que un extracto de naranja natural rico en flavanonas (principalmente naringina, neohesperidina y hesperidina), a dosis que pueden alcanzarse en el intestino a través de la dieta, exhiben una actividad

antipatogénica moderada reduciendo la producción de AHLs y la formación de biopelículas en *Y. enterocolitica*. Estas respuestas se asocian a la inducción de la expresión de dos genes clave implicados en la regulación del *QS*, *flhDC* y *yenR*. No se descarta la posibilidad de que otros genes o mecanismos como: i) la inhibición de la síntesis de lactonas a nivel de proteína, ii) inhibición del transporte y secreción de AHLs al medio o iii) degradación enzimática de las AHLs estén implicados en las respuestas observadas. En diversas investigaciones se ha propuesto que es probable que extractos naturales complejos con propiedades anti-*QS* puedan inhibir estos procesos mediante una combinación de varios mecanismos (Vattem *et al.*, 2007). El hecho de que la adición de lactonas al medio de cultivo de bacterias tratadas con naringenina (Vandeputte *et al.*, 2011) o naringina (Vattem *et al.*, 2007) no fuese suficiente para revertir los efectos inhibitorios inducidos por estos compuestos sobre motilidad y formación de biopelículas sostiene la hipótesis de que otros mecanismos estén involucrados, entre los que se podrían encontrar la inhibición de la ruta activada tras la unión de las AHLs a sus receptores o la actuación antagonista frente a los receptores de las AHLs. Es necesario continuar los trabajos para clarificar todos los posibles mecanismos anti-*QS* de flavanonas y otros componentes naturales similares.

CAPÍTULO 9

**Estudio del consumo de un extracto de granada
en ratas sanas en un modelo de colitis ulcerosa.
Efectos de la inflamación en el metabolismo de
los compuestos fenólicos y en la producción de
ácidos grasos de cadena corta.**

Estudio del consumo de un extracto de granada en ratas sanas en un modelo de colitis ulcerosa. Efectos de la inflamación en el metabolismo de los compuestos fenólicos y en la producción de ácidos grasos de cadena corta.

RESUMEN

El consumo de granada, una fruta original de Medio Oriente, ha adquirido mucha popularidad como posible alimento funcional o fuente de nutraceuticos. El número de estudios acerca de los efectos de la granada sobre enfermedades crónicas se ha incrementado en los últimos años. La colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC) son las dos principales formas de enfermedad inflamatoria intestinal (EII), siendo la dieta un factor que podría influenciar estas enfermedades. El suplemento de la dieta con compuestos que podrían ejercer efectos anti-inflamatorios, como algunos compuestos que se encuentran en la granada, podría servir de ayuda en el tratamiento y prevención de la inflamación intestinal crónica. En este estudio se investigó el efecto del consumo de una dieta suplementada con 200 mg de extracto de granada /kg/día (el equivalente a 2 g de granada/día para una persona de 70 kg) durante 25 días, en un modelo animal de inflamación intestinal inducida por dextrán sulfato sódico (DSS). Para determinar el posible efecto anti-inflamatorio se evaluó: i) marcadores de inflamación en la mucosa del colon como los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂), el índice de actividad de la enfermedad (DAI), la actividad mieloperoxidasa (MPO) o el acortamiento del colon y ii) expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios y carcinogénicos como *c-Myc*, *β-catenina*, *Tp53* y *Ciclina D1*. Además,

se estudió la producción de metabolitos derivados del consumo del extracto de granada y de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en ratas sanas (condiciones fisiológicas normales) y con inflamación intestinal inducida. Nuestros resultados revelaron que el suplemento de la dieta con extracto de granada reguló algunos de los marcadores de inflamación estudiados, incluyendo la expresión de los genes *Tp53*, *c-Myc* y *Ciclina-D1*, así como la producción de los metabolitos microbianos derivados de la granada y SCFAs en heces.

1. - INTRODUCCIÓN.

En la actualidad, existe un incremento en la incidencia de episodios de inflamación en el colon que pueden estar provocados por infecciones bacterianas o víricas, estrés o alergia a algunos péptidos. Además, en los últimos años, han aumentado los casos de CU y de EC, enfermedades que se engloban dentro del término EII, que se caracterizan por una inflamación crónica del tracto gastrointestinal (Gentschew y Ferguson, 2012). Estas enfermedades parecen tener una etiología multifactorial interviniendo factores genéticos, ambientales (entre los que se incluye la dieta), la microbiota intestinal o el sistema inmune (Han, *et al.*, 2010; Triggs *et al.*, 2010; Ferguson, 2010). Así, la predisposición genética a padecer EII (actualmente se conocen unos 100 genes comunes a episodios de estas enfermedades), ciertos factores químicos, dietéticos o patogénicos, pueden dar lugar a una respuesta inmune inapropiada que conduzca al desarrollo de estas enfermedades.

En la actualidad se acepta la existencia de una asociación entre inflamación intestinal y el desarrollo posterior de cáncer colorrectal (Cooper *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2012). Las células cancerígenas se caracterizan por una proliferación anormal generada por mutaciones o alteración en la expresión de genes marcadores de cáncer

como *c-Myc*, *β-catenina*, *Tp53* o *Ciclina D1*, los cuales están implicados en procesos de diferenciación, proliferación y/o ciclo celular (Kellof *et al.*, 2006). En los últimos años se ha visto que la expresión de estos genes también se encuentra alterada durante los episodios de inflamación intestinal (Cooper *et al.*, 2000; Kohno *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). En este sentido, el estudio del perfil de genes que cambian su expresión durante los procesos inflamatorios, y que están implicados en la proliferación y regulación del ciclo celular, resulta una aproximación muy valiosa para investigar la respuesta celular a diversos tipos de tratamiento que pudieran prevenir el desarrollo de estas enfermedades.

Tradicionalmente, la granada se ha utilizado en la medicina como anti-helmíntico, y para curar úlceras y diarrea (Lansky y Newman, 2007). En la actualidad, la granada es un alimento que ha adquirido mucha popularidad como posible alimento funcional o fuente de nutraceuticos. El estudio del consumo de la granada, en forma de extractos o zumos, en relación a muchas enfermedades crónicas (como las inflamatorias) ha despertado mucho interés en los últimos años (Johanningsmeier y Harris, 2011). Se ha descrito que la administración de 50 mg/kg durante 28 días de extracto de cáscara de granada a ratas con fibrosis de hígado descendió los niveles de malondialdehído (MDA) y de la actividad MPO, así como la producción de TNF- α y de IL-1 β (Toklu *et al.*, 2007). Otro estudio en el que se alimentaron ratas diabéticas tratadas con angiotensina II con 100 – 300 mg de extracto de granada /kg y día durante 4 semanas, disminuyó la presión arterial media y atenuó los cambios bioquímicos inducidos por la diabetes y la angiotensina II (Mohan *et al.*, 2009). En el tracto gastrointestinal, los elagitaninos (ETs) de la granada se hidrolizan a ácido elágico (EA), el cual es metabolizado por la microbiota para formar las urolitinas (Cerdá *et al.*, 2004; Cerdá *et al.*, 2005a; Cerdá *et al.*, 2005b). Estos metabolitos son conjugados en intestino,

hígado y riñones por la acción de las enzimas de Fase II que principalmente catalizan reacciones de glucuronidación y sulfatación sobre estas moléculas. En conjunto, las urolitinas se absorben parcialmente, sufren una activa circulación enterohepática, y se distribuyen por un amplio número de órganos (Cerdá *et al.*, **2004**; Espín *et al.*, **2007b**; González-Sarrías *et al.*, **2009b**; González-Barrio *et al.*, **2011**). Estudios *in vitro* han descrito una acción antiproliferativa de las urolitinas en células de cáncer de colon Caco-2, asociada a un bloqueo del ciclo celular y a la modulación de la expresión génica incluyendo las rutas de señalización de las kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (González-Sarrías *et al.*, **2009a**). Estos compuestos también exhibieron actividad anti-inflamatoria en fibroblastos de colon, mediante el bloqueo de la activación del factor de transcripción NF- κ B (González-Sarrías *et al.*, **2010a**). En un modelo de rata de colitis inducida por DSS, se observó que el consumo de 250 mg/kg/día de extracto de granada o de 15 mg/kg/día de urolitina-A (Uro-A) mezclados con el pienso, tenía un efecto anti-inflamatorio en el colon, disminuyendo importantes marcadores de inflamación en la mucosa colónica y regulando diversos genes implicados en inflamación y desarrollo de cáncer colorrectal (Larrosa *et al.*, **2010b**). Este estudio *in vivo* demostró de forma inequívoca que Uro-A es un metabolito que puede contribuir de manera clave a la actividad anti-inflamatoria asociada al consumo de granada. Sin embargo, no se han estudiado los posibles efectos del consumo de granada sobre la mucosa del colon en condiciones fisiológicas normales que pudieran contribuir a la prevención del desarrollo de las EIIs o cáncer colorrectal.

Existen evidencias que relacionan la dieta, la modificación de la microbiota intestinal y las EII, sin embargo, esta relación no está del todo esclarecida (Gentschew y Ferguson, **2012**). La modificación de las proporciones de microorganismos en el intestino, y por lo tanto en la concentración de los componentes que producen y liberan

en el lumen, parece jugar un importante papel en el desarrollo de condiciones patológicas incluyendo EIIs o cáncer de colon (Vinolo *et al.*, **2011**). Larrosa *et al.*, (**2010b**) demostraron por primera vez el efecto prebiótico de la granada, ya que el consumo de extracto de granada y su principal metabolito Uro-A favorecían la proliferación de bifidobacterias y lactobacilos, bacterias que mediante fermentación anaeróbica producen ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). Existen estudios que han descrito la presencia de ácido butírico, propiónico, acético y valérico en el colon (Kobayashi y Sakata, **2006**), siendo el más estudiado el butírico que muestra efectos beneficiosos frente a las EIIs, e induce apoptosis en células de cáncer de colon (Scharlau *et al.*, **2009**). Además, en los últimos años, propionato y acetato han adquirido mucha importancia como compuestos anti-inflamatorios (Tedelind *et al.*, **2007**; Vinolo *et al.*, **2011**). La presencia de SCFAs en colon se ha asociado con efectos protectores frente al desarrollo de cáncer colorrectal y una mejora de la salud intestinal (Wong *et al.*, **2006**), mientras que la ausencia de estos compuestos se relaciona con la inflamación intestinal (Binder, **2010**). El estudio del posible efecto modulador del consumo de granada, en condiciones fisiológicas normales y de inflamación, sobre la producción de SCFAs en el colon podría ayudar a esclarecer su posible papel anti-inflamatorio frente a las EIIs. Debido a la importancia biológica que los SCFAs tienen sobre la salud, el desarrollo de un método analítico que permita un análisis rápido y selectivo de estos compuestos en matrices complejas como pueden ser las heces ha despertado un gran interés. Las diferentes técnicas de análisis de los SCFAs someten las muestras a pre-tratamientos (Zijlstra *et al.*, **1977**; Tangerman *et al.*, **1983**) y extracciones con disolventes orgánicos (Remesy y Demigne, **1974**; Cummings *et al.*, **1987**) que suelen necesitar mucho tiempo de preparación y pueden generar pérdida de SCFAs. Además, suele ser necesario un proceso de derivatización (Henningsson *et al.*, **2002a**;

Henningsson *et al.*, 2002b) tras la extracción para mejorar el análisis de estos compuestos (McGrath *et al.*, 1992), lo que precisa de un proceso de optimización de las condiciones de reacción. La microextracción en fase sólida asociada a GC-MS mejora el análisis de los SCFAs en muestras acuosas disminuyendo los límites de detección de los compuestos (Mills y Walker, 2000; Bianchi *et al.*, 2011). Sin embargo, este sistema tiene un elevado coste y requiere de un equipamiento muy específico. Por todo esto, el desarrollo de un proceso que disminuya el tiempo de preparación de las muestras, que sea capaz de detectar SCFAs a bajas concentraciones y reduzca costes y tiempo en la preparación y análisis de las muestras es de gran interés.

Objetivos. Con el fin de contribuir a elucidar los posibles efectos anti-inflamatorios en el intestino de extractos naturales ricos en ETs, en este capítulo nos planteamos investigar los efectos del consumo de una dieta suplementada con un extracto de granada en condiciones fisiológicas normales (ratas sanas) y compararlo con un modelo de inflamación colónica inducida por DSS. Para intentar dilucidar algunos de los posibles mecanismos mediante los cuales estos extractos podrían contribuir a proteger frente a procesos inflamatorios del intestino, en este estudio se investigó: i) el efecto del consumo de extracto de granada sobre marcadores de inflamación intestinal, ii) la expresión de genes relacionados con inflamación intestinal y proliferación y ciclo celular mediante análisis por RT-PCR, iii) la generación de metabolitos derivados de los ETs y la producción de SCFAs, ambos de origen microbiano, los cuales podrían contribuir a los efectos anti-inflamatorios. Este ensayo se llevó a cabo alimentando a las ratas con dosis equivalente en humanos (HED) de 2 g/día en una persona de 70 kg. Otro de los objetivos de este trabajo fue el desarrollo de un método de análisis alternativo que combinase una extracción utilizando un disolvente orgánico con un método analítico

(GC-MS/MS) que permitiera una identificación y cuantificación fiable de los SCFAs de muestras de heces.

2. - MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. – Materiales.

En este estudio se utilizó un extracto de granada “Nutraganate” suministrado por Nutracitrus (Elche, España). La procedencia de los metabolitos Uro-A, Uro-B, EA y los SCFAs acético (C₂), propiónico (C₃), isobutírico (i-C₄), butírico (C₄), isovalérico (i-C₅), valérico (C₅) y 4-metil-valérico está descrita en el capítulo 3, **apartado 3.1** del capítulo general de Materiales y Métodos. Los reactivos de uso general están descritos en el capítulo 3 (**apartado 3.1**). Los metabolitos se disolvieron en DMSO (solución stock 8 mM) y los SCFAs se disolvieron en acetato de etilo a una concentración stock de 20 mM.

2.2. – Animales, dieta y diseño del experimento.

Para este estudio se utilizaron ratas Fisher F344 (n = 32), las cuales presentan consanguinidad por lo que genéticamente son bastante homogéneas siendo apropiadas para estudios de expresión génica. El mantenimiento de los animales está descrito en el capítulo 3, **apartado 3.3.1**.

Preparación del pienso. Las ratas Fisher 344 se alimentaron con una dieta estándar suplementada con el extracto de granada. El pienso estándar se trituró y tamizó para posteriormente mezclarlo manualmente con el extracto disuelto previamente en agua (**Figura 9.1**).

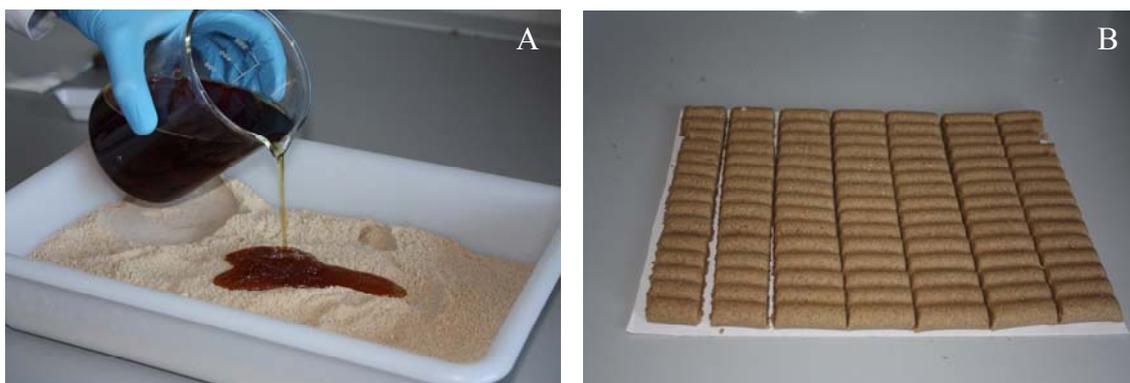


Figura 9.1. Mezcla del extracto de granada diluido en agua con el pienso estándar triturado. Una vez que se adiciona el extracto de granada al pienso (A), se mezcla bien formando una pasta que se separa en pequeñas porciones cilíndricas (B). Estas porciones se congelan, liofilizan y se guardan en oscuridad.

La cantidad de extracto de granada que se adicionó fue de 2,6 g/kg de pienso y la cantidad de agua de 1 L/kg de pienso molido. La mezcla se dividió en porciones que se liofilizaron y se almacenaron en oscuridad. La dosis ingerida por los animales fue de 0,2 g de extracto/kg peso de rata, que según la fórmula de dosis equivalente a humanos ($HED = \text{dosis animal en mg/kg} \times (\text{peso del animal en kg}/\text{peso de un humano en kg})^{0,33}$) (Reagan-Shaw *et al.*, 2008) se corresponde con la ingesta de 2 g de extracto para una persona de 70 kg.

Ensayo de inflamación intestinal. Para este estudio se utilizaron ratas macho Fisher F344 (n = 32) con un peso entre 175 y 200 g. Las ratas se distribuyeron al azar en 4 grupos de 8 ratas cada uno (cada grupo se dividió en 2 jaulas). El esquema de distribución se muestra en la **Figura 9.2**:

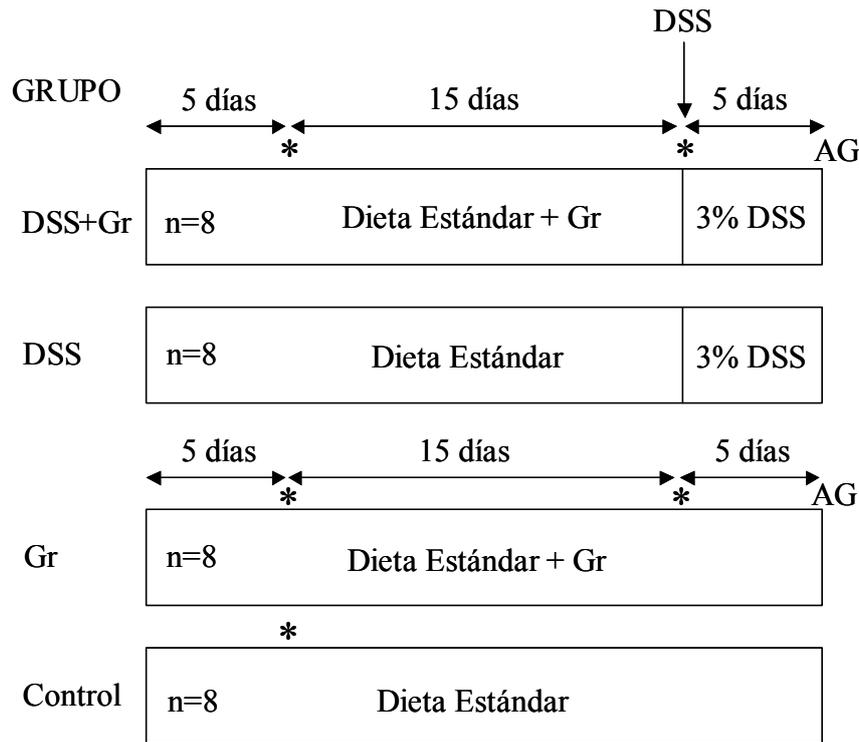


Figura 9.2. Esquema que resume la alimentación a lo largo de los días de las ratas. Los últimos 5 días de ensayo, en los grupos DSS+Gr y DSS, se introdujo DSS al 3% (p/v) en el agua de bebida junto con el consumo de la dieta estándar y la Gr. Abreviaturas: Granada (Gr); AG indica el día en el que se tomaron muestras de heces de todas las ratas para análisis de los SCFAs; *indican los días en los que las ratas se introdujeron en la jaula metabólica. Se introdujeron los grupos DSS+Gr, Gr (a los 5 y a los 20 días) y control.

Las ratas se alimentaron durante 25 días con el pienso control o el pienso con extracto de granada. A los 5 y 20 días de haber incluido el extracto de granada en la alimentación, las ratas se introdujeron en jaulas metabólicas durante 24 h y se tomaron muestras de orina para el posterior análisis de metabolitos. Durante los últimos 5 días del ensayo, se adicionó DSS (36000-50000, MP Biomedicals, Illkirch, Francia) al agua de bebida, a una concentración del 3% (p/v). El agua se consumió *ad libitum*. La ingesta de pienso y agua se midió cada dos días. Para el análisis de SCFAs, se tomaron muestras de heces el día 25 del ensayo, justo antes del sacrificio. Una vez finalizado el período de ensayo, las ratas se anestesiaron con una solución de xilacina:ketamina:salino en una proporción 2:1:3. A cada una se le suministró 0,3 mL de anestesia/200 g de peso (concentración final de ketamina 50 mg/kg y de xilacina 5

mg/kg) y se sacrificaron mediante desangrado por punción cardíaca. Se extrajo el colon, se midió, se abrió, se retiraron las heces (que se almacenaron para su posterior análisis) y se lavó completamente con tampón fosfato salino (PBS). Una vez la mucosa estaba limpia, se separó el colon proximal del distal y este último se colocó sobre una zona fría y seca, se raspó la superficie con un porta y se obtuvo la mucosa que se dividió en dos porciones que se guardaron: i) en solución *RNAlater* (Qiagen, Hilden, Alemania) que mantiene la estabilidad del tejido para la posterior extracción de ARN (**apartado 3.4.1.1.**) y ii) congelada en N₂ líquido y luego a -80 °C para el posterior análisis de marcadores de inflamación.

2.3. - Índice de actividad de la enfermedad (DAI): determinación de pérdida de peso, consistencia y pérdida de sangre en heces.

DAI es un parámetro que combina la medida de la pérdida de peso del animal, la presencia de sangre oculta en heces y su consistencia. Se basa en un sistema de puntuación promedio de los valores que se obtienen de los 3 parámetros evaluados (**Tabla 9.1**). En nuestro estudio se determinó diariamente desde la adición del DSS al agua de bebida hasta el final del ensayo.

Tabla 9.1. Puntuaciones asignadas a cada uno de los parámetros evaluados. El valor promedio de dichas puntuaciones es el DAI.

Puntuación	Pérdida peso	Consistencia heces	Sangre heces
0	Ninguna o <1%	Normal (60% - 61%)	Negativo
1	1% - 5%	Poco blanda (61% - 68%)	+1
2	5% - 10%	Blanda (69 - 72%)	+2
3	10% - 15%	Muy blanda (73% - 75%)	+3
4	>15%	Diarrea (>75%)	+4 o >

La pérdida de peso se calculó como la diferencia porcentual entre el peso inicial (*peso día 0*) y el peso en cada día del experimento (*peso día x*), según la fórmula:

$$\% \text{ peso día } x = \frac{(\text{peso día } 0 - \text{peso día } x)}{\text{peso día } 0} \times 100$$

La consistencia de las heces se determinó mediante cuantificación del porcentaje de agua que contienen. Para ello, se tararon tubos eppendorf en los que se introdujeron las heces de las ratas, se pesaron, se congelaron y se liofilizaron. Una vez liofilizadas, las heces se volvieron a pesar y se determinó el porcentaje de agua perdida.

La evaluación de la presencia de sangre oculta en heces se realizó utilizando tiras reactivas para urianálisis SIEMENS Multistix 10 Visual (España) (**Figura 9.3**).



Figura 9.3. Tiras reactivas para determinar la presencia de sangre oculta en heces. El cuadro 0 indica un resultado negativo que se puntúa como un 0 según la Tabla 9.1. Los cuadros 3 a 6 indican presencia de sangre hemolizada oculta en heces variando la puntuación de 1 a 4 de izquierda a derecha según la Tabla 9.2. Los cuadros 1 y 2 indican presencia de sangre no hemolizada y su presencia se contabiliza sumando 1 a la puntuación final.

2.4. – Análisis hematológicos y serobioquímicos.

La sangre tomada directamente del corazón se introdujo en tubos eppendorf previamente heparinizados. Los parámetros hematológicos se determinaron directamente usando un analizador hematológico automático (Abacus Junio Ver, CMV S.L., Navarra, España) con un software específico para muestras de sangre de rata. Los parámetros analizados fueron el número de glóbulos blancos (WBC), concentración de glóbulos rojos (RBC), concentración de hemoglobina (HGB), nivel de hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (HCV), hemoglobina corpuscular media (MCH) y contenido de plaquetas (PLT). El plasma y los hematíes se separaron por centrifugación

a $550 \times g$ durante 5 min. Las muestras de plasma se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Los niveles de fibrinógeno total se midieron en un Olympus AU600 autoanalizador (Olympus Diagnostica Hamburg, Alemania).

2.5. – Determinación de la longitud del colon.

Una vez finalizado el período de ensayo, las ratas se anestesiaron como se ha descrito en el **apartado 2.1** del presente capítulo, se sacrificaron por desangrado mediante punción cardiaca, se abrieron, se localizó y se extrajo el colon que se midió utilizando una regla graduada.

2.6. – Determinación de MPO en mucosa de colon.

La MPO es una enzima presente en los neutrófilos y los monocitos que se libera durante una reacción inflamatoria aguda. Para la determinación de esta enzima se pesaron entre 40 y 50 mg de mucosa y se adicionaron 450 μL de PBS (pH = 7,2) y 50 μL de inhibidor de proteasas ($\times 10$) (Roche, Manhein, Alemania). La muestra se puso en hielo y se homogenizó con ultraturrax para posteriormente centrifugarla a $19828 \times g$ durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (se utiliza para el análisis de MDA y PGE_2) y el *pellet* se resuspendió en PBS 50 mM (pH = 6) para volver a centrifugarse a $19828 \times g$ durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Acabada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se homogenizó en ultraturrax con 500 μL de PBS + 0,5% de bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HETAB). Finalmente, las muestras se sometieron a 3 ciclos de sonicación de 10 s con intervalos de 30 s en hielo y se congelaron y descongelaron 3 veces para acabar centrifugando a $19828 \times g$ durante 15 min. El sobrenadante se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el posterior análisis de MPO.

La medida de la actividad MPO se describe como el incremento en absorbancia por min (Δ Abs/min) y se mide mediante una reacción de oxidación de la *o*-dianisidina en presencia de H₂O₂, que genera un producto coloreado que se puede cuantificar a 460 nm. Para ello, se realiza una recta patrón adicionando 50 μ L de cantidades conocidas de MPO (desde 2,5 hasta 60 mU) a 930 μ L de PBS 50 mM (pH = 6), 10 μ L de *o*-dianisidina (0,2 mg/mL de concentración final) y 10 μ L de H₂O₂ al 0,09 % (p/p) y se mide la variación de color durante 10 min a 460 nm y 25 °C. Para determinar la actividad MPO en cada muestra, se adicionaron 50 μ L de muestra en lugar de la cantidad conocida de enzima y se repitió el proceso.

2.7. – Determinación de la concentración de PGE₂ en mucosa de colon.

La PGE₂ es un producto primario del metabolismo del ácido araquidónico que se genera en distintos tipos de células y está implicada en los procesos inflamatorios. La determinación de este compuesto se realizó mediante la técnica de ELISA como se describe en el **apartado 3.4.4.5.**

2.8. – Determinación de MDA en mucosa de colon.

El MDA es un compuesto que se genera tras el proceso de peroxidación de los lípidos poli-insaturados y se utiliza como marcador del estrés oxidativo ligado a los procesos inflamatorios (Mateos *et al.*, 2005). El ensayo utilizado permite determinar el nivel de MDA basándose en su derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), generando un derivado que se puede cuantificar mediante HPLC. Para su cuantificación, se realiza una curva estándar a partir del 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), que en medio ácido (H₂SO₄) se convierte en MDA obteniendo una solución stock de concentración conocida. Para la determinación de MDA en las muestras de mucosa de colon de rata se

llevó a cabo una hidrólisis inicial mezclando 50 μL de las muestras con 50 μL de agua y otros 50 μL de NaOH 3 M. Estas muestras se calentaron a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min para hidrolizar la proteína unida al MDA. Finalizado este tiempo, las muestras se colocaron en hielo 5 min, se añadieron 62,5 μL de HClO_4 al 35% (para precipitar la proteína) y se centrifugaron a $2800 \times g$ durante 10 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se tomaron 175 μL de sobrenadante y se añadieron 17,5 μL de solución derivatizante (5 mM de DNPH en HCl 2 N), se mantuvieron en oscuridad 30 min, se filtraron (0,45 μm) y se adicionaron a los viales para el análisis por HPLC. La determinación del MDA se llevó a cabo en el sistema HPLC Elite LaChrom-Hitachi (VWR-Hitachi, Barcelona) cuyos componentes y condiciones de análisis se especifican en el capítulo 3 (**apartado 3.5.2**).

2.9. – Análisis de metabolitos derivados del consumo de extracto de granada en heces y orina de rata. Análisis por HPLC-MS/MS y UHPLC-MS/MS triple cuadrupolo (QqQ).

Para estudiar la presencia de los metabolitos derivados del consumo de granada, se recogieron muestras de heces (el día del sacrificio tras 25 días de ensayo) y de orina (obtenidas en la jaula metabólica, durante 24 h, a los 5 y 20 días de haber iniciado el ensayo) (**Figura 9.2**) que se analizaron por HPLC-MS/MS (capítulo 3, **apartado 3.5.3.1**) y UHPLC-QqQ-MS/MS (capítulo 3, **apartado 3.5.3.3**). Para el análisis de las muestras de orina se siguió el protocolo descrito por Espín *et al.* (**2007b**) con algunas modificaciones. Las muestras se diluyeron (1:4 v/v) en ácido fórmico 5% (v/v), se filtraron (0,45 μm) y se analizaron por HPLC-MS/MS 1100 series como se describe en el **apartado 3.5.3.1**. Los metabolitos de las heces se extrajeron siguiendo el protocolo llevado a cabo por Espín *et al.*, (**2007b**) utilizando una solución de MeOH:H₂O:HCl (50/49,9/0,1). Una vez extraídos, los sobrenadantes se filtraron (0,45 μm) y se

analizaron por HPLC-MS/MS (equipo 1100 series; capítulo 3, **apartado 3.5.3.1**), lo que nos permitió identificar y cuantificar los metabolitos. Esas mismas muestras de heces, se analizaron por UHPLC-QqQ-MS/MS en las condiciones que se describen en el capítulo 3, **apartado 3.5.3.3** ya que este aparato nos permite detectar los compuestos con una mayor exactitud y sensibilidad. Los compuestos EA, Uro-A y Uro-B fueron identificados y cuantificados usando sus estándares correspondientes. Otros metabolitos derivados fueron identificados de acuerdo a su espectro UV y patrón de fragmentación en MS/MS, si bien solo se cuantificaron de forma relativa atendiendo a sus áreas respectivas para comparar entre tratamientos.

2.10. – Análisis de expresión génica.

Para el análisis de la expresión génica, se obtuvo la mucosa intestinal de las ratas como se describe en el **apartado 2.1** del presente capítulo y se introdujo en una solución *RNAlater* (Qiagen, Hilden, Alemania) (que mantiene la estabilidad del ARN facilitando una posterior extracción del ARN. Para la extracción del material genético, se tomaron unos 20 mg de mucosa y se utilizó el kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) (Capítulo 3, **apartado 3.4.1.1**). La concentración se determinó utilizando un lector de placas Infinite M200 Tecan (Grodig, Austria) (capítulo 3, **apartado 3.4.1.4**). Además, se determinó la integridad del material genético mediante el uso del Bioanalizador Agilent 2100 cuya descripción y funcionamiento están descritos en el capítulo 3, **apartado 3.4.1.3**. El análisis de los genes se realizó por RT-PCR (Taqman system, ABI, Madrid, España) (capítulo 3, **apartado 3.4.3**) y se estudió la expresión génica de *β-catenina* (Rn00670330_m1), *c-Myc* (Rn00561507_m1), *Tp53* (Rn00755717_m1) y *Ciclina D1* (Rn00432359_m1). Los

niveles de expresión para cada gen se normalizaron utilizando la β -actina (Rn00667869_m1) como gen endógeno.

2.11. – Extracción de SCFAs de muestras de heces y análisis mediante GC-MS/MS.

Las muestras de heces frescas de rata se recogieron en tubos eppendorf al final del tratamiento con el DSS, como se indica en la **Figura 9.2**. A los tubos se les adicionó 1 mL de una solución al 5% (v/v) de ácido *o*-fosfórico en agua por cada 0,1 g de heces y se congelaron a -20 °C hasta su análisis. Para la extracción, las muestras se homogenizaron en la solución de ácido *o*-fosfórico con ultraturrax para posteriormente someterlas a ultrasonidos durante 10 min y favorecer la liberación de los SCFAs a la solución. A continuación, las muestras se centrifugaron a $16000 \times g$ durante 10 min y se tomaron 2,25 mL de sobrenadante que se distribuyeron en 3 tubos eppendorf (750 μ L en cada uno). Se adicionaron 750 μ L de acetato de etilo, se agitó mediante vórtex, lo que permitió mezclar bien las dos fases, y se centrifugaron las muestras a $16000 \times g$ durante 10 min. A continuación, se recogieron 600 μ L a los que se les adicionó ácido 4-metilvalérico como estándar interno a una concentración 500 μ M y se analizó en un equipo GC-MS/MS Agilent 7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) (**apartado 3.5.1**). La identificación y cuantificación de los ácidos grasos estudiados (acético, butírico, iso-butírico, valérico, iso-valérico y propiónico), se realizó utilizando los correspondientes estándares comerciales. Los parámetros de calibración: linealidad y sensibilidad, % de recuperación, efecto matriz y variabilidad intra-día e inter-día están recogidos en el ANEXO I del presente capítulo.

2.12. – Análisis estadístico.

El análisis estadístico aplicado a los distintos ensayos de este capítulo está descrito en el **apartado 3.6** de la sección general de Material y Métodos.

3. - RESULTADOS.

3.1. - Determinación del índice de actividad de la enfermedad (DAI; *disease activity index*).

El estudio del peso de las ratas en los 5 últimos días del ensayo indicó que el consumo de DSS en el agua de bebida causaba una disminución significativa en la ganancia de peso respecto del grupo control ($p=0,01$) (**Figura 9.4**). Por otro lado, se observó que las ratas del grupo DSS+Gr ganaban peso en la misma medida que el grupo control, siendo esta ganancia también muy significativa ($p=0,006$) respecto al grupo que consumió solo DSS. Las ratas que consumieron solo granada (sin DSS) también incrementaron su peso respecto al control ($p=0,017$).

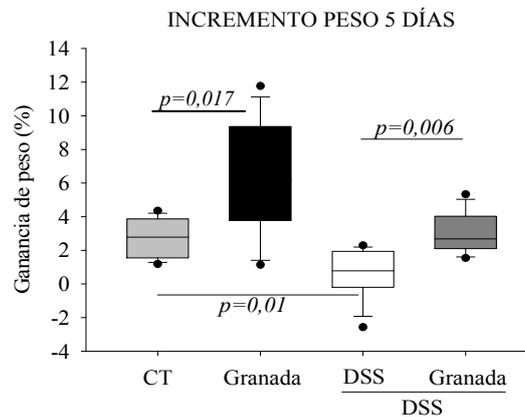


Figura 9.4. Determinación de la ganancia de peso durante los últimos 5 días de ensayo. En la gráfica se representa la diferencia de peso de las ratas entre el día del sacrificio (día 25) y el día anterior a la introducción del DSS en el agua de bebida (día 20). Los valores se representan en diagramas de caja como la media aritmética \pm desviación estándar (DE) (barras de error) ($n=8$ ratas por grupo). Las ratas que consumieron DSS incrementaron su peso en menor medida que el resto de grupos. El grupo DSS+Gr mantuvo la ganancia de peso a niveles del grupo control.

Además de la pérdida de peso, se determinaron la presencia de sangre en heces y su consistencia. Con la combinación de estos 3 parámetros descritos en la **Tabla 9.1** se obtuvo el DAI que es un parámetro indicativo del grado de colitis. Éste se determinó durante los últimos 5 días en los que se adicionó DSS al agua de bebida de las ratas observándose las mayores diferencias en el último día de ensayo, como se puede observar en la **Figura 9.5**:

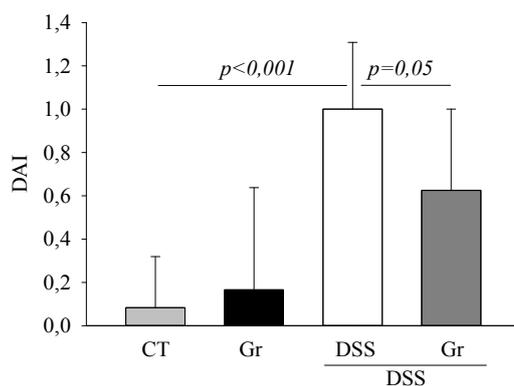


Figura 9.5. Valores de DAI obtenidos el último día del ensayo mediante valoración de la pérdida de peso, presencia de sangre oculta en heces y contenido de agua en heces. Los valores se representan como la media ± DE (barras de error) (n = 8 ratas por grupo).

El consumo de DSS durante 5 días incrementó el valor de DAI respecto a los grupos que no lo consumieron ($p < 0,001$). El grupo de ratas que además consumió granada (DSS+Gr) exhibió valores de DAI menores que las ratas del grupo DSS ($p = 0,05$), lo que indicaba un efecto protector o reductor del daño causado por el DSS, en definitiva, un efecto anti-inflamatorio de la granada. El grupo que consumió solo granada (Gr) no mostró diferencias significativas frente al grupo control.

3.2. – Hematología.

Ninguno de los parámetros hematológicos analizados mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Además, todos los parámetros analizados se mantuvieron dentro de los rangos de normalidad.

Tabla 9.2. Parámetros hematológicos analizados en la sangre de las ratas tras el sacrificio.

PARÁM. HEMATO-LÓGICOS	CONTROL	Gr	DSS	DSS+Gr	VALOR NORMAL
WBC ($10^9/L$)	6,77 ± 1,20	7,26 ± 1,06	7,47 ± 2,23	8,91 ± 1,84	2,10-19,50
RBC ($10^{12}/L$)	8,85 ± 0,47	8,62 ± 0,39	8,87 ± 1,75	8,47 ± 2,27	5,30-10,00
HGB (gr/dL)	16,96 ± 1,33	16,65 ± 0,50	17 ± 2,37	16,96 ± 2,83	14,0-18,0
HCT (%)	48,61 ± 4,53	47,33 ± 1,53	48,17 ± 10,29	48,58 ± 12,05	35,00-52,00
HCV (fl)	55 ± 3,63	54,87 ± 2,17	54,12 ± 0,99	57,87 ± 4,16	50-62
MCH (pg)	19,13 ± 0,82	19,30 ± 0,47	19,30 ± 0,90	20,65 ± 3,88	16,0-23,0
PLT ($10^9/L$)	541 ± 90,30	560,12 ± 36,09	603 ± 139,39	660,62 ± 212,20	500-1370

Los resultados se expresan como la media aritmética ± DE (n=8 ratas por grupo). Abreviaturas: WBC=glóbulos blancos; RBC= glóbulos rojos; HGB= hemoglobina; HCT=hematocrito; HCV= Volumen corpuscular medio; MCH= hemoglobina corpuscular media; PLT=plaquetas.

3.3. – Longitud del colon.

El acortamiento del colon es un rasgo característico de la inflamación colónica en ratas. Las ratas pertenecientes al grupo DSS sufrieron un leve acortamiento del colon respecto del control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados se presentan en la **Figura 9.6**:

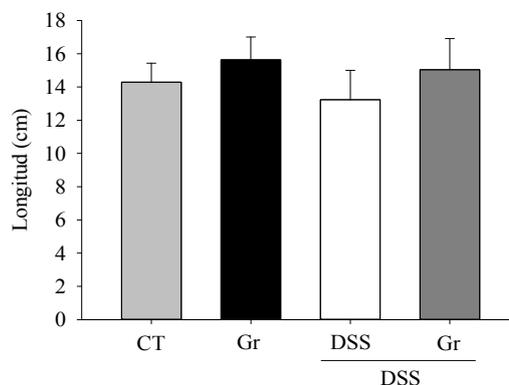


Figura 9.6. Determinación de la longitud del colon en las ratas de los 4 grupos tras 25 días de ensayo. Los valores se representan como la media ± DE (barras de error) (n = 8 ratas por grupo).

3.4. – Determinación de la concentración de PGE₂.

PGE₂ es un importante mediador pro-inflamatorio que se produce en la mucosa del colon en condiciones de inflamación intestinal. Los niveles de PGE₂ aumentaron 2,16 veces ($p=0,04$) en el grupo DSS con respecto al control (**Figura 9.7**). El consumo de granada atenuó muy moderadamente (0,84 veces) el incremento de los niveles de PGE₂ causado por el DSS. En ausencia de DSS, el extracto indujo, también muy levemente, los niveles de PGE₂ (1,5 veces respecto al control). En ningún caso estos efectos alcanzaron significatividad

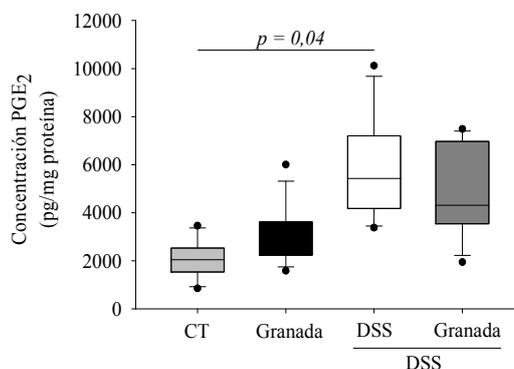


Figura 9.7. Determinación de la concentración de PGE₂ en muestras de mucosa de colon de rata. Los valores se representan en diagramas de caja como la media aritmética \pm DE (barras de error) (n =8 ratas por grupo).

3.5. – Determinación de la concentración de MDA.

El MDA, como se ha indicado anteriormente, es un producto que se genera tras la peroxidación lipídica y se utiliza como indicador de daño oxidativo. En nuestro estudio, ninguno de los tratamientos alteró los niveles de MDA en ninguno de los grupos respecto del control (**Figura 9.8**).

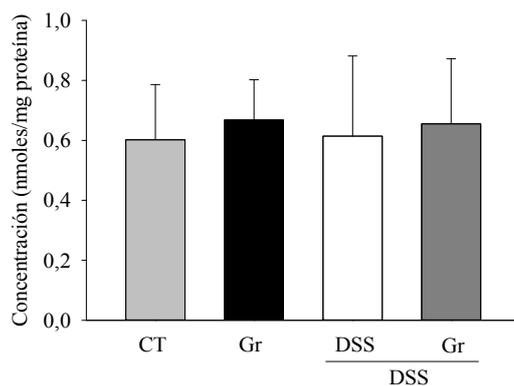


Figura 9.8. Determinación de la concentración de MDA en muestras de mucosa de colon de rata de los distintos grupos tras 25 días de ensayo. Los valores se representan como la media aritmética \pm DE (barras de error) (n =8 ratas por grupo).

3.6. – Determinación de la concentración de fibrinógeno.

El fibrinógeno es una proteína del grupo de proteínas de fase aguda y cuyos niveles se elevan en situaciones de inflamación. En nuestro estudio, los niveles de fibrinógeno aumentaron 2,11 veces respecto al control en el grupo DSS ($p < 0,001$). El grupo DSS+Gr disminuyó 0,73 veces los niveles de fibrinógeno respecto al grupo DSS ($p = 0,007$), mientras que la granada, por sí sola, no afectó los niveles de fibrinógeno respecto al grupo control.

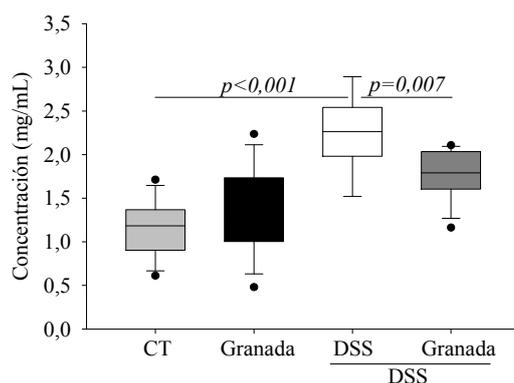


Figura 9.9. Determinación de la concentración de fibrinógeno en muestras de plasma de rata. Los resultados indican que la administración de DSS aumenta la concentración de fibrinógeno en plasma, mientras que el extracto de granada es capaz de disminuir esta inducción significativamente. Los valores se representan en diagramas de caja como la media aritmética \pm DE (barras de error) (n =8 ratas por grupo).

3.7. – Determinación de la actividad MPO.

Debido a la infiltración de células inflamatorias la actividad MPO suele estar incrementada en la mucosa del colon durante los procesos de EII. En este estudio, el suministro de DSS incrementó la actividad de esta enzima 1,75 veces ($p=0,004$), viéndose este aumento neutralizado por la granada, restaurando la actividad enzimática a los niveles del control. Por su parte, la granada no varió los niveles de MPO respecto al grupo control en ausencia de DSS.

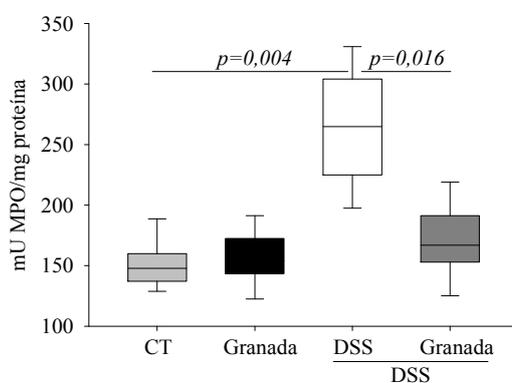


Figura 9.10. Determinación de la actividad MPO en mucosa de rata. Se observa un aumento de la actividad MPO en el grupo que consumió DSS (3% p/v), mientras que la granada contrarrestó esta inducción hasta niveles control. Los valores se representan en diagramas de caja como la media aritmética \pm DE (barras de error) ($n = 32$; 8 ratas por grupo).

3.8. – Análisis de la expresión génica.

Los niveles de expresión de los genes *Tp53*, *Ciclina D1*, *c-Myc* y β -*catenina* se midieron en la mucosa del colon de todas las ratas incluidas en el estudio. Inicialmente, se determinó la expresión basal de los 4 genes en la mucosa del colon de las ratas que habían consumido una dieta estándar (ratas control). Se observó una elevada variabilidad en la expresión del gen *c-Myc* que a su vez fue el más expresado, mientras que el resto de los genes exhibieron una variabilidad menor (**Figura 9.11**).

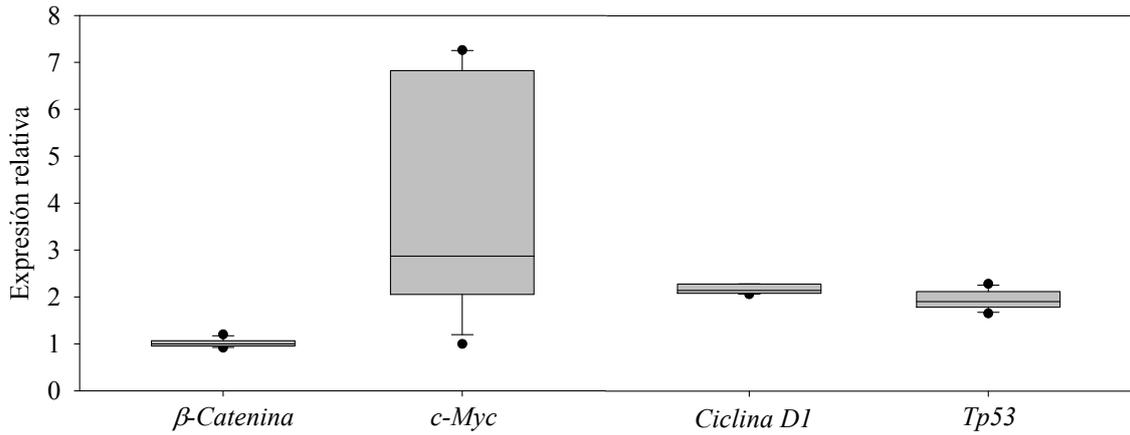


Figura 9.11. Distribución de los niveles de expresión relativa (valores normalizados con la β -actina como gen endógeno) para los genes β -catenina, c-Myc, Cyclina D1 y Tp53 analizados por RT-PCR. La expresión de estos genes se normalizó utilizando la β -actina como gen endógeno. Los valores se representan en diagramas de caja como la media aritmética \pm DE (n = 8).

No se observaron diferencias de expresión en ninguno de los 4 genes al comparar muestras de mucosa de colon de ratas que consumieron granada y ratas que consumieron la dieta estándar (ratas control) en la ausencia de DSS (**Figura 9.12**).

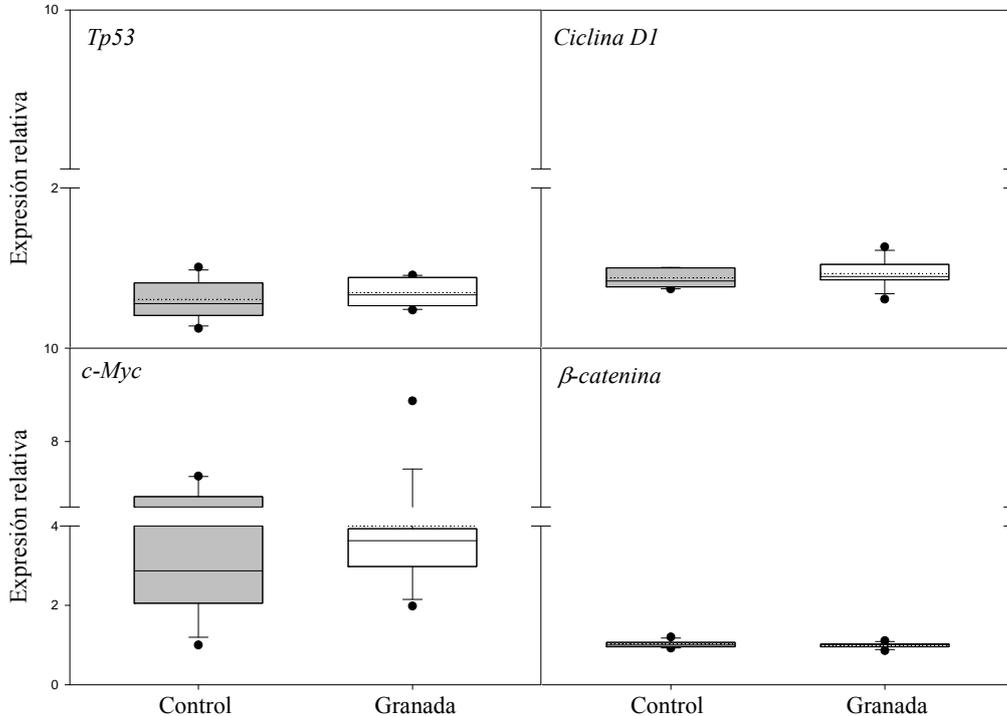


Figura 9.12. Expresión de los genes *Ciclina D1*, *Tp53*, *c-Myc* y β -catenina, analizados por real time RT-PCR, en mucosa de colon de ratas controles y ratas que consumieron extracto de granada durante los 25 días que duró el ensayo. La expresión de estos genes se normalizó utilizando la β -actina como gen endógeno. Los valores se representan en diagramas de caja como la media aritmética \pm DE (barras de error) (n = 8 ratas por grupo).

En el presente estudio no nos fue posible, sin embargo, detectar la expresión de ninguno de estos genes en las mucosas procedentes de los grupos de animales tratados con DSS. Esto, según la bibliografía, parece ser debido a interferencias causadas por el DSS en el desarrollo de la RT-PCR (Kerr *et al.*, **2012**). En un estudio de características similares realizado anteriormente por investigadores de nuestro grupo y en el que el DSS se retiró un día antes del sacrificio de las ratas sí que se pudo analizar la expresión génica por microarrays y RT-PCR en la mucosa colónica (Larrosa *et al.*, **2010b**). Como disponíamos de ARN procedente de las mucosas de colon de estos animales tratados con DSS (5% p/v en el agua de bebida) utilizamos estas muestras para determinar el efecto del consumo de granada en la expresión de nuestros marcadores en animales que habían consumido el DSS. Los resultados revelaron que el DSS incrementó significativamente 1,74 veces la expresión de *Tp53* ($p=0,029$) y 2,06 veces la de *c-Myc* ($p=0,018$). *Ciclina D1* también resultó levemente inducida, 1,39 veces, aunque no significativamente ($p=0,324$). En este estudio, el consumo de granada (250 mg/kg/día) atenuó en general el efecto del DSS disminuyendo la expresión de *c-Myc* casi al nivel del control ($p=0,02$) así como la de *Tp53* y *Ciclina D1* ($p=0,150$). En el caso de *β -catenina*, ni el DSS ni el consumo de granada afectaron los niveles de expresión de este gen (**Figura 9.13**).

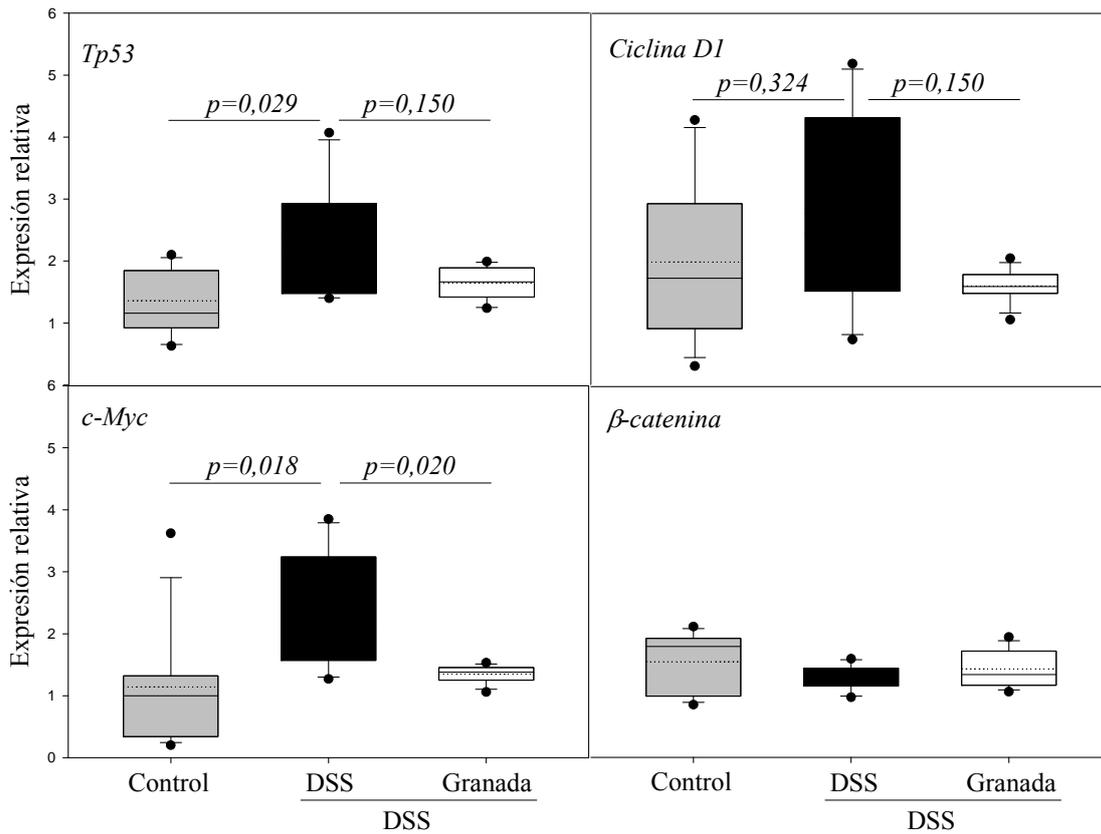


Figura 9.13. Expresión de los genes *Ciclina D1*, *Tp53*, *c-Myc* y β -catenina, analizados por real time RT-PCR, en mucosa de colon de ratas controles, ratas que consumieron DSS 5% (p/v) en el agua de bebida y ratas que consumieron DSS 5% (p/v) en el agua de bebida durante 5 días y extracto de granada durante los 25 días que duró el ensayo. Los datos se normalizaron utilizando β -actina como gen endógeno. Los valores se representan en diagramas de caja como la media aritmética \pm DE (barras de error) de un mínimo de 6 ratas por grupo (n = 6 – 9).

3.9. – Análisis de metabolitos en orina y heces

El análisis mediante HPLC de los metabolitos en la orina de las ratas que consumieron extracto de granada en su dieta mostró una elevada variabilidad inter-individual en la cantidad de metabolitos producidos, siendo Uro-A-gluc y su aglicona, Uro-A, los metabolitos mayoritarios detectados en todas las muestras. El análisis a los 5 y 20 días de haber iniciado el consumo del extracto de granada en la dieta reveló una tendencia a excretar menos Uro-A-gluc a los 20 días que a los 5 ($p=0,129$) (**Figura 9.14A**) a pesar de que el consumo de pienso se mantuvo constante a lo largo de los días. Además, la excreción de metabolitos, determinada como la suma de Uro-A-gluc y su

aglicona, también indicó una tendencia a disminuir la excreción de metabolitos en la orina ($p=0,087$) (**Figura 9.14B**).

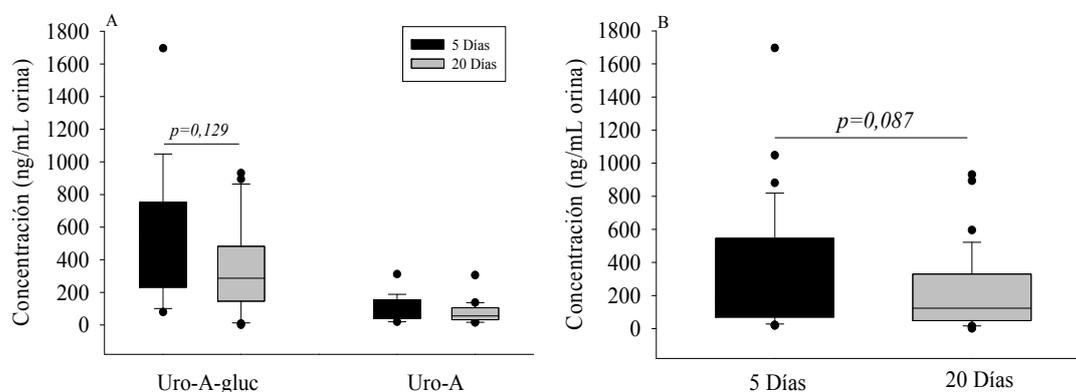


Figura 9.14. Análisis de metabolitos, Uro-A y Uro-A-gluc, en orina de rata tras el consumo de extracto de granada. En (A) se representan las concentraciones de Uro-A-gluc y Uro-A a los 5 y 20 días de consumo de extracto de granada. En (B) se indican la suma de las concentraciones de los metabolitos (Uro-A-gluc + Uro-A) a los 5 y 20 días de consumo de extracto de granada. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm DE (barras de error) ($n = 8$ por grupo).

La cuantificación de los metabolitos presentes en las heces de las ratas de los grupos Gr y DSS-Gr a los 25 días de ensayo mediante UHPLC-QqQ confirmó Uro-A como el metabolito mayoritario, siendo su concentración mayor en el grupo DSS-Gr (100 $\mu\text{g/g}$ heces) que en el grupo Gr (38,14 $\mu\text{g/g}$ heces) ($p=0,012$), mientras que el EA, detectado en cantidades mucho más pequeñas, no exhibió diferencias entre los dos grupos (**Figura 9.15A**). Del resto de metabolitos detectados y cuantificados en función del área del pico del cromatograma, urolitina-C (Uro-C) fue el mayoritario y su concentración resultó más elevada en el grupo DSS-Gr que en el grupo Gr ($p=0,007$) (**Figura 9.15B**). La excreción de metabolitos totales expresada como la suma de las áreas de todos los metabolitos microbianos derivados del EA fue mayor en el grupo DSS-Gr que en el grupo Gr ($p=0,038$) (**Figura 9.15C**).

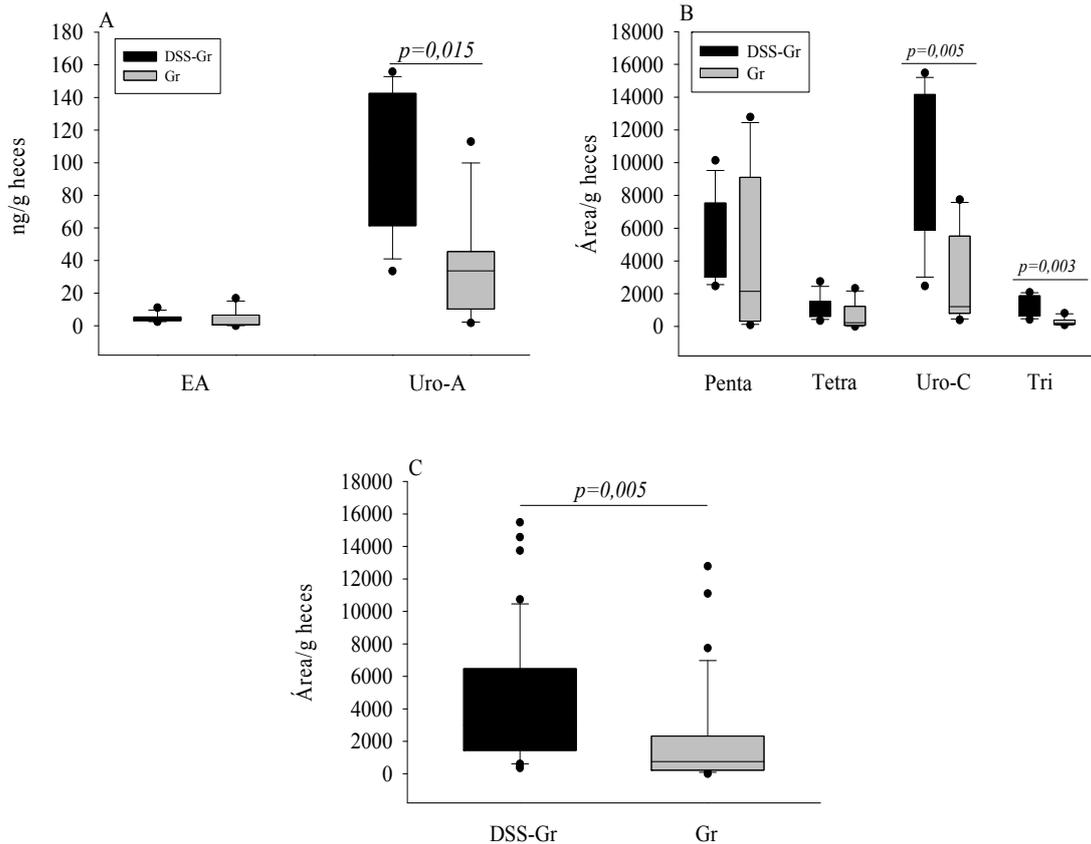


Figura 9.15. Análisis de metabolitos en heces de rata derivados del consumo de extracto de granada. En (A) se representan las concentraciones de EA y Uro-A en ratas que consumieron granada y DSS + granada a los 25 días de ensayo; (B) se representan las concentraciones de los derivados penta-hidroxi, tetra-hidroxi, urolitina-C (Uro-C) y tri-hidroxi en heces de las ratas que consumieron granada y DSS+granada a los 25 días de ensayo; (C) se representa los metabolitos totales (excepto EA) en heces de ratas que consumieron extracto de granada a los 25 días de ensayo. En las gráficas B y C, los metabolitos se cuantificaron usando el área de los picos de los cromatogramas debido a que no se disponía de los patrones. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm DE (barras de error) ($n = 8$ ratas por grupo).

3.10. – Estudio de la producción de SCFA en heces de rata.

El análisis de los niveles de SCFAs en las heces de los animales control (sin DSS) y que consumieron granada (Gr) mostró un aumento estadísticamente significativo respecto al grupo control en el caso del isovalérico (1,54 veces; $p=0,046$) y del butírico (2,17 veces; $p=0,042$) mientras que se observó una tendencia a aumentar las concentraciones de, valérico ($p=0,234$), propiónico ($p=0,121$) y acético ($p=0,369$). Los niveles de isobutírico no variaron respecto al grupo control.

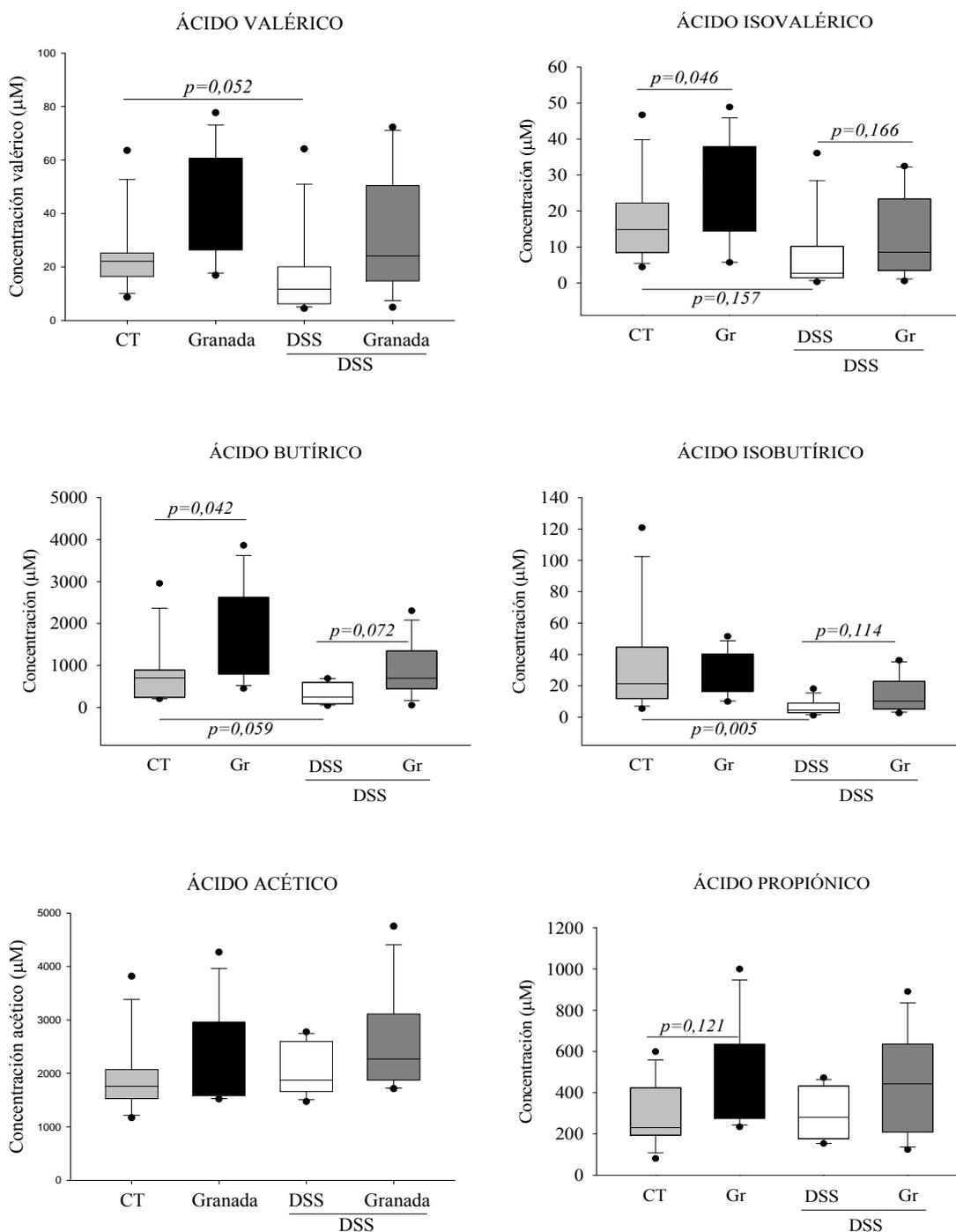


Figura 9.16. Representación en diagramas de caja de la concentración (µM) de SCFAs en heces de rata. Los valores se representan como la media aritmética ± DE (barras de error) (n = 8 ratas por grupo). Los valores de $p < 0,05$ y $p < 0,01$ se consideraron estadísticamente significativos. Los valores de $p < 0,2$ se indicaron para señalar tendencias.

En general, el grupo de ratas tratadas con DSS exhibía una disminución de la concentración de los SCFAs respecto al grupo control: esta disminución resultó muy significativa en el caso del isobutírico (0,18 veces; $p = 0,005$) seguido de valérico (0,72

veces; $p=0,052$), butírico (0,38 veces; $p=0,059$) e isovalérico (0,46 veces; $p=0,157$). No se detectaron cambios en los niveles de propiónico y acético respecto al grupo control. En el grupo de ratas que consumieron DSS+Gr, el consumo de granada atenuó moderadamente la disminución de la concentración de los SCFAs causada por el DSS. En general, nuestros resultados sugieren que el consumo de extracto de granada favorece el aumento de la concentración de los SCFAs en las heces del colon además de atenuar la bajada de los SCFAs en las heces provocada por el suministro de DSS.

4. - DISCUSIÓN.

El ensayo de inflamación intestinal basado en la administración oral de DSS es un modelo muy utilizado en la identificación y validación de nuevas terapias frente a las EIIs (Larrosa *et al.*, 2010c; Melgar *et al.*, 2008). La administración de DSS genera una pérdida de la arquitectura de la barrera intestinal, diarrea, presencia de sangre en heces y finalmente inflamación intestinal, la cual contribuye al aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal, lo que favorece la interacción entre la microbiota colónica y las células del sistema inmune (Larrosa *et al.*, 2010c), provocando una liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, eicosanoides (PGE_2) y citoquinas pro-inflamatorias (Sartor *et al.*, 1997; Gálvez *et al.*, 2005).

Larrosa *et al.*, (2010b) demostraron que el consumo de DSS al 5% (p/v) en el agua de bebida producía una inflamación severa que daba lugar a una alteración de parámetros y marcadores relacionados con la inflamación (DAI, PGE_2 , MPO, etc), que se atenuaban con el consumo de una dieta suplementada con Uro-A (principal metabolito derivado del consumo de granada) y más moderadamente con el extracto de granada. Basándonos en este estudio, nos planteamos investigar el efecto del consumo de una dieta suplementada con extracto de granada durante 25 días sobre la inflamación

inducida por DSS al 3% (p/v) en el agua de bebida durante los últimos 5 días. Con esta reducción del % de DSS perseguíamos inducir una inflamación más moderada donde resultara más fácil evidenciar un efecto preventivo del extracto. Además, en el estudio anterior de Larrosa *et al.* (2010b) no se investigó el posible efecto de la granada en tejido sano, especialmente en relación a cambios de la expresión de determinados genes, por lo que también se incluyó como objetivo en el presente capítulo la comparativa de ambas condiciones fisiológicas, normales y con inflamación intestinal moderada. Los resultados obtenidos confirmaron que el consumo de DSS al 3% aún inducía cierta inflamación intestinal en los animales, como lo demostraba el aumento del DAI, el incremento en la producción y liberación de PGE₂ y MPO en la mucosa del colon y el aumento de fibrinógeno en plasma, sin embargo, en general la inflamación resultó menos severa que la provocada en el estudio de Larrosa *et al.* (2010b), como se pudo observar en el incremento de PGE₂ que fue de 11 veces en el grupo que consumió DSS en comparación con el control, mientras que en nuestro estudio solamente fue de 2,83 veces. Al igual que en el estudio de Larrosa *et al.* (2010b), el extracto de granada atenuó los efectos del DSS mejorando los parámetros y marcadores moleculares de inflamación intestinal: i) disminución del DAI, ii) bajada de los niveles de MPO y iii) fibrinógeno. Sin embargo, en contraste con el estudio de Larrosa *et al.* (2010b), no se observó un descenso significativo de los niveles de PGE₂, lo que podría deberse a la menor dosis de extracto de granada suministrado en nuestro estudio (200 mg/kg/día) respecto al citado trabajo (250 mg/kg/día). Además, el consumo de extracto de granada durante 25 días en condiciones normales (ausencia de DSS) no tuvo efecto sobre los parámetros analizados respecto al grupo control.

La relación entre inflamación y cáncer ha sido reconocida y aceptada desde hace mucho tiempo. Existen diversos hechos que corroboran esta vinculación: i) desarrollo

de tumores en zonas de inflamación crónica, presencia de células y marcadores de inflamación en tumores, y que los mismos marcadores moleculares y rutas de señalización se activan o inactivan en inflamación y en desarrollo de cáncer (Kraus and Arber, **2009**). Entre las moléculas y rutas que se han demostrado estar implicadas en el desarrollo de carcinogénesis inducida (DSS/Azoxymetano) se incluyen *K-Ras*, *β-catenina* o *c-Myc* (Suzuki et al., **2007**; Chen and Huang, **2009**). En este estudio intentamos determinar el efecto del consumo del extracto de granada sobre la expresión de algunos genes clave relacionados con estas rutas y que aparecen normalmente inducidos en los procesos inflamatorios y en el desarrollo de cáncer colorrectal: *Tp53*, *c-Myc*, *Ciclina D1* y *β-Catenina* (Cooper et al., **2000**; Suzuki et al., **2007**; Larrosa et al., **2009b**; González-Sarriás et al., **2009a**). Como se ha indicado en la sección de Resultados, en el presente estudio no fue posible determinar la expresión de ninguno de los genes seleccionados en las muestras que provenían de mucosa de rata que habían consumido DSS. Aunque se ha descrito que el DSS es un inhibidor de la polimerasa que interfiere en el análisis de expresión génica por RT-PCR, determinados procedimientos de purificación y eliminación del DSS permite el desarrollo de la reacción RT-PCR (Kerr et al., **2012**). Nosotros intentamos eliminar el DSS pero no conseguimos evitar la interferencia con el DSS y llevar a cabo los análisis de RT-PCR. No obstante, el análisis realizó en ARN extraído de mucosas de colon de animales tratados de forma similar pero con DSS al 5% y para las que sí se pudo eliminar la interferencia (Larrosa et al., **2010b**). En este estudio previo se detectaron mediante microarrays cambios de expresión en diversos grupos de genes implicados en el desarrollo de cáncer colorrectal (Kelloff et al., **2006**; González-Sarriás et al., **2009a**) que se modificaban con el consumo de DSS y se contrarrestaban con la ingesta de granada o Uro-A. Estos cambios concretos no llegaron a validarse entonces mediante RT-PCR. Utilizando el ARN

remanente de estas muestras, nosotros evaluamos los cambios de expresión en *Tp53*, *c-Myc*, *Ciclina D1* y β -*catenina* mediante RT-PCR en ratas que consumieron: i) dieta estándar, ii) dieta suplementada con granada (250 mg/kg/día) y iii) dieta suplementada con granada y DSS al 5% (p/v) en el agua de bebida. De acuerdo con estudios previos que utilizaron el mismo modelo de inducción de inflamación mediante DSS (Suzuki *et al.*, 2007), observamos un aumento estadísticamente significativo de la expresión del gen *c-Myc* en la mucosa del colon del grupo de ratas que consumió DSS. *c-Myc* es un proto-oncogén sobre-expresado en numerosos tumores. En los animales que consumieron extracto de granada, la expresión de este oncogen se redujo a niveles similares a los de mucosa control lo que, en principio, puede sugerir un efecto protector o preventivo. El DSS también causó un ligero aumento en la expresión de *Tp53* y de *Ciclina D1*, ambos implicados en la regulación del crecimiento y ciclo celular para los que el consumo de granada redujo la expresión a valores control. Estos resultados indican que el consumo de DSS altera la capacidad de proliferación y crecimiento de células de la mucosa intestinal y sugieren que el consumo de granada parece prevenirlo o reducirlo.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el reconocimiento del importante papel que juega la microbiota intestinal en el mantenimiento de la salud del organismo y en la prevención de patologías crónicas. Aunque la etiología de las EII no está del todo clara, cada vez existen más evidencias que relacionan la microbiota intestinal con el desarrollo de estas enfermedades como consecuencia de un desequilibrio en las poblaciones bacterianas, favoreciendo el crecimiento de patógenos frente a bacterias con función protectora (Galvez *et al.*, 2005). Se ha descrito que la inflamación inducida con DSS en ratas favorece el crecimiento de enterobacterias y *Escherichia coli* (Larrosa *et al.*, 2010b). A pesar de que no se han publicado demasiados estudios que relacionen

el consumo de granada con la modificación de la microbiota intestinal, sí que se ha descrito un posible efecto prebiótico en estudios *in vitro* (Reddy *et al.*, **2007**; Bialonska *et al.*, **2009b**; Bialonska *et al.* **2010**). Hasta la fecha, el único estudio *in vivo* que ha demostrado efecto prebiótico de la granada fue el realizado por nuestro grupo de investigación (Larrosa *et al.*, **2010b**). En este estudio se demostró que el consumo de extracto de granada (HED de 2,2 g/día para una persona de 70 kg) o Uro-A (HED de 150 mg/día) en ratas durante 20 días incrementaba la concentración de poblaciones totales de clostridios, lactobacilos y bifidobacterias. Además, también se observó que el consumo de DSS produjo un incremento de enterobacterias, *E. coli* y aerobios totales, lo cual fue significativamente amortiguado tanto por la dieta suplementada con extracto de granada como por la de Uro-A. (Larrosa *et al.*, **2010b**).

La modificación de la composición de la microbiota intestinal genera a su vez la alteración de los productos de su metabolismo y la variación en la concentración de los compuestos que producen y liberan al lumen. Entre estos compuestos, los SCFA se generan a partir de la fibra dietética mediante fermentación anaeróbica. El análisis cualitativo y cuantitativo de los SCFA en muestras intestinales resulta pues de gran interés y por ello en este capítulo hemos desarrollado un método rápido y sensible que nos permitió: i) optimizar el ratio número de muestras/tiempo de ensayo, ii) analizar SCFAs que se encontraban a baja concentración, iii) separar los SCFAs de otros componentes presentes en las heces e iv) identificar y cuantificar de forma muy específica mediante espectrometría de masas los SCFAs. En las heces de las ratas estudiadas los ácidos butírico, propiónico y acético fueron los mayoritarios, mientras que valérico, isovalérico e isobutírico se encontraban a concentraciones menores. A los SCFAs se les atribuyen importantes propiedades anti-inflamatorias y preventivas del desarrollo de las EIIs (Galvez *et al.*, **2005**; Huda-Faujan *et al.*, **2010**; Vinolo *et al.*,

2011). *In vitro*, acetato, propionato y butirato disminuyen la producción de IL-6 en cultivos de células de colon de rata tratadas con DSS, los niveles de IL-8 y TNF- α en neutrófilos humanos estimulados con LPS y también el bloqueo de la activación de NF- κ B en células de cáncer de colon Colo320DM (Tedelind *et al.*, **2007**). Se ha descrito que pacientes con EIIs tienen niveles más bajos de acetato y butirato (Marchesi *et al.*, **2007**; Gentschew *et al.*, **2012**). En nuestro estudio, el análisis de los SCFAs en heces de rata que consumieron granada durante 25 días reveló una tendencia a aumentar la concentración de todos los SCFAs analizados, exceptuando el isobutírico, lo que está de acuerdo con los resultados de un estudio *in vitro* en el que se observó un aumento de la concentración de acético, propiónico y butírico en cultivos de microorganismos fecales humanos a los que se les adicionó un extracto de granada (Bialonska *et al.*, **2010**). En nuestro ensayo, el consumo de DSS, en general, parece disminuir la concentración de la mayoría de los SCFAs, mientras que el consumo del extracto de granada parece prevenir esta disminución lo que podría contribuir al efecto anti-inflamatorio del extracto de granada.

Como ha quedado expuesto en la Introducción de la Tesis, en mamíferos, los ETs de la granada generan EA en el tracto gastrointestinal que es metabolizado por la microbiota colónica para producir urolitinas (Cerdá *et al.*, **2003a**; Cerdá *et al.*, **2004**; Cerdá *et al.*, **2005a**; Cerdá *et al.*, **2005b**; Espín *et al.*, **2007b**; González-Barrio *et al.*, **2011**). El análisis de los metabolitos presentes en la orina de las ratas que consumieron el extracto de granada nos reveló que la excreción de metabolitos (expresado como la suma de Uro-A y Uro-A-gluc) era mayor a los 5 días que a los 20 días de ensayo, indicando una aparente disminución de la producción de metabolitos con el tiempo de consumo. Un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en el que se evaluó el metabolismo y la biodisponibilidad de punicalagina (principal ET de la

granada) en ratas indicó que la máxima excreción de metabolitos derivados de punicalagina en orina y heces se producía a las dos semanas, observándose un ligero descenso en la excreción de estos metabolitos en las semanas posteriores del ensayo. Además, la excreción de Uro-A en orina fue mayor a los 10 días que a los 15 o 20 de ensayo (Cerdá *et al.*, **2003a**). Algunos autores han propuesto que esta disminución en la excreción de metabolitos podría deberse a una acumulación en los tejidos (Cerdá *et al.*, **2003a**; Espín *et al.*, **2007b**). Sin embargo, son muy pocos los estudios que han demostrado la acumulación de estos metabolitos (González-Sarrías *et al.*, **2010b**). Tampoco se puede descartar que el consumo de extracto de granada induzca una modulación de la microbiota que produce las urolitinas (Bialonska *et al.*, **2009b**; Larrosa *et al.*, **2010b**; Bialonska *et al.*, **2010**), aunque en la actualidad no se conocen cual o cuales son las bacterias o grupos de bacterias responsables de la producción de los metabolitos derivados del consumo de granada, algo que es objeto de investigación dentro de nuestro grupo.

El análisis por UHPLC-QqQ-MS/MS de las muestras de heces reveló la presencia de pentahidroxi-urolitina, tetrahidroxi-urolitina, Uro-C, trihidroxi-urolitina, Uro-A y EA en las heces de los grupos que habían consumido granada a los 25 días de ensayo. A diferencia de los resultados publicados por Larrosa *et al.* (**2010b**), en el presente estudio se observó una mayor cantidad de Uro-A y Uro-C en las heces de las ratas del grupo DSS-Gr que en las del grupo Gr, siendo esta diferencia significativa en ambos casos. Además, el resto de metabolitos analizados, exceptuando el EA, fueron más abundantes en las heces de las ratas que consumieron DSS que en las ratas del grupo control. Esta diferencia podría deberse a las distintas concentraciones utilizadas de DSS en ambos estudios, en nuestro estudio la dosis de DSS ha sido menor (3% frente a 5%), por lo que la inflamación inducida no ha sido tan severa, con menor grado de

diarrea, pudiendo permitir a la granada permanecer en el colon durante más tiempo y así ser metabolizada. También podría deberse a que el DSS, a este %, podría favorecer las poblaciones bacterianas que producen urolitinas, aunque no existen datos que puedan avalar esta hipótesis a día de hoy. Otra posible explicación podría ser que la presencia del DSS disminuyera el tiempo de contacto entre bacterias y metabolitos derivados de la granada disminuyendo el efecto antimicrobiano de estos metabolitos. A pesar de estas posibles teorías, la realidad es que, aparte del estudio publicado por Larrosa *et al.* (2010b), no existen investigaciones que hayan intentado determinar el papel del DSS sobre la modulación de la microbiota y su influencia en la producción de metabolitos a partir de la granada.

En el presente estudio, la atenuación de la inflamación en la mucosa del colon, así como de la sobre-expresión generada por el DSS en los genes *c-Myc*, *Tp53* y *Ciclina D1* podría deberse a un efecto indirecto del consumo de extracto de granada. Como se ha descrito en numerosos estudios, el papel de los ETs presentes en el extracto original como responsables de los efectos biológicos es discutible. Existe una creciente evidencia que señala a las urolitinas como los principales responsables de dichos efectos (Cerdá *et al.*, 2003a; Cerdá *et al.*, 2004; Espín *et al.*, 2007b; González-Sarrías *et al.*, 2009b; González-Sarrías, 2009c; Larrosa *et al.*, 2010a; Larrosa *et al.*, 2010b). El estudio de los metabolitos derivados del consumo de extracto de granada indicó que Uro-A y la Uro-A-gluc son los metabolitos más abundantes en heces y orina, respectivamente. En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que también parecen más bioactivos que Uro-B y su glucurónido. Además, el grupo DSS-Gr generó más metabolitos en las heces que el grupo Gr, lo que parece indicar que el metabolismo de estos compuestos es diferente en condiciones de inflamación en comparación con condiciones fisiológicas normales. Estudios previamente publicados (González-Sarrías

et al., **2010a**; Larrosa *et al.*, **2010b**) demuestran las propiedades anti-inflamatorias de los metabolitos microbianos derivados de ETs, principalmente de Uro-A, Uro-B y EA. Estos resultados también apuntan a Uro-A como el principal compuesto anti-inflamatorio activo asociado al consumo de granada. Los datos aportados en este último capítulo sugieren que las propiedades anti-inflamatorias de las urolitinas y, en particular, de Uro-A puedan ser en parte debidas a efectos indirectos mediados por los SCFAs que hemos demostrado aquí son algo más elevados en las ratas que consumieron extracto de granada. No podemos descartar que el resto de metabolitos analizados y otros compuestos presentes en el extracto también participen en los efectos asociados al consumo del extracto de granada. Se necesitan más estudios que confirmen esta teoría puesto que en la actualidad no se ha investigado los posibles efectos anti-inflamatorios de metabolitos como Uro-C, trihidroxi-urolitina o de los SCFAs minoritarios.

ANEXO I. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE SCFAs POR GC-MS/MS

- Determinación de la linealidad y sensibilidad

Para determinar los parámetros de linealidad y sensibilidad, se partió de una solución stock que contenía una mezcla de los estándares de los SCFAs (concentración 20mM de cada uno de ellos) en acetato de etilo. Se preparó una curva de calibrado desde 2 μ M hasta 10 mM y se adicionó ácido 4-metil valérico a cada una de las diluciones como estándar interno (EI) (concentración final de 500 μ M) y se representó el área del pico de cada SCFA normalizada por el área del EI.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de los compuestos individuales se obtuvieron por inyecciones sucesivas de los estándares a concentraciones decrecientes y se determinaron mediante el método señal/ruido asignando al LD y al LC un valor de concentración de 3 y 10 veces, respectivamente de la señal de ruido.

Tabla Suplementaria S9.1. Parámetros analíticos para el método de análisis por GC-MS: linealidad, curva de calibración, R^2 y límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

SCFA	Ion	Rango de linealidad	Curva estándar	R^2	LD μ M (μ g/g)	LC μ M (μ g/g)
Acético	60	LC-10 mM	$y=0,0024x+1,0405$	0,9990	0,49 (0,29)	1,63 (0,98)
Propiónico	74	LC-10 mM	$y=0,0029x+0,0937$	0,9991	0,62 (0,46)	2,05 (1,52)
Isobutírico	88	LC-10 mM	$y=0,0010x+0,0446$	0,9990	4,31 (3,80)	14,28 (12,56)
Butírico	73	LC-10 mM	$y=0,0040x+0,2436$	0,9987	0,69 (0,60)	2,31 (2,04)
Isovalérico	87	LC-10 mM	$y=0,0033x+0,1650$	0,9989	1,50 (1,53)	5,00 (5,10)
Valérico	73	LC-10 mM	$y=0,0070x+0,5141$	0,9979	0,58 (0,59)	1,93 (1,97)

Como estándar interno se utilizó el ácido 4-metil valérico (ion 83). Para la generación de la curva estándar las áreas de los picos de cada SCFA se normalizaron con el estándar interno, lo que corregía la variabilidad que se pudiera generar del volumen de inyección y la respuesta del MS en los distintos pinchazos. Los LC y LD se determinaron por el método basado en la relación señal/ruido. Cada punto de la gráfica de calibración se corresponde con la media aritmética \pm DE de 3 pinchazos ($n = 3$; cada pinchazo se corresponde a 3 pinchazos de una misma réplica).

- Recuperación

La recuperación de los SCFAs se calculó adicionando una mezcla de los estándares a 3 concentraciones finales (100, 250 y 500 μM ; $n = 3$ réplicas por concentración) diluidos en agua a los sobrenadantes de las muestras fecales. Además, en el caso del ácido acético se utilizó una concentración adicional de 1000 μM . La mezcla dopada se extrajo con acetato de etilo como se ha descrito en el **apartado 2.11** del presente capítulo. Ante la imposibilidad de encontrar muestras de heces libres de SCFAs que pudiéramos utilizar como blanco para determinar la recuperación de SCFAs, se determinó la cantidad inicial de SCFAs presentes en la muestra de heces y se estudió la recuperación utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{SCFAs extraídos en la muestra fecal dopada} - \text{SCFAs presentes inicialmente en las heces}}{\text{SCFAs adicionados a la muestra}} \times 100$$

Tabla Suplementaria S9.2. Porcentajes de recuperación de SCFAs en las muestras de heces a los que se les añadieron distintas cantidades de patrones de SCFAs.

SCFA	Cantidad inicial (μM)	Cantidad adicionada (μM)	Cantidad recuperada (μM)	Porcentaje recuperación (%)
Acético	809 \pm 20	100	883 \pm 16	74 \pm 16
		250	972 \pm 26	65 \pm 11
		500	1139 \pm 30	66 \pm 6
		1000	1458 \pm 35	65 \pm 3
Propiónico	361 \pm 8	100	453 \pm 7	92 \pm 7
		250	570 \pm 8	84 \pm 3
		500	771 \pm 14	82 \pm 3
Isobutírico	79 \pm 1	100	167 \pm 2	88 \pm 2
		250	306 \pm 2	91 \pm 1
		500	548 \pm 8	94 \pm 2
Butírico	221 \pm 4	100	326 \pm 5	105 \pm 5
		250	462 \pm 5	96 \pm 2
		500	701 \pm 8	96 \pm 2
Isovalérico	145 \pm 3	100	233 \pm 4	88 \pm 4
		250	380 \pm 5	94 \pm 2
		500	638 \pm 10	99 \pm 2
Valérico	83 \pm 2	100	169 \pm 3	86 \pm 3
		250	321 \pm 6	95 \pm 2
		500	586 \pm 10	101 \pm 2

Para la determinación del % de recuperación de SCFAs en las muestras de heces se utilizó la fórmula: % recuperación = (cantidad de SCFAs cuantificados tras la extracción en la muestra fecal dopada – cantidad inicial de SCFA presentes en la muestra fecal) \times 100/(Área en la solución de etil acetato). Los resultados se muestran como la media aritmética \pm DE ($n = 3$ muestras independientes).

- **Efecto matriz**

El efecto matriz se determinó comparando la respuesta de los estándares puros de SCFAs diluidos en acetato de etilo con las de los estándares diluidos en las muestras fecales. Los estándares diluidos en acetato de etilo se analizaron directamente a las concentraciones 100, 250 y 500 μM . Por su parte, las muestras fecales se extrajeron como se indica en el **apartado 2.11** y los estándares de los SCFAs fueron adicionados a las mismas concentraciones indicadas. Todos los picos se normalizaron con el área del EI. Además, se determinó la cantidad inicial de SCFAs en las muestras fecales que se extrajeron como se ha indicado en el **apartado 2.11**. La fórmula utilizada para determinar el efecto matriz fue:

$$\% \text{ Efecto matriz} = \frac{\text{Área SCFAs extraídos en la muestra fecal dopada} - \text{Área SCFAs presentes inicialmente en las heces}}{\text{Área SCFAs en acetato de etilo}} \times 100$$

Por otro lado, las pendientes de las rectas también se utilizaron para determinar el efecto matriz, por lo que se preparó una curva patrón adicionando concentraciones conocidas de una mezcla de patrones de SCFAs a los sobrenadantes extraídos de las heces.

$$\% \text{ Efecto matriz} = \frac{\text{Pendiente muestra tras la extracción}}{\text{Pendiente en acetato de etilo}} \times 100$$

Tabla Suplementaria S9.3. Determinación del efecto matriz mediante la comparación de las pendientes de las curvas estándar obtenidas en etil acetato frente a las obtenidas en la matriz de las muestras de heces.

SCFA		Curva Estándar	Curva matriz/ acetato etilo	Efecto matriz (%)	Valor <i>p</i>
Acético	Matriz	0,00266±0,00014	1,10	110	0,107
	Acetato etilo	0,00242±0,00006			
Propiónico	Matriz	0,00313±0,00015	1,06	106	0,116
	Acetato etilo	0,00295±0,00006			
Isobutírico	Matriz	0,00113±0,00005	1,05	105	0,088
	Acetato etilo	0,00108±0,00004			
Butírico	Matriz	0,00427±0,00024	1,06	106	0,136
	Acetato etilo	0,00403±0,00016			
Isovalérico	Matriz	0,00345±0,00019	1,03	103	0,115
	Acetato etilo	0,00335±0,00010			
Valérico	Matriz	0,00730±0,00043	1,04	104	0,203
	Acetato etilo	0,00702±0,00029			

Los valores de efecto matriz = 100% indican ausencia de efecto matriz, mientras que los valores > 100% y < 100% indican aumento o disminución de la señal respectivamente.

- **Variabilidad intra-día e inter-día**

La variabilidad intra-día e inter-día se determinó utilizando una mezcla estándar de SCFAs a una concentración final de 500 µM. La mezcla se analizó 6 días distintos a razón de 5 pinchazo por día. La precisión del método analítico se expresó como la desviación estándar relativa (DER) de los tiempos de retención y las áreas relativas de los picos.

Tabla Suplementaria S9.4. Determinación de la variabilidad intra-día e inter-día expresadas como el % de la DER del tiempo de retención y las áreas relativas.

SCFA	Repetibilidad			
	Intra-día (DER %)		Inter-día (DER %)	
	Área	Tiempo de retención	Área	Tiempo de retención
Acético	2,6	0,04	5,6	0,15
Propiónico	0,9	0,02	1,1	0,11
Isobutírico	0,9	0,02	1,4	0,09
Butírico	0,3	0,02	0,8	0,08
Isovalérico	0,5	0,01	0,6	0,06
Valérico	0,4	0,01	0,8	0,06
4-metil valérico		0,01		0,04

Los valores de variabilidad se encontraban dentro de unos valores aceptables de variabilidad intra-día (0,4 – 2,6% y 0,01 – 0,04% para el área y el tiempo de retención, respectivamente) e inter-día (0,6 – 5,6% y 0,04 – 0,15% para el área y el tiempo de retención, respectivamente).

CAPÍTULO 10

Discución General y Conclusiones

10. – Discusión general y conclusiones

10.1. – Principales resultados obtenidos en esta Tesis

En la actualidad, el estilo de vida de las sociedades occidentales se caracteriza por un aumento de hábitos poco saludables entre los que se incluye el consumo de dietas con excesivo consumo de grasas saturadas y proteínas, junto con un bajo consumo de frutas y vegetales (Cordain *et al.*, 2005). Esto se ha asociado con el aumento en la incidencia de diversas patologías crónicas como las enfermedades cardiovasculares (ECVs), inflamatorias intestinales (EII), así como diferentes tipos de cáncer (Cordain *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012). La evidencia científica señala que los procesos inflamatorios juegan un papel importante en la etiología de estas enfermedades crónicas (Scrivero *et al.*, 2011) y se hipotetiza que el mantenimiento de una respuesta inflamatoria adecuada, evitando procesos de inflamación crónica, podría ayudar a evitar el desarrollo de estas enfermedades (Pan *et al.*, 2010). La dieta juega un papel clave en la modulación de los procesos inflamatorios pudiendo promoverlos o frenarlos en función de los patrones dietéticos (Wu *et al.*, 2012). Entre otros elementos de la dieta, los compuestos fenólicos abundantes en frutas y verduras, exhiben importantes propiedades anti-inflamatorias. Dentro de los compuestos fenólicos, las flavanonas de los cítricos y los elagitaninos (ETs) y el ácido elágico (EA) de la granada tienen gran interés como posibles compuestos con efectos anti-inflamatorios (Espín *et al.*, 2007b; Benavente-García *et al.*, 2008; González-Sarriás, 2009c; González-Sarriás *et al.*, 2010a; Pan *et al.*, 2010; Larrosa *et al.*, 2010a). Los mecanismos celulares y moleculares por los que este tipo de compuestos puede ejercer sus efectos anti-inflamatorios no se conocen completamente. Entre las posibles hipótesis sobre la

modulación de la respuesta inflamatoria por los compuestos fenólicos de la dieta se incluyen: i) que los metabolitos de Fase II, derivados de dichos compuestos (conjugados de diversa naturaleza formados principalmente en el tracto intestinal e hígado) y que circulan en sangre sean las moléculas activas que interaccionan con los tejidos y modulan los procesos inflamatorios, ii) que los compuestos y metabolitos derivados de los fenólicos y acumulados en el intestino interaccionen con la microbiota en el tracto digestivo modulando el papel de estos microorganismos (patógenos y/o microbiota residente) en la inflamación.

En esta Tesis Doctoral hemos abordado algunos de estos aspectos para intentar esclarecer algunos de los posibles mecanismos por los que flavanonas y ETs pueden ejercer efectos anti-inflamatorios en el organismo. Para ello hemos intentado aplicar modelos representativos de la situación *in vivo* en dos de las regiones del cuerpo humano donde el control de la respuesta inflamatoria es clave para el mantenimiento de la homeostasis y la prevención de la inflamación crónica: 1) el endotelio aórtico y 2) la mucosa intestinal. En este último caso hemos investigado tanto efectos en células humanas como en bacterias patógenas del tracto digestivo. En todos los casos, hemos intentado aplicar modelos *in vitro* lo más representativos posibles de un tejido u otro, tratándolos con los compuestos fenólicos o metabolitos derivados en condiciones que simularan las del organismo vivo, y hemos examinado algunos de los parámetros claves en la respuesta inflamatoria tanto celular como molecular. En concreto, hemos empleado los siguientes ensayos:

- i) **Entorno vascular:** células de endotelio de aorta humana tratadas con los conjugados circulantes derivados de los ETs, glucurónidos de urolitina-A (Uro-A-gluc) y urolitina-B (Uro-B-gluc), a concentraciones similares a las detectadas *in vivo* (5-15 μ M) (**capítulo 4**).

- ii) **Entorno intestinal:** miofibroblastos intestinales de colon tratados con concentraciones representativas de compuestos o metabolitos acumulados en el tracto intestinal: a) derivados de ETs, EA (1 μ M), Uro-B (5 μ M) y Uro-A (40 μ M) o una mezcla de estos metabolitos (**capítulo 5**); b) extracto de naranja rico en flavanonas y/o sus principales flavanonas (60 μ M) (**capítulo 6**).

En estos modelos hemos investigado la respuesta a los compuestos midiendo su efecto sobre dos procesos clave en inflamación: i) la adhesión de monocitos (iniciación de la inflamación) y ii) la migración de células endoteliales o fibroblastos (esencial en procesos de angiogénesis y reparación). En ambos casos hemos intentado relacionar las respuestas observadas con la regulación de algunas de las citoquinas y factores clave en la respuesta inflamatoria del organismo.

- iii) **Patógeno intestinal:** efectos inhibidores de urolitinas (Uro-A y Uro-B) y un extracto de naranja rico en flavanonas y de algunas flavanonas sobre los mecanismos de *Quorum Sensing* (QS) del patógeno intestinal *Y. enterocolitica*.

En la etapa final de esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo un ensayo comparativo en ratas sanas y con inflamación colónica inducida para determinar los efectos del consumo de un extracto de granada rico en ETs en ambas condiciones, normales y fisiopatológicas. En este ensayo hemos investigado:

- i) presencia de los metabolitos derivados de los ETs en el colon inflamado.
ii) diversos marcadores de inflamación
iii) influencia sobre la producción bacteriana de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs).

- iv) efecto sobre los niveles de expresión génica de varios marcadores moleculares relacionados con inflamación y desarrollo de cáncer colorrectal: *β-catenina*, *c-Myc*, *Ciclina D1* y *Tp53*

En la **Figura 10.1** se presenta un diagrama resumen con los resultados más significativos obtenidos en el desarrollo de estas investigaciones y que claramente manifiesta la multiplicidad, diversidad y complejidad de los efectos de los dos grupos de compuestos fenólicos investigados. Estos resultados pueden contribuir a explicar, en parte, los efectos anti-inflamatorios atribuidos a los cítricos y a la granada. Las principales **conclusiones** son:

1. – Desarrollo de un método sencillo y eficiente, utilizando un isoenzima humano para la síntesis de metabolitos glucurónidos de alta pureza en cantidades de mg y que permiten el desarrollo de estudios celulares y moleculares. En esta Tesis hemos sintetizado enzimáticamente por primera vez el glucurónido de urolitina A que es el metabolito circulante más abundante derivado del consumo de ETs.

2. – En el entorno aórtico, el metabolito microbiano de ETs, Uro-A, y su derivado conjugado glucurónido, Uro-A-gluc, reducen la capacidad migratoria del endotelio y/o la adhesión de monocitos a dicho endotelio y, por tanto, algunos de los procesos inflamatorios que acompañan al desarrollo de aterosclerosis, (Shimoi *et al.*, **2001**; Shimoi y Nakayama, **2005**).

3. – El consumo regular de frutos como cítricos y granadas ricos en los compuestos fenólicos flavanonas y ETs, respectivamente puede proporcionar concentraciones suficientes (en el rango μM) de mezclas heterogéneas de estos compuestos y/o de sus metabolitos en el intestino donde pueden ejercer una diversidad de efectos al interactuar con células de la mucosa intestinal. Las urolitinas y el extracto rico en flavanonas pueden interactuar con miofibroblastos subepiteliales

modulando su capacidad de migración y reparación de la mucosa así como su capacidad de adherir monocitos y participar en la respuesta inflamatoria en las subcapas de la mucosa. En esta Tesis hemos confirmado que las flavanonas (glicósidos) pueden permanecer intactas durante horas en el tracto intestinal y por tanto ejercer sus efectos como tales antes de ser metabolizadas por la microbiota. Además, hemos combinado el estudio de las propiedades de un extracto de naranja complejo y de sus principales constituyentes flavanonas corroborando que los efectos de estas moléculas individuales pueden ser diferentes a los de los extractos complejos debido posiblemente a sinergias e interacciones con otros elementos del extracto.

4. – Entre las moléculas implicadas en estos procesos, y reguladas por la acción de estos compuestos destacan: PGE₂, PAI-1, IL-8, CCL2 (MCP-1), moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1), factores de crecimiento (PDGF-BB, PDGF-R-β) y metaloproteinasas (MMP12). Todas estas moléculas juegan un papel clave en la regulación de la migración celular y/o la adhesión. En general, los niveles de estas moléculas se inducen por la acción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF-α o IL-1β, si bien, el status final anti- o pro-inflamatorio puede verse afectado por multitud de variables del microambiente celular (niveles de citoquinas y tiempo de exposición en las células, estado general de éstas, etc.) fenómeno que se reduce o previene por la acción de algunos de los metabolitos y compuestos fenólicos estudiados. Los resultados de estos trabajos confirman una vez más que los efectos observados en estas condiciones son, en general, bastante moderados y, consecuentemente, más difíciles de demostrar de forma estadísticamente significativa.

5. – El metabolito Uro-A, entre los ensayados, causó algunos efectos similares en la mucosa intestinal y en el endotelio vascular, reduciendo la capacidad migratoria de las células tratadas y los niveles de algunas de las moléculas implicadas, IL-8,

PDGF-BB demostrando ser una molécula más activa que Uro-B. La glucuronidación de Uro-A parece amortiguar pero no eliminar algunas de estas propiedades.

6. – Las urolitinas, el extracto rico en flavanonas y algunas de sus principales flavanonas también pueden interactuar con bacterias presentes en el intestino y en concreto pueden reducir la capacidad de algunos patógenos intestinales para producir y liberar moléculas autoinductoras de *QS*. Esto podría contrarrestar algunas de las propiedades de estas bacterias, motiles y de formación de biopelículas, esenciales durante la infección de la mucosa intestinal. Las urolitinas resultaron ser mucho más eficientes en la inhibición de *QS* que otros compuestos y extractos ya que causaron efectos similares pero a bajas concentraciones ($< 10 \mu\text{M}$). Nuestro trabajo pone de manifiesto el interés en investigar las propiedades anti-microbianas y anti-*QS* de los compuestos fenólicos, en condiciones representativas de las que ocurren del tracto intestinal, frente a patógenos intestinales.

8. – En un modelo animal de inflamación intestinal hemos corroborado el efecto preventivo del consumo regular de extracto de granada (40 mg/día/rata) durante 25 días en el desarrollo de inflamación intestinal lo que se manifestó por una mejora de diversos marcadores de inflamación investigados. Esta dosis (HED = 2 g para una persona de 70 kg de peso) carece de efectos secundarios observables. En este estudio hemos corroborado que el metabolismo de los compuestos fenólicos, y en particular de los ETs, puede verse afectado por las condiciones fisiológicas de las células o tejidos involucrados. El perfil y concentración de metabolitos que se generan en el intestino inflamado pueden ser diferentes del que se produciría en estado fisiológico normal. Además, el extracto de granada disminuyó la expresión de genes que suelen encontrarse sobre-expresados durante procesos inflamatorios y de desarrollo de cáncer colorrectal. Estos genes no fueron afectados en condiciones fisiológicas normales. Los posibles

efectos anti-inflamatorios podrían atribuirse a la acción de los metabolitos detectados a nivel intestinal, entre los que Uro-A resultó ser el más abundante. El extracto de granada también causó un incremento de SCFAs que podrían estar involucrados en los efectos anti-inflamatorios observados.

9. – En esta Tesis hemos también desarrollado y puesto a punto un método de análisis de SCFAs mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS/MS). Este método permite el análisis rápido de los SCFAs en muestras de heces de ratas y humanos. Con este método pueden analizarse un elevado número de muestras, con un bajo coste y una elevada sensibilidad utilizando pequeñas cantidades de muestra. Este método nos ha permitido demostrar que el consumo continuado de granada generaba un aumento de la producción de la mayoría de los SCFAs estudiados en condiciones normales, mientras que atenuaba la disminución de la concentración generada por el consumo de DSS.

10.2. – Aspectos críticos en relación con la aplicación de modelos *in vitro* al estudio de los efectos y mecanismos moleculares de acción de los compuestos fenólicos.

10.2.1. – Alteración de las condiciones de cultivo.

Los cultivos *in vitro* son, en general, herramientas muy útiles para asignar posibles efectos y mecanismos de acción a los compuestos fenólicos de los alimentos vegetales. Sin embargo, estos ensayos raramente reproducen las condiciones que tienen lugar en los organismos *in vivo* (Baxter *et al.*, 2009). Un aspecto crítico importante que debe tenerse en cuenta al utilizar modelos celulares es que estos ensayos son muy sensibles a cambios en las condiciones del medio que pueden afectar o dañar a las células y alterar los resultados obtenidos. Algunos parámetros esenciales para la

supervivencia celular que deben controlarse y que pueden verse modificados al adicionar al medio extractos complejos o compuestos fenólicos son el pH y la osmolaridad (Bermudez-Soto *et al*, 2007b). En uno de los estudios realizados durante la presente Tesis Doctoral, los miofibroblastos de colon se expusieron a un extracto de naranja rico en diversos compuestos y por ello creímos necesario controlar si se afectaban el pH y la osmolaridad del medio. De este modo nos aseguramos de que trabajamos con concentraciones del extracto que no alteraban estos parámetros y que permanecían dentro de los rangos tolerados por estas células. Otro factor importante en el medio de cultivo es el contenido de suero bovino fetal (SBF). Este componente es esencial para el crecimiento de las células, utilizándose una concentración óptima del 10% para la gran mayoría de las líneas celulares. Sin embargo, su composición completa no es siempre conocida y puede variar entre lotes. El SBF contiene numerosas proteínas, factores de crecimiento, hormonas etc. que pueden enmascarar algunos de los efectos objeto de investigación como por ejemplo, los cambios producidos en determinados marcadores, como citoquinas o quimioquinas, o modificar la capacidad migratoria de las células. En la bibliografía es frecuente encontrar ensayos celulares en los que las células se mantienen durante el ensayo en ausencia o a concentraciones reducidas (0.1%) de SBF. En la presente Tesis Doctoral, el ensayo de migración y la determinación de algunos marcadores relacionados como PGE₂, PAI-1, PDGF-BB o PDGF-R-β en miofibroblastos de colon se realizaron a una concentración de SBF del 0,1%. En el caso de las HAECs el análisis de IL-8, CCL-2, PAI-1, se realizó en ausencia de suero.

10.2.2. – Representatividad de la realidad *in vivo* de los ensayos *in vitro*.

La extrapolación de los efectos observados en modelos celulares *in vitro* a modelos *in vivo* animales o humanos es una tarea compleja, entre otras razones, porque los diseños experimentales *in vitro* no son adecuados y distan mucho, en algunos caso, de intentar reproducir las condiciones *in vivo*. . D'Archivio *et al.* (2010) publicaron una revisión en la que exponían algunas de las cuestiones claves de estos diseños en relación sobretudo con los temas de biodisponibilidad y metabolismo real de los compuestos fenólicos y su relevancia en el diseño y planteamiento de la mayoría de estudios *in vitro*. En la **Tabla 10.1** se resumen los principales problemas planteados en esta revisión bibliográfica y como se ha abordado en los estudios de la presente Tesis Doctoral:

PROBLEMÁTICA ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	DISEÑO DE LOS ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL
<p>Uso de concentraciones superiores a las que se pueden alcanzar a través de la dieta.</p>	<p>Nuestros estudios se han basado en estudios de biodisponibilidad (nuestros y de otros autores), y hemos utilizando concentraciones detectadas <i>in vivo</i> en animales y humanos.</p>
<p>Los compuestos que se utilizan para realizar muchos de los estudios son las agliconas o glicósidos que se encuentran en el alimento pero que frecuentemente se modifican durante el metabolismo dando lugar a metabolitos que no se conoce si son bioactivos.</p>	<p>En nuestros estudios <i>in vitro</i> hemos utilizado: i) metabolitos microbianos que se forman en el intestino por acción de la microbiota, ii) derivados glucuronidados que se forman por conjugación en el intestino o hígado, iii) extractos con mezclas de compuestos fenólicos que hemos verificado permanecen estables durante horas en el lumen intestinal.</p>
<p>Tratamiento de células o tejidos con compuestos fenólicos que en el organismo vivo no es posible que entren en contacto.</p>	<p>En nuestros estudios <i>in vitro</i>, las células se han expuesto a compuestos individuales o extractos vegetales de la siguiente manera: i) células de colon tratadas con metabolitos microbianos o extractos de compuestos que se ha demostrado alcanzan el colon, ii) células de endotelio tratadas con metabolitos glucuronidados tal y como se detectan circulando en sangre.</p>

Con frecuencia se han publicado estudios sobre los efectos de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos en condiciones fisiológicamente irrelevantes, como por ejemplo, frente a sistemas celulares internos (hígado, cerebro, pulmones,

endotelio, etc.) que nunca entrarían en contacto con dichos extractos como tales *in vivo*. En todo caso, estos extractos pueden estudiarse frente a células del tracto gastrointestinal que puede ser más representativo de la realidad (Liu *et al.*, 2003; Pacheco-Palencia *et al.*, 2008). Además estos estudios deben acompañarse de ensayos paralelos con los componentes individuales para intentar elucidar qué moléculas o mezcla de moléculas pueden ser responsables o contribuir a los efectos observados. En nuestros estudios hemos investigado:

- el efecto de una mezcla de metabolitos microbianos derivados de ETs y detectados en el intestino, a concentraciones similares a las estimadas *in vivo*. En algunos casos el efecto de esta mezcla es mayor que el de los compuestos individuales.
- el efecto de un extracto complejo y de algunos de sus componentes individuales (flavanonas) más abundantes. Los compuestos individuales, en general, exhibían efectos más moderados que el extracto completo.

Estos resultados apuntan a posibles sinergias entre las moléculas y metabolitos que pueden encontrarse a la vez en el lumen intestinal y hace aún más complejo el estudio de sus efectos.

10.2.3. – Problemática específica de los modelos celulares de inflamación.

Como se ha dicho en el punto anterior, la extrapolación de resultados entre modelos *in vitro* e *in vivo* es compleja entre otras cosas debido a las dificultades en el diseño de los ensayos *in vitro*. La interpretación de resultados depende mucho de las condiciones en las que se lleve a cabo el experimento, la línea celular que se utilice, el tiempo de duración del experimento, la composición del medio de cultivo, el estado de la células, etc. En los modelos celulares de inflamación este aspecto se complica aún

más por la necesidad de recrear una situación de inflamación que no siempre es posible y que puede variar según las condiciones. Entre otras causas, algunas de las moléculas que se emplean o estudian (citoquinas, quimioquinas, etc) tiene efectos muy diversos pudiendo actuar, por ejemplo, como anti-inflamatorias o inflamatorias o como anti-angiogénicos o pro-angiogénicos según las condiciones. En esta Tesis hemos trabajado con algunas de estas moléculas; TNF- α , PAI-1, PGE₂.

TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria que interviene en procesos de reparación de tejidos. Se ha descrito que en función de la concentración y del tiempo que las células permanecen expuestas a esta molécula, se puede promover (bajas concentraciones y cortos períodos de exposición) o disminuir (altas concentraciones y largos períodos de exposición) el proceso de reparación de tejidos (Barrientos *et al.*, **2008**). En nuestros resultados vimos como los miofibroblastos de colon CCD18-Co presentaban una capacidad de migrar diferente en función de la concentración de TNF- α utilizada (50 o 20 ng/mL) y del tiempo de tratamiento. PAI-1 y PGE₂, dos moléculas también relacionadas con el proceso de migración en los miofibroblatos, exhibieron comportamientos contrapuestos en función de las distintas condiciones utilizadas. PAI-1 aumentó su concentración independientemente de que las células aumentaran o disminuyeran su capacidad de migrar. PGE₂ aumentó su concentración cuando las células se expusieron a la citoquina IL-1 β y no lo hizo cuando se expusieron a TNF- α , a pesar de que en ambos casos la capacidad de migración de ambas células aumentó. El papel de PAI-1 en la migración no está del todo claro ya que existen estudios que indican que la migración de fibroblastos requiere de concentraciones precisas de esta molécula para una migración óptima (Buchwalter *et al.*, **2005**). Estudios recientes han descrito efectos contradictorios de PGE₂ en la migración de los miofibroblastos de

colon que podía aumentar (Iwanaga *et al.*, 2012) o disminuir (Rieder *et al.*, 2010) en función de las condiciones utilizadas en el estudio.

10.2.4. – Limitaciones de la aplicación de sistemas de análisis múltiple de marcadores (*arrays*).

La selección de biomarcadores específicos relacionados con los procesos inflamatorios, o en general con un determinado proceso o patología, es un tema complejo ya que, lógicamente, no parece existir un biomarcador único óptimo que nos permita, por ejemplo, determinar la eficacia de un compuesto frente al proceso o patología en estudio. La selección de un biomarcador debería reflejar el mecanismo molecular que regula el proceso investigado, como por ejemplo la respuesta inflamatoria, y por ello en los últimos años se han desarrollado sistemas de análisis múltiple (*arrays*) que permiten estudiar de una sola vez un grupo de proteínas o genes que están involucrados en un proceso y que podrían ser biomarcadores de ese proceso o de su modulación. A pesar de su desarrollo, mejoras, expansión y uso cada vez más cotidiano, los sistemas de análisis múltiple presentan aún limitaciones.

Uno de los principales problemas actuales de las técnicas de análisis múltiple *microarrays* de expresión génica y *antibody arrays* para proteínas, es que se trata de técnicas de elevado coste lo que limita el número de ensayos que pueden llevarse a cabo y compromete el nivel de significación estadística que puede obtenerse. Esto es especialmente relevante cuando, como en el caso de nuestros estudios y otros similares, estamos detectando cambios muy moderados en los niveles de expresión de genes y proteínas en respuesta a tratamientos con dosis bajas de los compuestos o metabolitos. A pesar de que estas herramientas ofrecen en un solo análisis una gran cantidad de información sobre un amplio rango de moléculas los datos requieren análisis complejos

con herramientas informáticas más o menos sofisticadas y la interpretación no es trivial. Actualmente, los datos de *arrays* requieren de confirmaciones posteriores con técnicas de fiabilidad y reproducibilidad aceptadas como son la RT-PCR para transcritos y ELISA o Western blot para proteínas. Esto, además de encarecer los estudios, demuestra a menudo un elevado % de resultados que luego no son confirmados (“falsos positivos”) y que pueden ser debidos a fallos de las tecnologías (por ejemplo, identificación errónea de un isomorfo o anticuerpo) o fallos del análisis (normalmente realizados con un nº bajo de muestras o réplicas y cierta subjetividad por parte del investigador). En nuestro estudio hemos podido constatar estos problemas y en algunos casos hemos confirmado los resultados de los *arrays* y en otros no. En general, cambios de expresión mayores, como por ejemplo, los inducidos por TNF- α en las células de endotelio aórtico (incremento de IL-8 y CCL-2) se confirmaron tanto por *antibody array* como por ELISA. Igualmente confirmamos por ambos métodos algunos de los efectos de los metabolitos, como la disminución significativa de CCL2 por Uro-A-gluc, o de CCL2 e IL8 por Uro-A. En otros casos como en el de PDGF-BB los resultados por ambas metodologías no coincidieron. Esto lo achacamos a posibles diferencias entre los anticuerpos usados.

10.3. – Posibles líneas de investigación futuras.

10.3.1. – Estudios celulares y moleculares.

Profundizar en el estudio de las propiedades anti-inflamatorias de metabolitos conjugados de compuestos fenólicos y, en particular, de los derivados glucurónidos de urolitinas. Los efectos de estos metabolitos deben examinarse en el conjunto de células y tejidos involucrados en la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, a nivel vascular son diversos los tipos celulares que intervienen (endotelio, musculares, fibroblastos,

macrófagos, monocitos, linfocitos, plaquetas) y, por tanto, entender cómo los metabolitos interaccionan y afectan a todas ellas contribuiría a entender los posibles efectos beneficiosos de estos compuestos. Utilizando sistemas multicelulares en combinación con análisis múltiple de moléculas reguladoras podríamos tener una visión más global de la complejidad de los posibles efectos de estos metabolitos. Estos estudios pueden (deben) ampliarse al estudio de los efectos de mezclas de metabolitos representativos de la situación *in vivo*. Por otra parte este tipo de estudios pueden aplicarse a otros sistemas celulares múltiples representativos de otras partes del organismo como por ejemplo los que participan en la respuesta inmune en el intestino, hígado y tejido adiposo.

10.3.2. – Estudios de síntesis y caracterización de metabolitos.

La línea de investigación celular y molecular debe ir acompañada a su vez de una parte importante dedicada a profundizar en métodos de síntesis y caracterización de metabolitos (glucurónidos, sulfatos, derivados metilados, etc). Aunque los procedimientos enzimáticos resultan caros por el momento, es posible optimizar su aplicación, mediante la posibilidad de inmovilizar los enzimas y aumentar así su rendimiento abaratando el coste. Estos sistemas junto con procedimientos de purificación simplificados pueden dar lugar a la producción de metabolitos de alta pureza que además son los que se producen *in vivo*. En este sentido, también sería de gran interés aplicar sistemas analíticos de alta resolución acoplados a Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para poder establecer incluso que isómeros se forman *in vivo*. Por ejemplo, en el caso del Uro-A-gluc sintetizado en esta Tesis queda aún por determinar si se producen uno o varios isómeros (la síntesis química convencional produce una mezcla al 50% de los dos regioisómeros posibles en las posiciones 3 y 8),

separarlos y purificarlos y establecer si exhiben diferentes propiedades biológicas en función de la posición del grupo glucurónido.

Por otro lado, resulta necesario confirmar y cuantificar la presencia y posible acumulación de estos metabolitos en los tejidos vivos implicados de forma específica, es decir, no solo en circulación sistémica o lumen colónico sino en tejido aórtico y mucosa intestinal, etc.

10.3.3. – Estudios relacionados con la microbiota.

En la investigación sobre los efectos de los polifenoles de la dieta y las bacterias intestinales se abren muchas oportunidades de investigación de gran relevancia para el entendimiento del papel de estos compuestos en la salud humana, y en particular sobre la respuesta inmune en el organismo y sus beneficios para la salud. A continuación se mencionan algunos temas relacionados con esta área y que se pueden aplicar a los compuestos estudiados en esta Tesis Doctoral:

- Caracterización de todos los metabolitos posibles producidos a partir de los compuestos fenólicos de la dieta. Identificación de los microorganismos responsables del metabolismo de diversos compuestos fenólicos y en particular, de aquellos implicados en el metabolismo de ETs para producir las diversas urolitinas (tema de activa investigación en nuestro grupo).
- Interacciones entre compuestos fenólicos y microbiota: Cada vez se sabe más de la interacción ‘doble-vía’ entre microbiota-fenólicos y fenólicos-microbiota, pues la microbiota puede influir de manera crítica en el metabolismo fenólico y estos compuestos afectar de manera significativa al crecimiento, a veces selectivo, de poblaciones bacterianas beneficiosas. En este sentido, cada vez hay más investigaciones sobre el diseño de preparados

dietéticos con efectos prebióticos y de probióticos específicos implicados en un efecto fisiológico o metabolito concreto.

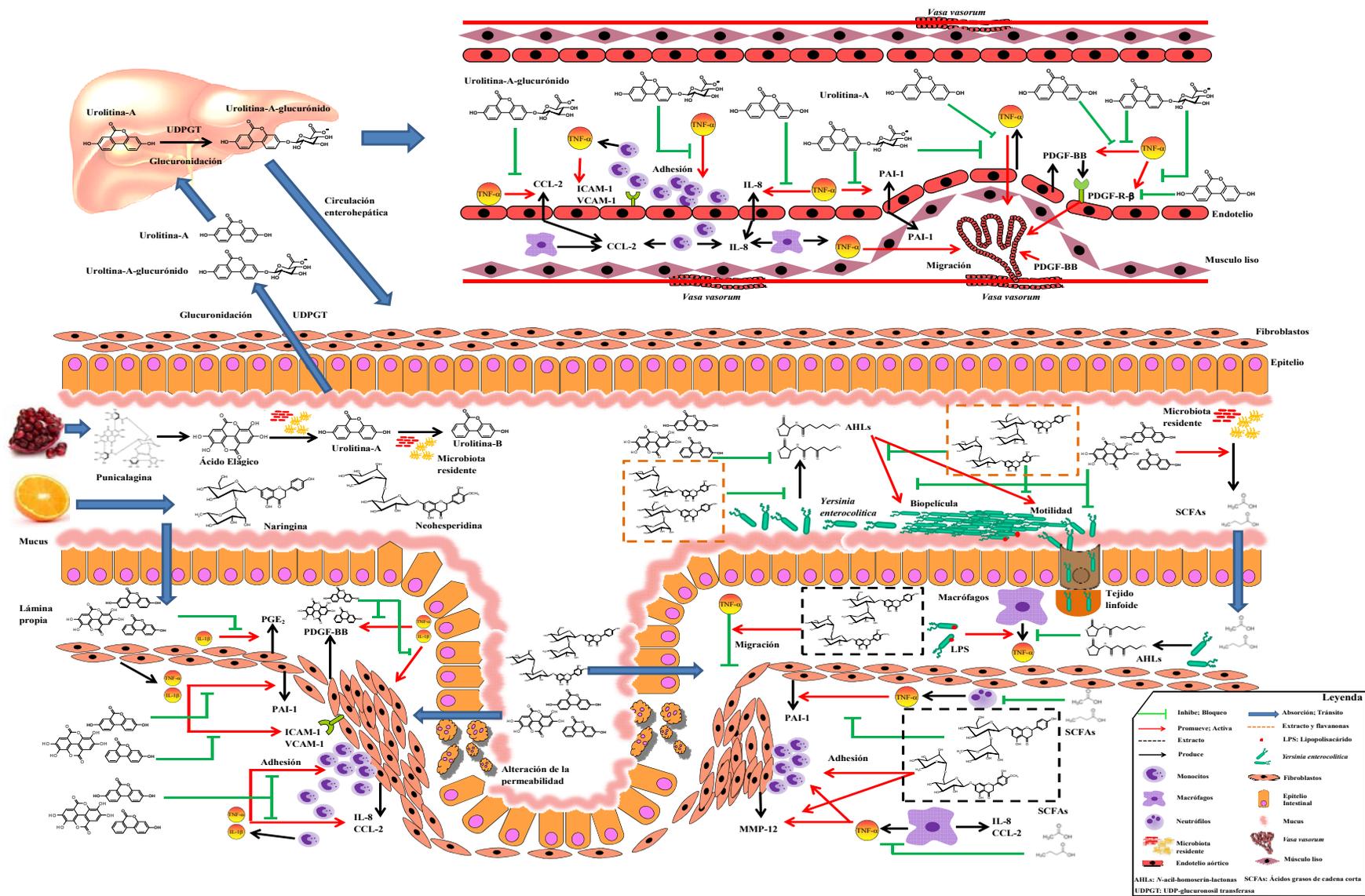
10.3.4. – Estudios relacionados con patógenos intestinales y mecanismos de QS.

La búsqueda y desarrollo de compuestos y productos naturales con actividad anti-QS tiene un elevado interés como alternativa a los antibióticos para el tratamiento frente a bacterias patógenas, en general, y en particular frente a bacterias contaminantes de alimentos. Nuestro trabajo también promueve el desarrollo de una línea de investigación para inhibir los mecanismos de QS en el tracto intestinal impidiendo o reduciendo las infecciones por patógenos intestinales con importantes repercusiones para la salud intestinal. Además de los sistemas y modelos *in vitro*, como los utilizados en esta Tesis Doctoral, sería de gran interés desarrollar métodos *in vivo* que permitiesen investigar los efectos de estos compuestos en modelos animales de infección intestinal con bacterias patógenas que utilicen el QS como sistema de comunicación.

Las bases moleculares de los mecanismos de QS no son del todo conocidas. Además de los genes estudiados en esta Tesis Doctoral, otros genes o grupos de genes pueden estar involucrados en los mecanismos de QS, como por ejemplo, el factor de transcripción Ompr o la molécula pequeña de ARN no-traducida *yenS*, ambos posiblemente involucrados en la respuesta bacteriana a agentes externos y reguladores de los procesos bacterianos de QS. El conocimiento del genoma completo de patógenos intestinales, la identificación de sus genes y el análisis múltiple de los mismos mediante técnicas de *arrays* nos permitirán conocer más a fondo los mecanismos de QS y de su inhibición por productos naturales.

Tampoco se conoce bien el papel de las moléculas señalizadoras de *QS* (AHLs) en el desencadenamiento de la respuesta inmune en la mucosa intestinal y, por tanto, también sería interesante profundizar en estos procesos y en las interacciones con los metabolitos de compuestos fenólicos.

Figura 10.1



CAPÍTULO 11

Bibliografía

11. – Bibliografía

- Aaby, K., Wrolstad, R.E., Ekeberg, D., Skrede, G., “Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; Impact of achene level and storage”, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 5156–5166.
- Abraham, C.R., Berrocal, C.B., Cisneros-Lira, J.G., Ramírez, M.M., “El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar”, *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*, 2004, 17, 215-231.
- Abreu, M.T., “Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function”, *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, 10, 131-144.
- Adams, L.S., Seeram, N.P., Aggarwal, B.B., Takada, Y., Sand, D., Herber, D., “Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signalling in colon cancer cells”, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 980-985.
- Adonizio, A., Kong, K.F., Mathee, K., “Inhibition of *Quorum sensing* –controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south Florida plant extracts”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52, 198-203.
- Ahuja, V., Tandon, R.K., “Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences”, *J. Dif. Dis.*, 2010, 11, 134-147.
- Albercht, M., Jiang, W., Kuni-Diake, J., Lansky, E.P., Commersal, L.M., Patel, A., Mansel, R.E., Neeman, I., Geldof, A.A., Campbell, M.J., “Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells”, *J. Med. Food*, 2004, 7, 274-283.

- Al-Samari, S., Suri, S., Hughes, D.A., Kroon, P.A., “Quercetin and its principal metabolites, but not myricetin, oppose lipopolysaccharide-induced hyporespondiveness of the porcine isolated coronary artery”, *Br. J. Pharmacol.*, 2011, 162, 1485-1497.
- Ameer, B., Weintraub, R.A., Johnson, J.V., Yost, R.A., Rouseff, R.L., “Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration”, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1996, 60, 34-40.
- Amre, D.K., D’Souza, S., Morgan, K., Seidman, G., Lambrette, P., Grimard, G., Israel, D., Mack, D., Ghadirian, P., Deslandres, C., Chotard, V., Budai, B., Law, L., Levy, E., Seidman, E.G., “Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn’s disease in children”, *Am. J. Gastroenterol.*, 2007, 102, 2016-2025.
- Anderson, C.A., Boucher, G., Lees, C.W., *et al.*, “Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47”, *Nat. Genet.*, 2011, 43, 246-252.
- Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin P., Waterhouse A.L., Steinberg F.M., “Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation”, *J. Nutr.*, 2001, 131, 2837–2842.
- Andoh, A., Bamba, S., Fujiyama, Y., Brittan, M., Wright, N.A., “Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow-derived stem cells to the gut regenerative response”, *J. Gastroenterol.*, 2005, 40, 1089-1099.
- Andoh, A., Bamba, S., Brittan, M., Fujiyama, Y., Wright, N.A., “Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut”, *Pharmacol. Ther.*, 2007, 114, 94-106.

- Antón Martínez, J., Ortega Gómez, A., Arranz Carrero, A., Molina Sánchez, A., Álvarez García, J.F., Moreiras Jiménez, J.L., González Blanco, P., Gutierrez Sanpedro, N., Torres García, E., “Incidencia de enfermedad inflamatoria intestinal en el área de salud de Navalmoral de la Mata (Cáceres, España) entre 2000 y 2009”, *Gastroenterol. Hepatol.*, 2010, 33, 694-699.
- Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Bruckner, M.M.C., Finlay R.B., “*Quorum sensing* in bacterial virulence”, *Microbiology*, 2010, 156, 2271-2282.
- Apostolaki, M., Armaka, M., Victorator, P., Kollias, G., “Cellular mechanism of TNF function in models of inflammation and autoimmunity”, *Curr. Dir. Autoimmun.*, 2010, 11, 1-26.
- Ardizzone S., Bianchi-Porro G., “Biologic therapy for inflammatory bowel disease”, *Drugs*, 2005, 65(16), 2253-2286.
- Arnold, G.L., Beaves, M.R., Pryjduń, V.O., Mook, W.J., “Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn’s disease”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2002, 8, 10-15
- Arroyo, A.G., Iruela-Arispe, M., “Extracellular matriz, inflammation, and the angiogenic response”, *Cardiovascular Research*, 2010, 86, 226-235.
- Atkinson S., Throup, J.P., Stewart, G.S.A.B., Williams P., “A hierarchical *quorum sensing* system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping”, *Mol. Microbiol.*, 1999, 33, 1267-1277.
- Atkinson, S., Chang, C.Y., Sockett, R.E., Cámara, M., Williams, P., “*Quorum sensing* in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility”, *J. Bacteriol.*, 2006a, 188, 1451-1461.
- Atkinson, S., Sockett, R.E., Cámara, M., Williamson, P., “*Quorum sensing* and the lifestyle of *Yersinia*”, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2006b, 8, 1-10.

- Atkinson, S., Chang, C.Y., Patrich, H.L., Buckley, Y.W., Sockett, R.E., Cámara, M., Williams, P., “Functional interplay between the *Yersinia pseudotuberculosis* YpsRI and YtbRI *quorum sensing* systems modulates swimming motility by controlling expression of *flhDC* and *fliA*”, *Mol. Microbiol.*, 2008, 69, 137-151.
- Atkinson, S., Williams, P., “Quorum sensing and social networking in the microbial world”, *J. R. Soc. Interface*, 2009, 6, 959-978.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., Hayek, T., “Pomegranate juice consumption for three years by patients with carotid arterial stenosis reduces common carotid-media thickness, blood pressure and LDL oxidation”, *Clin. Nutr.*, 2004, 23, 423-433.
- Azorín-Ortuño, M., Yañez-Gascón, M.J., Vallejo, F., Pallarés, F.J., Larrosa, M., Lucas, R., Morales, J.C., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., “Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011a, 55, 1154-1168.
- Azorín-Ortuño, M., Yañez-Gascón, M.J., González-Sarriás, A., Larrosa, M., Vallejo, F., Pallarés, F.J., Lucas, R., Morales, J.C., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., “Effects of long-term consumption of low doses of resveratrol on diet-induced mild hypercholesterolemia in pigs: a transcriptomic approach to disease prevention”, *J. Nutr. Biochem.*, 2011b, DOI: 10.1016/j.jnut-bio-2011.04.007.
- Azorín-Ortuño, M., Tesis Doctoral, “Biodisponibilidad, metabolismo y actividad cardioprotectora del resveratrol de la dieta en el cerdo. Estudios metabólicos y moleculares”, Universidad de Murcia, 2011c.

- Badimón, L., Vilahur, G., Padró, T., “Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis”, *Medicina Cardiovascular transaccional*, 2009, 62(10), 1161-78.
- Bagri, P., Ali, M., Aeri, V., Bhowmik, M., Sultana, S., “Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes”, 2009, *Food Chem. Toxicol.*, 47, 50-54.
- Bainton, N.J., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Stead, P., Gledhill, L., Hill, P.J., Rees, C.E., Winson, M.K., Salmond, G.P., Stewart, G.S., Williams, P., “A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signaling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*”, *Gene*, 1992, 116, 87-91.
- Bakkalbasi, E., Menten, O. and Artik, N., “Food ellagitannins – Occurrence, effects of processing and storage”, *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 2009, 49, 283–298.
- Bamba, S., Andoh, A., Yasui, H., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y., “Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17”, *J. Gastroenterol.*, 2003, 38, 548-554.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., Tomic-Canic, M., “Growth factors and cytokines in wound healing”, *Wound Repair Regen.*, 2008, 16, 585-601.
- Baxter, G.T., “Hurel™ – an *in vivo*-surrogate assay platform for cell-based studies”, *ATLA*, 2009, 37, 11-18.
- Becker, B.F., Heindl, B., Kupatt, C., Zahler, S., “Endothelial function and hemostasis”, *Z. Kardiol.*, 2000, 89, 160-167.
- Beddy, D.J., Watson, W.R., Fitzpatrick, J.M., O’Connell P.R., “Critical involvement of stress-activated mitogen-activated protein kinases in the regulation of

- intracellular adhesion molecule-1 in serosal fibroblasts isolated from patients with Crohn's disease", *J. Am. Coll. Surg.*, 2004, 199, 234-242.
- Benavente-García O, Castillo J, "Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity", *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 6185-6205.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing", *J Royal Stat Soc*, 1995, 57, 289-300.
- Bermúdez-Soto MJ, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, "Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion", *Food Chem*, 2007a, 102:865-874.
- Bermúdez-Soto, M.J., Larrosa, M., García-Cantalejo, J.M., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., "Up-regulation of tumor seppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenols-rich chokeberry juice", *J. Nutr. Biochem.*, 2007b, 18, 259-271.
- Bialonska, D., Kasimsetty, S.G., Khan, S., Ferreira, D., "Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay", *J. Agric. Food Chem.*, 2009a, 57, 10181-10186.
- Bialonska, D., Kasimety, S.G., Shrader, K.K., Ferreira, D., "The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) by-product and ellagitannins on the growth of human gut bacteria", *J. Agric. Food Chem.*, 2009b, 57, 8344-8349.
- Bialonska, D., Ramni, P., Kasimsetty, S.G., Muntha, K.R., Gibson, G.R., Ferreira, D., "The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota", *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 140, 175-182.

- Bianchi, F., Dall'Asta, M., Del Río, D., Mangia, A., Musci, M., Scazzina, F., "Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of short-chain fatty acids from intestinal fermentation", *Food Chem.*, 2011, 129, 200-205.
- Biasi, F., Astegiano, M., Maina, M., Lonarduzzi, G., Poli, G., "Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease", *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18, 4851-4865.
- Binder, H.J., "Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea", *Annu. Rev. Physiol.*, 2010, 72, 297-313.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Jakobsen, T.H., Phipps, R., Nielsen, A.K., Rybtke, M.T., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Høiby, N., Ciofu, O., "Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients", *PloS One*, 2010, 12, e101115.
- Bodet, C., La, V.D., Epifanio, F., Grenier, D., "Naringenin has antiinflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models", *J. Periodont. Res.*, 2008, 43, 400-407.
- Bodini, S.F., Manfredini, S., Epp, M., Valentini, S., Santori, F., "Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid", *Lett. Appl. Microbiol.*, 2009, 49, 551-555.
- Bonaccio, M., Lacoviello, L., de Gaetano, G., On behalf of the Moli-Sani Investigators, "The mediterranean diet: the reasons for a success", *Thromb. Res.*, 2011, (Epub ahead of print).
- Bonner, J.C., "Regulation of PDGF and its receptor in fibrotic diseases", *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2004, 15, 255-273.

- Bottone, E.J., “Yersinia enterocolitica; the charisma continues”, *Clin. Microbiol.*, 1997, 10, 257-276.
- Brackman, G., Defoirdt, T., Miyamoto, C., Bossier, P., Van Calenbergh, S., Nelis, H., Coenye, T., “Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivative reduce virulence in *Vibrio spp.* by decreasing the DNA-binding activity of the *quorum sensing* response regulator LuxR”, *BMC Microbiol.*, 2008, 8, 1-14.
- Brackman, G., Celen, S., Hillaert, U., van Calenbergh, S., Cos, P., Maes, L., Nelis, H.J., Coenye, T., “Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based *quorum sensing* and their effect on virulence of *Vibrio spp.*”, *PLoS ONE*, 2011, 6, e16084.
- Bradford, M.M., “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248-254.
- Bradley, J.R., “TNF-mediated inflammatory disease”, *J. Pathol.*, 2008, 214, 149-160.
- Brenmoehl, J., Miller, S.N., Hofmann, C., Vogl, D., Falk, W., Schölmerich, J., Rogler, G., “Transforming growth factor- β 1 induces intestinal myofibroblasts differentiation and modulates their migration”, *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15, 1431-1442.
- Breitling, R., “Biological microarray interpretation: the rules of engagement”, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1759, 319-327.
- Buchwalter, G., Gross, C., Wsylyk, B., “The ternary complex factor net regulates cell migration through inhibition of PAI-1 expression”, *Mol. Cell Biol.*, 2005, 25, 10853-10862.
- Buer, C.S., Imin, N., Djordjevic, M.A., “Flavonoids: new roles for old molecules”, *J. Integr. Plant Biol.*, 2010, 52, 98-111.

- Bujak, M., Frangogiannis, N.G., “The role of interleukin-1 in the pathogenesis of heart disease”, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2009, 57, 165-176.
- Cale, J.M., Lawrence, D.A., “Structure-function relationship of plasminogen activator inhibitor-1 and its potential as a therapeutic agent”, *Curr. Drug Targets*, 2007, 8, 971-981.
- Camili, A., Bassler, B.L., “Bacterial small-molecule signaling pathways”, *Science*, 2006, 311, 1113-1116.
- Carmeliet, P., Moons, L., Collen, D., “Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis”, *Cardiovasc. Res.*, 1998, 39, 8-33.
- Carmeliet, P., “Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis”, *Nat. Med.*, 2000, 6, 389-395.
- Casas-Agustench, P., Bulló, M., Salas-Salvadó, J., “Nuts, inflammation and insulin resistanse”, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2010, 19, 124-130.
- Cayci, C., Wahlquist, T.C., Seckin, S.I., Ozcan, V., Tekinay, A.B., Martens, T.P., Oz, M.C., Ascherman, J.A., “Naringenin inhibits neointimal hyperplasia following arterial reconstruction with interpositional vein graft”, *Ann. Plast. Surg.*, 2010, 64, 105-113.
- Cerdá, B., Llorach, R., Cerón, J.J., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., “Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice”, *Eur. J. Nutr.*, 2003a, 42, 18-28.
- Cerdá, B., Cerón, J.J., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., “Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic”, *J. Agric. Food Chem.*, 2003b, 51, 3493-3501.
- Cerdá, B., Espín, J.C., Parra, S., Martínez, P., Tomás-Barberá, F.A., “The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into

- bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans”, *Eur. J. Nutr.*, 2004, 43, 205-220.
- Cerdá, B., Periago, P., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., “Identification of urolithin-A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds”, *J. Agric. Food Chem.*, 2005a, 53, 5571-5576.
- Cerdá, B., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., “Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability”, *J. Agric. Food Chem.*, 2005b, 53, 227-235.
- Cerdá, B., Tesis Doctoral, “Biodisponibilidad, metabolismo y bioactividad de elagitaninos y ácido elágico de la granada y otros alimentos vegetales: estudios en animales modelo y humanos”, Universidad de Murcia, 2005c.
- Cerdá, B., Soto, M.C., Albaladejo, M.D., Martínez, P., Sánchez-Gascón, F., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., “Pomegranate juice supplementation in COPD: a 5-week randomised, double blind, placebo-controlled trial”, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2006, 60, 245–253.
- Chakravorty, D., Kumar, K.S.N., “Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria fibroblasts favors neutrophil migration and peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1453, 261-272.
- Chandran, P., Satthaporn, S., Robins, A., Eremi, O., “Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II)”, *Surgeon.*, 2003, 1(3), 125-136.

- Chapman-Kiddell, C.A., Davies, P.S.W., Gillen, L., Radford-Smith, G.L., “Role of diet in the development of inflammatory bowel disease”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2010, 16, 137-151.
- Charlton, T.S., de Nys, R., Netting, A., Kumar, N., Hentzer, M., Givskov, M., Kjelleberg, S., “A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: Application to a model bacterial biofilm”, *Environ. Microbiol.*, 2000, 2, 530-541.
- Chen, J.W., Chen, Y.H., Lin, F.Y., Chen, Y.L., Lin, S.J., “Ginkgo biloba extract inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced reactive oxygen species generation, transcription factor activation, and cell adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003, 23, 1559-1566.
- Chetty, A., Davis, P., Infeld, M., “Effect of elastase on the directional migration of lung fibroblasts within a three-dimensional collagen matrix”, *Exp. Lung Res.*, 1995, 21, 889-899.
- Chhabra, S.R., Harty, C., Hooi, D.S., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard, D.I., Bycroft, B.W., “Synthetic analogues of the bacterial signal (*quorum sensing*) molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as a immune modulators”, *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 97-104.
- Chong, Y.M., Yin, W.F., Ho, C.Y., Mustafa, M.R., Hadi, A.H., Awaing, K., Narrima, P., Koh, C.L., Appleton, D.R., Chan, K.G., Malabaricone C from *Myristica cinnamomea*, exhibits anti-*quorum sensing* activity, *J. Nat. Prod.*, 2011, 74, 2261-2264.

- Choo, J.H., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., “Inhibition of bacterial *quorum sensing* by vanilla extract”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2006, 42, 637-641.
- Cianchi, F., Cortesini, C., Schiavone, N., Perna, F., Magnelli, L., Fanti, E., Bani, D., Messerini, L., Valentina, F., Perigli, G., Capaccioli, S., Masini, E., “The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer”, *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 6807-6815.
- Clifford, M.N. and Scalbert, A., “Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden”, *J. Sci. Food Agric.*, 2000, 80, 1118–1125.
- Comalada, M., Ballester, I., Bailon, E., Sierra, S., Xaus, J., Galvez, J., de Medina, F.S., Zarzuelo, A., “Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship”, *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 72, 1010-1021.
- Cooper, H.S., Murthy, S., Kido, K., Yoshitake, H., Flanigan, A., “Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, β -catenin and p53 expression and the role of inflammation”, *Carcinogenesis*, 2000, 21, 757-768.
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O’Keefe, J.H., Brand-Miller, J., “Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81, 341-354.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., Cortot, A., “Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases”, *Gastroenterology*, 2011, 140, 1785-1794.

- Crespo, M.E., Gálvez, J., Cruz, T., Ocete, M.A., Zarzuelo, A., “Antiinflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS”, *Planta Med.*, 1999, 65, 651-653.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, N., “Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health”, *Nat. Prod. Rep.*, 2009, 26, 1001-1043.
- Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E.G., Ungvari, Z., “Inflammation and endothelial dysfunction during aging: Role of nf-kappab”, *J. Appl. Physiol.*, 2008, 105, 1333-1341.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C-P., Macfarlane, G.T., “Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood”, *Gut.*, 1987, 28, 1221-1227.
- Czajkowski, R., Jafra, S., “Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules”, *Acta Biochim. Pol.*, 2009, 56(1), 1-16.
- Czekay, R.P., Wilkins-Port, C.E., Higgins, S.P., Freytag, J., Overstreet, J.M., Klein, R.M., Higgins, C.E., Samarakoon, R., Higgins, P.J., “PAI-1: an integrator of cell signalling and migration”, *Int. J. Cell Biol.*, 2011, doi: 10-1155/2011/562481.
- Danese, S., Fiocchi, C., “Ulcerative colitis”, *N Engl J Med*, 2011, 365-1716-1725.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., “Quorum sensing and swarming migration in bacteria”, *Microbiol. Rev.*, 2004, 28, 261-289.
- D’Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovanni, C., Masella, R., “Polyphenols, dietary sources and bioavailability”, *Ann. Ist. Super Sanità*, 2007, 43(4), 348-361.

- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R., "Bioavailability of the polyphenols: status and controversies", *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, 11, 1321-1342.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm", *Science*, 1998, 280, 295-298.
- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P.J., Carmeliet, P., "Mechanism of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009, 29, 639-649.
- Dejana E., Tournier-Lasserre, E., Weinstein, B.M., "The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications", *Developmental Cell*, 2009, 16, 209-211.
- Delavary, B.M., van der Verr, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B., Beelen, R.H.J., "Macrophages in skin injury and repair", *Immunobiology*, 2011, 216, 753-762.
- Dellas, C., Loskutoff, D.J., "Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease", *Thromb. Haemost.*, 2005, 93, 631-640.
- Deshmane, S., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E., "Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): an overview", *J. Interferon Cytokine Res.*, 2009, 29, 313-326.
- Diebold, I., Kraicun, D., Bonello, S., Görlach, A., "The PAI-1 paradox in vascular remodelling", *Thromb. Haemost.*, 2008, 100, 984-991.
- Dixon, R.A., Steele, C.L., "Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering", *Trends Plant Sci.*, 1999, 4, 394-400.

- Dixon, R.A., Pasinetti, G.M., “Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience”, *Plant Physiol.*, 2010, 154, 453-457.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., Wood, T.K., “Temporal gene expression in *E. coli* K-12 biofilms”, *Environ. Microbiol.*, 2007, 9, 332-346.
- Dong, D., Shao, X., Deng, N., Zhang, Z., “Gene expression variation are predictive for stochastic noise”, *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39, 403-413.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., “Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganism”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, 15, 167-193.
- Doyle, B., Griffiths, L.A., “The metabolism of ellagic acid in the rat”, *Xenobiotica*, 1980, 10, 247-256.
- Drazen, J.M., Israel, E., O’Byrne, P.M., “Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway”, *N. Engl. J. Med.*, 1999, 340, 197-206.
- D’Souza, S., Levy, E., Mack, D., Israel, D., Lamberte, P., Ghadirian, P., Deslandres, C., Morgan, K., Seidmen, E.G., Amre, D.K., “Dietary patterns and risk for Crohn’s disease in children”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2008, 14, 367-373.
- Dunay, I.R., Sibley, L.D., “Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*”, *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, 22, 461-466.
- Duerr, R.H., “Genome-wide association studies herald a new era of rapid discoveries in inflammatory bowel disease research”, *Gastroenterology*, 2007, 132, 2045-2049.
- Durán, M., Faljoni-Alario, A., Durán, N., “*Chromobacterium violaceum* and its important metabolites-review”, *Folia Microbiol.*, 2010, 55, 535-547.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., “Diversity of the human intestinal microbiota flora”, *Science*, 2005, 308, 1635-1638.

- Eckburg, P.B., Relman, A.R., “The role of microbes in Crohn’s disease”, *Clinical Infectious Disease*, 2007, 44, 256-262.
- Edward, V., Loftus, J.R., “Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences”, *Gastroenterology*, 2004, 126, 1504-1517.
- Eisen, M.B., Brown, P.O., “DNA arrays for analyses of gene expression”, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 179-205.
- El Mohsen, M.A., Marks, J., Kuhnle, G., Rice-Evans, C., Moore, K., Gibson, G., Debnam, E., Srail, S.K., “The differential tissue distribution of the citrus flavanone naringenin following gastric instillation”, *Free Radic. Res.*, 2004, 38(12), 1329-1340.
- Elias, D.A., Tollaksen, S.L., Kennedy, D.W., Mottaz, H.M., Giometti, C.S., McLean, J.S., Hill, E.A., Pinchuk, G.E., Lipton, M.S., Fredrikson, J.K., Gorby, Y.A., “The influence of cultivation methods on *Shewanella oneidensis* physiology and proteome expression”, *Arch. Microbiol.*, 2008, 189, 313-324.
- Enzerink, A., Vaheri, A., “Fibroblasts activation in vascular inflammation”, *J. Thromb. Haemost.*, 2011, 9, 619-626.
- Esper, R.J., Nordaby, R.A., Vilariño, J.O., Paragano, A., Cacharrón, J.L., Machado, R.A., “Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal”, *Cardiovasc. Diabetol.*, 2006, 5, 1-18.
- Espín, J.C., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., “Nutraceuticals: Facts and fiction”, *Phytochemistry*, 2007a, 68, 2986-3008 .
- Espín, J.C., González-Barrio, R., Cerdá, B., López-Bote, C., Rey, A.I., Tomás-Barberán, F.A., “The Iberian pig as a model to clarify obscure points in the

- bioavailability and metabolism of allagitanins in humans”, *J Agric Food Chem*, 2007b, 55, 10476-10485.
- Fajardo, L.F., Kwan, H., Kowalski, J., Prionas, S.D., Allison, A.C., “Dual role of tumor necrosis factor- α in angiogenesis”, *Am. J. Pathol.*, 1992, 140, 539-544.
- Fava, F., Danesa, S., “Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe?”, *World J. Gastroenterol.*, 2001, 17(5), 557-566.
- Ferguson, L.R., Shelling, A.N., Browning, B.L., Huebner, C., Petermann, I., “Genes, diet and inflammatory bowel disease”, *Mutat. Res.*, 2007, 622, 70-83.
- Ferguson, L.R., “Nutrigenomics and inflammatory bowel disease”, *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 2010, 6, 573-583.
- Ferrazzano, G.F., Amato, I., Aniello, I., Zarrelli, A., Pinto, G., Pollio, A., “Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review”, *Molecules*, 2011, 16, 1468-1507.
- Fitzpatrick, F.A., Aguirre, R., Pike, J.E., and Liconl, F.H., “The stability of 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂”, *Prostaglandins*, 1980, 19, 917-931.
- Folcher, M., Gaillard, H., Nguyen, L.T., Nguyen, K.T., Lacroix, P., Bamas-Jacques, N., Rinkel, M., Thompson, C.J., “Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of superoxide dismutase”, *J. Biol. Chem.*, 2001, 47, 44297-44306.
- Fraga, C.G., Otezia, P.I., “Dietary flavonoids: role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signalling”, *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, 51, 813-823.
- Frangogiannis, N.G., Smith, C.W., Entman, M.L., “The inflammatory response in myocardial infarction”, *Cardiovasc. Res.*, 2002, 53, 31-47.

- Franke, A.A., Cooney, R.V., Henning, S.M., Custer, L.J., “Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans”, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 5170-5178.
- Fraser, G.M., Hughes, C., “Swarming motility”, *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, 2, 630-635.
- Frey, R.L., He, L., Cui, Y., Decho, A.W., Kawaguchi, T., Ferguson, P.L., Ferry, J.L., “Reaction of N-acylhomoserine lactones with hydroxyl radicals: Rates, products, and effects on signaling activity”, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44, 7465-7469.
- Friedl, P., Bröcker, E.B., “The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix”, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, 57, 41-46.
- Fuhrman, B., Volkova, N., Aviram, M., “Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies *in vitro* and in diabetic patients”, *Nutr.*, 2010, 26, 359-366.
- Fumeaux, R., Menozzi-Smarrito, C., Stalmach, A., Munari, C., Kraehenbuehl, K., Steiling, H., Crozier, A., Williamson, G., Barron, D., “First synthesis, characterization, and evidence for the presence of hydroxycinnamic acid sulfate and glucuronide conjugates in human biological fluids as a result of coffee consumption”, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, 8, 5199-5211,
- Galkina, E., Ley, K., “Immune and inflammatory mechanism of atherosclerosis”, *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, 27, 165-197.
- Gálvez, J., Rodríguez-Cabezas, E., Zarzuelo, A., “Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2005, 49, 601-608.

- Gamaro, G.D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P., Ardenghi, P., “Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats”, *ISRN Pharmacol.*, 2011, doi:10.5402/2011/451682.
- García-Villalba, R., Giménez-Bastida, J.A., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., Larrosa, M., “Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples”, *J. Sep. Sci.*, 2012, DOI: 10.1002/jssc.201101121
- Gareau M.G., Sherman P.M., Walker W.A., “Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease”, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2010, 7, 503–514.
- Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK, “Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin”, *Phytoth Res*, 2001, 15 (8):655-669.
- Gaziano, T.A., Bitton, A., Anand, S., Abrahams-Gessel, S., Murphy, A., “Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries”, *Curr Probl Cardiol*, 2010, 35(2), 72-115.
- Gentschew, L., Ferguson, L.R., “Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2012, 56, 524-535.
- Geske, G.D., O’Neill, J.C., Blackwell, H.E., “Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria”, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37(7), 1432-1447.
- Ghosh, A.K., Vaughan, D.E., “PAI-1 in tissue fibrosis”, *J. Cell Physiol.*, 2012, 227, 493-507.
- Ghoshal, U.C., Ranjan, P., “Post-infectious irritable bowel disease syndrome: the past, the present and the future”, *Gastroenterology*, 2011, 26, 94-101.

- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kadder, A.A., “Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing”, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 4581–4589.
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E., “Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome”, *Science*, 2006, 312, 1355-1359.
- Giménez-Bastida, J.A., Martínez-Florensa, M., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., “A citrus extract containing flavanones represses plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression and regulates multiple inflammatory, tissue repair, and fibrosis genes in human colon fibroblasts”, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 9305-9315.
- Giménez-Bastida, J.A., Truchado, P., Larrosa, M., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., Allende, A., García-Conesa, M.T., “Urolithins, ellagitannin metabolites produced by colon microbiota, inhibit *quorum sensing* in *Yersinia enterocolitica*: phenotypic response and associated molecular changes”, *Food Chem.*, 2011, doi: 10.1016/1.foodchem.2011.12.003.
- Giménez-Bastida, J.A., González-Sarrías, A., Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., García-Conesa, M.T., “Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- α induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2012, (in press).
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Morselli, C., Romagnoli, R., Campieria, M., “Management of inflammatory bowel disease: does rifaximin offer any promise?”, *Chemotherapy*, 2005, 51, 96-102.

- Girenavar, B., Cepeda, M.L., Soni, K.A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D., Patil, S.B., “Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signalling and biofilm formation in bacteria”, *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 125, 204-208.
- Glabasnia, A., Hofmann, T., “Sensory directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines”, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 3380–3390.
- Gonçalves, B., Borges, O., Costa, H.S., Bennet, R., Santos, M., Silva, A.P., “Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativum* Mill.) upon cooking: Proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics”, *Food Chem.*, 2010, 122, 154–160.
- Gonzales, R.J., Ghaffari, A.A., Duckles, S.P., Krause, D.N., “Testosterone treatment increases thromboxane function in rat cerebral arteries”, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005, 289, H578-585.
- González, J.E., Keshavan, N.D., “Messing with bacterial quorum sensing”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2006, 70, 859-875.
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., Sánchez de Medina, F., “Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation”, *Crit. Rev. Food Sci Nutr.*, 2011, 51, 331-362.
- González-Barrio, R., Truchado, P., Ito, H., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., “UV and MS identification of urolithins and nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals”, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 1152-1162.

- González-Gallego, J., García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J., “Fruit polyphenols, immunity and inflammation”, *Br. J. Nutr.*, 2010, 104, S15-S27.
- González-Manzano, S., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C., Dueñas, M., “Preparation and characterization of catechin sulfates, glucuronides, and methylethers with metabolic interest”, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 1231-1238.
- González-Molina E, Domínguez-Perles R, Moreno D A, García-Viguera C, “Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health”, *J. of Pharm. And Biom. Anal.*, 2010, 51, 327-345.
- González-Sarrías, A., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., “Gene expresión, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009a, 53, 686-698.
- González-Sarrías, A., Azorín-Ortuño, M., Yáñez-Gascón, M.J., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., “Dissimilar *in vitro* and *in vivo* effects of ellagic acid and its microbiota-derived metabolites, urolithins, on the cytochrome P450 1A1”, *J. Agric. Food Chem.*, 2009b, 57, 5623-5632.
- González-Sarrías A., Tesis Doctoral, “Metabolismo y distribución en tejidos de las urolitinas generadas *in vivo* a partir de la granada. Efectos antiproliferativos y anti-inflamatorios: expresión génica y mecanismos de acción”, Universidad de Murcia, 2009c.
- González-Sarrías, A., Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A., Dolaro, P., Espín, J.C., “NF- κ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic

- acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts”, *Br. J. Nutr.*, 2010a, 104(4), 503-512.
- González-Sarrías, A., Giménez-Bastida, J.A., García-Conesa, M.T., Gómez-Sánchez, M.B., García-Talavera, M.V., Gil-Izquierdo, A., Sánchez-Álvarez, C., Fontana-Compiano, L.O., Morga-Egea, J.P., Pastor-Quirante, F.A., Martínez-Díaz, F., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., “Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2010b, 54, 311-322.
- Göss, M., Herrmann, J., Tang, H., Versari, D., Galili, O., Mannheim, D., Rajkumar, S.V., Lerman, L.O., Lerman, A., “Prevention of vasa vasorum neovascularization attenuates early neointima formation in experimental hypercholesterolemia”, *Basic Res. Cardiol.*, 2009, 104, 695-706.
- Gossiau, A., Li, S., Ho, C.-T., Chen, K.Y., Rawson, N.E., “The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2001, 55, 74-82.
- Goto, Y., Kiyono, H., “Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system”, *Immunol. Rev.*, 2012, 245, 147-163.
- Greenstein, R.J., “Is Crohn’s disease caused by a Mycobacterium? Comparasions with leprosy, tuberculosis and Johne’s disease”, *Lancet. Infect. Dis.*, 2003, 3, 507-514.
- Guo, W., Wise, M.L., Williams-Collins, F., Meydani, M., Avenanthramides, polyphenols from oats, inhibit IL-1 β -induced NF- κ B activation in endothelial cells, *Free Radical Biology & Medicine*, 2008, 44, 415-429.

- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., “Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens”, *Trends Microbiol.*, 2005, 13, 7-10.
- Hamuro, M., Polan, J., Mohan, N., Mohan, S., “High glucose induced nuclear factor kappa B mediated inhibition of endothelial cell migration”, *Atherosclerosis*, 2002, 162, 277-287.
- Han, D., Fraser, A.G., Dryland, P., Ferguson, L.R., “Environmental factors in the development of chronic inflammation a case-control study on risk factors for Crohn’s disease within New Zealand”, *Mutat. Res.*, 2010, 690, 116-122.
- Handley, S.A., Newberry, R.D., Miller, V.L., “*Yersinia enterocolitica* invasin-dependent and invasin-independent mechanism of systemic dissemination”, *Infect. Immun.*, 2005, 73, 8453-8455.
- Hansen, R., Thomson, J.M., El-Omar, E.M., Hold, G.L., “The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease”, *J. Gastroenterol.*, 2010, 45, 266-276.
- Haraoui, B., Liu, P.P., Papp, K.A., “Managing cardiovascular risk in patients with chronic inflammatory diseases”, *Clin. Rheumatol.*, 2012, [Epub ahead of print].
- Hardie, K.R., Heurlier, K., “Establishing bacterial communities by ‘word of mouth’: LuxS and autoinducer 2 in biofilm development”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, 6, 635-643.
- Hardman, A.M., Stewart, G.S., Williams, P., “*Quorum sensing* and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria”, *A. van Leeuw. J. Microb.*, 1998, 74, 199-210.

- Henning, S.M., Seeram, N.P., Zhang, Y., Li, L., Gao, K., Lee, R.P., Wang, D.C., Zerling, A., Karp, H., Thames, G., Kotlerman, J., Li, Z., Heber, D., “Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum”, *J. Med. Food*, 2010, 13, 116-122.
- Henningsson, A.M., Björck, I.M.E., Nyman, G.L., “Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats”, *J. Nutr.*, 2002, 132, 3098-3104.
- Henningsson, A.M., Margareta, E., Nyman, G.L., Björck, I.M.E., “Short-chain fatty acid content in the hindgut of rats fed various composite foods and commercial dietary fibre fractions from similar sources”, *J. Sci. Food Agric.*, 2002, 82, 385-393.
- Hardman, A.M., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., “*Quorum sensing* and cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 74, 199-210.
- Heidenreich, R., Röcken, M., Ghoreschi, K., “Angiogenesis drives psoriasis patogénesis”, *Int J Exp Pathol.*, 2009, 90, 232–248.
- Herber, D., “Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins”, *Cancer Lett.*, 2008, 269, 262-268.
- Higgins, D.A., Pomianek, M.E., Kraml, C.M., Taylor, R.K., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., “The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production”, *Nature*, 2007, 450, 883-886.

- Hijonosa del Val, J., “Old-age inflammatory bowel disease onset: a different problem?”, *World Journal of Gastroenterology*, 2011, 17(22), 2734-2739.
- Himmel, M.E., Hardenberg, G., Piccirillo, C.A., Steiner, T.S., Levings, M.K., “The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease”, *Immunology*, 2008, 125(2), 145-153.
- Hindryckx, P., Waeytens, A., Laukens, D., Peeters, H., Van Huysse, J., Ferdinande, L., Carmeliet, P., De Vos, M., “Absence of placental growth factor blocks dextran sodium sulphate-induced colonic mucosal angiogenesis, increases mucosal hypoxia and aggravates acute colonic injury”, *Lab. Invest.*, 2010, 90, 566-576.
- Hirata, A., Murakami, Y., Shoji, M., Kadoma, Y., Fujisawa, S., “Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression”, *Anticancer Res.*, 2005, 25, 3367-3374.
- Hoffmann, R., Erp, K., Trülzsch, K., Heesemann, J., “Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*”, *Cell. Microbiol.*, 2004, 6, 377-390.
- Hollman, P.C.H., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., Vidry, S., “The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established”, *J. Nutr.*, 2011, 141, 989S-1009S.
- Hooi, D.S., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Williams, P., Pritchard, D.I., “Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules”, *Infect. Immun.*, 2004, 72, 6463-6470.
- Hosono Honda, N., Kimura, S., Tateda, K., Horikawa, M., Ueda, C., Ishii, Y., Ishiguro, M., Miyairi, S., Yamaguchi, K., “Roles of *Pseudomonas aeruginosa* autoinducers and their degradation products, tetramic acids, in bacterial

- survival and behaviour in ecological niches”, *Microbes Environ.*, 2011, 26, 160-164.
- Hou, J.K., Abraham, B., El-Seraq, H., “Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature”, *Am. J. Gastroenterol.*, 2011, 106, 563-573.
- Hristov, M., Weber, C., “Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis”, *Thromb. Haemost.*, 2011, 106, 757-762.
- Huang, S.T., Wang, C.Y., Yang, R.C., Wu, H.T., Yang, S.H., Cheng, Y.C., Pang, J.H., “Ellagic acid, the active compound of *Phyllanthus urinaria*, exerts in vivo anti-angiogenic effect and inhibits MMP-12 activity”, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2009, XX, 1-11.
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., Polster, J., “Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and *quorum-sensing*”, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2003, 58, 879-884.
- Iannitti, T., Palmieri, B., “Inflammation and genetics: an insight in the centenarian model”, *Hum. Biol.*, 2011, 83, 531-559.
- Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kira, M., Sotozono, C., Kinoshita, S., “Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea”, *Prog. Retin Eye Res.*, 2000, 19, 113-129.
- Ionnades, C., Lewis, D.F., “Cytochromes P450 in the bioavailability of chemicals”, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004, 4, 1767-1788.
- Irie, Y., Parsek, M.R., “Quorum sensing and microbial biofilms”, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2008, 322, 67-84.

- Ishimoto, H., Shibata, M., Myojin, Y., Ito, H., Sugimoto, Y., Tai, A., Hatano, T., “*In vivo* anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin-A”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, 21, 5901-5904.
- Ishizawa, K., Yoshizumi, M., Kawai, Y., Terao, J., Kihira, Y., Ikeda, Y., Tomita, S., Minakuchi, K., Tsuchiya, K., Tamaki, T., “Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against atherosclerosis”, *J. Pharmacol. Sci.*, 2011, 115, 466-470.
- Ivanov, A.I., Parkos, C.A., Nusrat, A., “Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation”, *Am. J. Pathol.*, 2010, 177, 512-524.
- Ivanov, I.I., Littman, D.R., “Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria”, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011, 14(1), 106-114.
- Iwanaga, K., Okada, M., Murata, T., Hori, M., Ozaki, H., “Prostaglandin E2 promotes wound-induced migration of intestinal subepithelial myofibroblasts via EP2, EP3, and EP4 prostanoid receptor activation”, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2012, 340, 604-611.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., “Phase II drug metabolizing enzymes”, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010, 154(2), 103-116.
- Jacobi, C.A., Bach, A., Eberl, L., Steidle, A., Heesemann, J., “Detection of *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone in mice infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O8”, *Infect. Immun.*, 2003, 71, 6624-6626.
- Jobson, T.M., Billington, C.K., Hall, I.P., “Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation”, *J. Clin. Invest.*, 1998, 101, 2650-2657.

- Jagielska J, Kapopara PR, Salguero G, Scherr M, Schütt H, Grote K, Schieffer B, Bavendiek U., “Interleukin-1 β Assembles a Proangiogenic Signaling Module Consisting of Caveolin-1, Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6, p38-Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), and MAPK-Activated Protein Kinase 2 in Endothelial Cells”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2012, [Epub ahead of print]
- Johannes, K.H.M., Scharl, M., Miller, S.N., Brenmoehl, J., Hausmann, M., Kellermeier, S., Schölmerich, J., Rogler, G., “Specific differences in migratory function of myofibroblasts isolated from crohn’s disease fistulae and strictures”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2011, 17, 202-212.
- Johanningsmeier, S.D., Harris, G.K., “Pomegranate as a functional food and nutraceutical source”, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2011, 2, 181-201.
- Kaferstein, H., “Fosensic relevance of glucuronidation in phase-II-metabolism of alcohols and drugs”, *Legal Med.*, 2009, 11, 522-526.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, m., Ridder, F., Richling, E., “Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion?”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, 50, 418-423.
- Kanaze, F.I., Bounartzi, M.I., Georgarakis, M., Niopas, I., “Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects”, *Eur. J. Nutr.*, 2007, 61(4), 472-7.
- Kanno, S., Shouji, A., Romizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Ujibe, M., Obara, Y., Nakahata, N., Ishikawa, M., “Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages”, *Life Sci.*, 2006, 78, 673-681.

- Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J., Aviram, M.,
“Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage
lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of
atherosclerosis”, *J. Nutr.*, 2001, 131, 2082-2089.
- Karrison, S., Namberg, E., Fjaeraa, C., Wijkander, J., “Ellagic acid inhibits
lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of
prostaglandin E2 in human monocytes”, *Br. J. Nutr.*, 2010, 103, 1102-1109.
- Kaser A., Zeissig, S., Blumberg, R.S., “Inflammatory bowel disease”, *Annu. Rev.
Immunol.*, 2010, 28, 573-621.
- Katagiri, F., Glazebrook, J., “Overview of mRNA expression profiling using
microarrays”, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2004, chapter 22, unit 22.4.
- Kato, H., “Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway
inhibitor: Basic and clinical aspects”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002,
22, 539-548.
- Kawaguchi, K., Kikuchi, S., Hasunuma, R., Maruyana, H., RyII, R., Kumazawa, Y.,
“Suppression of infection-induced endotoxin shock in mice by a citrus flavanones
naringin”, *Planta Med.*, 2004a, 70, 17-22.
- Kawaguchi K, Kikuchi S, Hasunuma R, Maruyama H, Yoshikawa T, Kumazawa Y, “A
citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in
mice”, *Biol Pharm Bull*, 2004b, 27(5), 679-683.
- Kawaguchi, K., Maruyana, H., Kometani, T., Kumazawa, Y., “Suppression of collagen-
induced arthritis by oral administration of the citrus flavonoid hesperidin”,
Planta Med., 2006, 72, 477-479.

- Kaway, Y., “Immunochemical detection of food-derived polyphenols in the aorta: macrophages as a major target underlying the anti-atherosclerosis activity of polyphenols”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75, 609-617.
- Kelloff, G.J., Lippman, S.M., Dannenberg, A.J., Sigman, C.C., Pearce, H.L., Reid, B.J., Szabo, E., Jordan, V.C., Spitz, M.R., Mills, G.B., Papadimitrakopoulou, V.A., Lotan, R., Aggarwal, B.B., Bresalier, R.S., Kim, J., Arun, B., Lu, K.H., Thomas, M.E., Rhodes, H.E., Brewer, M.A., Follen, M., Shin, D.M., Parnes, H.L., Siegfried, J.M., Evans, A.A., Blot, W.J., Chow, W.H., Blount, P.L., Maley, C.C., Wang, K.K., Lam, S., Lee, J.J., Dubinett, S.M., Engstrom, P.F., Meyskens, F.L. Jr., O’Shaughnessy, J., Hawk, E.T., Levin, B., Nelson, W.G., Hong, W.K., “Progress in chemoprevention drug development. The promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer—a plan to move forward”, *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 3661-3697.
- Kerr, T.A., Ciorba, M.A., Matsumoto, H., Davis, V.R., Luo, J., Kennedy, S., Xie, Y., Shaker, A., Dieckgraefe, B.K., Davidson, N.O., “Dextran sodium sulfate inhibition of real-time polymerase chain reaction amplification: a poly-A purification solution”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2012, 18, 344-348.
- Khurana, R., Simons, M., Martín, J.F., Zazhery, I.C., “Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal”, *Circulation*, 2005, 112, 1813-1824.
- Kim, E.C., Zhu, Y., Andersen, V., Sciaky, D., Cao, H.J., Meekins, H., Smith, T.J., Lance, P., “Cytokine-mediated PGE₂ expression in human colonic fibroblasts”, *Am. J. Physiol.*, 1998, 275, C998-C994.
- Kim, C., Kim, J., Park, H.Y., Park, H.J., Lee, J.H., Kim, G.K., Yoon, J., “Furanones derivatives as quorum-sensing antagonist of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 80, 37-47.

- Knet, P., Järvinen, R., Reunanenm A, Maatela, J., “Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study”, *Br. Med. J.*, 1996, 312, 478-481.
- Kobayashi, D., Sakata, T., “Influence of temperature on short-chain fatty acid production by pig cecal bacteria *in vitro*”, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2006, 52, 66-69.
- Kofler, S., Nickel, T., Weis, M., “Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses inflammation”, *Clin. Sci. (Lond.)*, 2005, 108, 205-213.
- Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tanaka, T., “ β -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate”, *Cancer Sci.*, 2005, 96, 69-76.
- Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T., “A comparasion of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage”, *J. Atheroscler. Thromb.*, 2004, 11, 88-97.
- Kontogianni, M.D., Zampelas, A., Tsigos, C., “Nutrition and inflammatory load”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, 1083, 214-238.
- Koponen, J.M., Happonen, A.M., Mattila, P.H., Törrönen, A.R., “Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland”, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 1612–1619.
- Koyuncu, H., Berkarda, B., Baykut, F., Soybir, G., Alatli, C., Gül, H., Altun, M., “Preventive effect of hesperidin against inflammation in CD-1 mouse skin caused by tumor promoter”, *Anticancer Res.*, 1999, 19, 3237-3241.
- Kruithof, E.K.O., “Regulation of plasminogen activator inhibitor type I gene expression by inflammatory mediators and statins”, *Thromb. Haemost.*, 2008, 100, 969-975.

- Kuljaca, S. Liu, T., Tee, A.E., Haber, M., Norris, M.D., Dwarte, T., Marshall, G.M., “Enhancing the anti-angiogenic action of histone deacetylase inhibitors”, *Mol. Cancer*, 2007, 6, 1-11.
- Kugathasan, S., Cohen, S., “Searching for new clues in inflammatory bowel disease: tell tales from pediatric IBD natural history studies”, *Gastroenterology*, 2008, 135, 1038-1041.
- Lamalice, L., Le Boeuf, F., Huot, J., “Endothelial cell migration during angiogenesis”, *Circ. Res.*, 2007, 100, 782-794.
- Lamps L., Madhusudhan, K., Havens, J., Greenon, J.K., Bronner, M.P., Chiles, M.C., Dean, P.J., Scott, M.A., “Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn’s disease”, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2003, 27, 220-227.
- Landete, J.M., “Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health”, *Food Res. Intern.*, 2011, 44, 1150-1160.
- Langheinrich, A.C., Kampschulte, M., Buch, T., Bohle, R., “*Vasa vasorum* and atherosclerosis – Quid novi?”, *Thromb. Haemost.*, 2007, 97, 873-879.
- Lansky, E.P., Newman, R.A., “*Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer”, *J. Ethnopharmacol.*, 2007, 107, 177-206.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., “The hydrolysable tannin punicalagin release ellagic acid which induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway”, *J. Nut. Biochem.*, 2006, 17, 611-625.

- Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C., Lodovici, M., Moneti, G., Dolara, P., “Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models”, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2009a, 53, 1044-1054.
- Larrosa, M., Yáñez-Gascón, M.J., Selma, M.V., González-Sarrías, A., Toti, S., Cerón, J.J., Tomás-Barberán, F.A., Dolara, P., Espín, J.C., “Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model”, *J. Agric. Food Chem.*, 2009b, 57, 2211-2220.
- Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., “Ellagitannins, ellagic acid and vascular health”, *Mol. Aspects Med.*, 2010a, 31, 513-539.
- Larrosa, M., González-Sarrías, A., Yáñez-Gascón, M.J., Selma, M.V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., Tomás-Barberán, F.A., Dolara, P., Espín, J.C., “Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolim”, *J. Nutr. Biochem.*, 2010b, 21, 717-725.
- Larrosa, M., Tomé-Carneiro, J., Yáñez-Gascón, M.J., Alcántara, D., Selma, M.V., Beltrán, D., García-Conesa, M.T., Urbán, C., Lucas, R., Tomás-Barberán, F.A., Morales, J.C., Espín, J.C., “Preventive oral treatment with resveratrol pro-drugs drastically reduce colon inflammation in rodents”, *J. Med. Chem.*, 2010c, 53, 7365-7376.
- Larrosa, M., Azorín-Ortuño, M., Yáñez-Gascón, M.J., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F., Espín, J.C., “Lack of effect of oral administration of resveratrol in LPS-induced systemic inflammation”, *Eur. J. Nutr.*, 2011, 50, 673-680.
- Latella, G., Fiocchi, C., Caprili, R., “News from the ‘5th International meeting on inflammatory bowel disease’ CAPRI 2010”, *J. Crohns Colitis*, 2010, 4, 690-702.

- Lazar V., Quorum sensing in biofilms – How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?, *Anaerobe*, 2011, 17, 280-285.
- Lee, J.H., Talcott, S.T., “Ellagic acid and ellagitannins affect on sedimentation in muscadine juice and wine”, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 3971–3976.
- Lee, K.M., Kim, W.S., Lim, J., Nam, S., Youn, M., Nam, S.W., Kim, Y., Kim, S.H., Park, W., Park, S., “Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7”, *J. Food Prot.*, 2009a, 72(2), 325-331.
- Lee, H., Churey, J.J., Worobo, R.W., “Isolation and characterization of a protective bacterial culture isolated from honey active against American Foulbrood disease”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 296, 39-44.
- Leeb, S.N., Vogl, D., Falk, W., Schölmerich, J., Rogler, G., Gelbmann, C.M., “Regulation of migration of human colonic myofibroblasts”, *Growth Factors*, 2002, 20, 81-91.
- Leeb, S.N., Vogl, D., Gunckel, M., Kiessling, S., Falk, W., Göke, M., Schölmerich, J., Gelbmann, C.M., Rogler, G., “Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediator and focal adhesion kinase”, *Gastroenterology*, 2003, 125, 1341-1354.
- Lei, X., Zhong-lin, Y., Ping, L., Yong-qiang, Z., “Modulating effect of hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulphate sodium”, *Phytomedicine*, 2009, 16(10), 989-995.
- Lewis, K., “Persister cells, dormancy and infectious disease”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007, 5, 48-56.
- Lewis, K., “Persister cells”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2010, 64, 357-372.

- Li R, Li J, Cai L, Hu CM, Zhang L, “Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms”, *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(2), 221-228.
- Li, Y.J., Wang, W.Q., Sato, T., Kanaji, N., Nakanishi, M., Kim, M., Michalski, J., Nelson, A.J., Sun, J.H., Farid, M., Basma, H., Patil, A., Toews, M.L., Liu, X., Rennard, S.I., “Prostaglandin E₂ inhibits human lung fibroblast chemotaxis through disparate actions on different E-prostanoid receptors”, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2011a, 44, 99-107.
- Li Y., Flores R., Yu, A., Okcu, M.F., Murray, J., Chintaqumpala, M., Hicks, J., Lau, C.C., Man, T.K., “Elevated expression of CXC chemokines in pediatric osteosarcoma patients”, *Cancer*, 2011b, 5, 207-217.
- Liang, J., Liu, E., Yu, Y., Kitajima, S., Koike, T., Jin, Y., Morimoto, M., Hatakeyama, K., Asada, Y., Watanabe, T., Sasaguri, Y., Watanabe, S., Fan, J., “Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits”, *Circulation*, 2006, 113, 1993-2001.
- Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K., “Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis”, *Nature*, 2011, 473, 317-325.
- Liu, L., Zubik, L., William-Collins, F., Marko, M., Meydani, M., “The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds”, *Atherosclerosis*, 2004, 175, 39-49.
- Liu, R.H., “Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 78, 517S-520S.
- Liu, X., Wang, W., Hu, H., Tang, N., Zhang, C., Liang, W., Wang, M., “Smad3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF- β 1 in cultured rat hepatic stellate cells”, *Pharm. Res.*, 2006, 23, 82-89.
- López-Serrano, P., Pérez-Calle, J.L., Carrera-Alonso, E., Pérez-Fernandez, T., Rodríguez-Caravaca, G., Boixeda-de-Miguel, D., Fernández-Rodríguez, C.M.,

- “Epidemiologic estudy on the current incidence of inflammatory bowel disease in Madrid”, *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2009, 101, 168-772.
- López-Uriarte, P., Nogués, R., Saez, G., Bulló, M., Romeu, M., Masana, L., Tormos, C., Casas-Agustench, P., Salas-Salvadó, J., “Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome”, *Clin. Nutr.*, 2010, doi: 10.1016/j.numecd.2009.08.005.
- Loppnow, H., Buerke, M., Werdan, K., Rose-John, S., “Contribution of vascular cell-derived cytokines to innate and inflammatory pathways in atherogenesis”, *J. Cell Mol. Med.*, 2011, 15, 484-500.
- Losso, J.N., Bansode, R.R., Trappey, A. 2nd, Bawadi, H.A., Truax, R., “In vitro antiproliferative activities of ellagic acid”, *J. Nutr. Biochem.*, 2004, 15(11), 672-678.
- Lotito, S.B., Zhang, W.J., Yang, C.S., Crozier, A., Frei, B., “Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties”, *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, 51, 454-463.
- Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J., “Understanding the effects of diet on bacterial metabolim in the large intestine”, *J. Appl. Microbiol.*, 2007, 102, 1197-1208.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., “Protein measurement with the Folin Phenol Reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193, 265-275.
- Lucas, R., Alcantara, D., Morales, J.C., “A concise síntesis of glucuronide metabolites of urolithin-B, resveratrol, and hydroxytyrosol”, *Carbohydr. Res.*, 2009, 344, 1340-1346.

- Ma, Y., Njike, V.Y., Millet, J., Dutta, S., Doughty, K., Treu, J.A., Katz, D.L., “Effects of walnut consumption on endothelial function in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled crossover trial”, *Diabetes Care.*, 2010, 33, 227-232.
- Macfelda, K., Weiss, T.W., Kaun, C., Breuss, J.M., Zorn, G., Oberndorfer, U., Voegele-Kadletz, M., Huber-Beckmann, R., Ullrich, R., Binder, B.R., Losert, U.M., Maurer, G., Pacher, R., Huber, K., Wojta, J., “Plasminogen activator inhibitor 1 expression is regulated by the inflammatory mediators interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β and oncostatin M in human cardiac myocytes”, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2002, 34, 1681-1691.
- McGrath, L.T., Weir, C.D., Maynard, S., Rowlands, B.J., “Gas-liquid chromatography analysis of volatile short chain fatty acids in fecal samples as pentafluorobenzyl esters”, *Anal. Biochem.*, 1992, 207, 227-230.
- Maeda, S., Ohno, K., Nakamura, K., Uchida, K., Nakashima, K., Fukushima, K., Tsukamoto, A., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., Tsujimoto, H., “Quantification of chemokine and chemokine receptor gene expression in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease”, *J. Am. Coll. Surg.*, 2004, 199, 234-242.
- Matsumoto, H., Young, G. M., “Translocated effectors of *Yersinia*”, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, 12, 94-100.
- Malik, N.S.A., Perez, J.L., Lombardini, L., Cornacchia, R., Cisneros-Zevallos, L., Bradford, J., “Phenolic compounds and fatty acids composition of organic and conventional grown pecan kernels”, *J. Sci. Food Agric.*, 2009, 89, 2207–2213.
- Manach, C., Morand, C., Gil-Izquierdo, A., Bouteloup-Demange, C., Rémésy, C., “Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice”, *Eur. J Clin. Nutr.*, 2003, 57, 235-242.

- Manach, C., Donovan, J.L., “Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans”, *Free Radic. Res.*, 2004, 38, 771-785.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., “Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I., Review of 97 bioavailability studies”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81, 230S-242S.
- Marchesi, J.R., Holmes, E., Khan, F., Kochar, S., “Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease”, *J. Proteome. Res.*, 2007, 6, 546-551.
- MARM, *Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino*, Anuario de Estadística (2009): http://www.marm.es/estadistica/pags/anuario/2009/AE_2009_13.pdf
- Martí, N., Mena, P., Cánovas, J.A., Micol, V., Saura, D., “Vitamin C and the role of citrus juices as functional food”, *Nat. Prod. Commun.*, 2009, 4(5), 677-700.
- Martin, J., Collot-Teixeira, S., McGregor, L., McGregor, J.L., “The dialogue between endothelial cells and monocytes/macrophages in vascular syndromes”, *Current Pharmacological Desing*, 2007, 13(17), 1751-1759.
- Martin, K.R., “Both common and specialty mushrooms inhibit adhesion molecule expression and in vitro binding of monocytes to human aortic endothelial cells in a pro-inflammatory environment”, *Nutr. J.*, 2010, 29, 1-9 (son 9 páginas, ¿cual es el volumen?)
- Martínez-González, J., Llorente-Cortés, V., Badimón, L., “Cellular and molecular biology of atherosclerosis lesions”, *Rev. Esp. Cardiol.*, 2001, 54, 218-213.
- Masamune, A., Satoh, M., Kikuta, K., Suzuki, N., Satoh, K., Shimosegawa, T., “Ellagic acid blocas activation of pancreatic stellate cells”, *Biochem. Pharmacol.*, 2005, 70(6), 869-878.

- Mate-Jiménez, J., Pajares-García, J.M., “Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal: distribución geográfica y factores ambientales”, *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 1994, 86, 533-539.
- Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L., Bravo, L., “Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits”, *J. Chrom. B.*, 2005, 827, 76-82.
- Matsumoto, H., Young, G.M., “Translocated effectors of *Yersinia*”, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, 12, 94-100.
- McDonald, T.T., “Breakdown of tolerance to the intestinal bacterial flora in inflammatory bowel disease (IBD)”, *Clin. Exp. Immunol.*, 1995, 102, 445-447.
- McDougald, D., Rice, S.A., Kjelleberg, S., “Bacterial *quorum sensing* and interference by naturally occurring biomimics”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 445-453.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., “Innate immunity, local inflammation, and degenerative disease”, *Sci. Aging Knowledge Environ.*, 2002, 29, re3.
- Medina-Martínez, M.S., Uyttendaele, M., Meireman, S., Debevere, J., “Relevance of N-acyl-L-homoserine lactone production by *Yersinia enterocolitica* in fresh food”, *J. Appl. Microbiol.*, 2007, 102, 1150-1158.
- Meier, J.K., Scharl, M., Miller, S.N., Brenmoehl, J., Hausmann, M., Kellermeier, S., Schölmerich, J., Rogler, G., “Specific differences in migratory function of myofibroblasts isolated from Crohn’s disease fistulae and strictures”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2011, 17, 202-212.
- Melgar, S., Karlsson, L., Rehnström, E., Karlsson, A., Utkovic, H., Jansson, L., Michaëlsson, E., “Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis

- using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease”, *Int. Immunopharmacol.*, 2008, 8, 836-844.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D.A., Bartual, J., Saura, D., Martí, N., “Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain”, *J. Sci. Food Agric.*, 2011, 91, 1893-1906.
- Merken HM, Beecher GR, “Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A review”, *J Agric Food Chem*, 2000, 48(3), 577-599.
- Mertens-Talcott, S., Jilma-Stohlawetz, P., Ríos, J., Hingorani, L., Derendorf, H., “Absorption, metabolism and antioxidant effects of pomegranate polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers”, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 8956-8961.
- Mestas, J., Klaus, L., “Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis”, *Trends Cardiovascular Medicine*, 2008, 18, 228-232.
- Middelton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., “The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer”, *Pharmacol. Rev.*, 2000, 52, 673-751.
- Mills, G.A., Walker, V., “Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials”, *J. Chromatogr. A*, 2000, 902, 267-287.
- Min-Hsiung, P., Ching-Shu, L., Dushenkov, S., Chi-Tang, H., “Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds”, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 4467-4477.
- Min-Hsiung, P., Ching-Shu, L., Chi-Tang, H., “Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids”, *Food and Function*, 2010, 1, 15-31.

- Mohan, M., Waghulde, H., Kasture, S., “Effect of pomegranate juice on angiotensin II-induced hypertension in diabetic wistar rats”, *Phytother. Res.*, 2009, 24, S196-S203.
- Moons, P., Van Houdt, R., Aertsen, A., Vanoirbeek, K., Engelborghs, I., Michiels, C.W., “Role of *Quorum sensing* and antimicrobial component production by *Serratia plymuthica* in formation of biofilms, including mixed with *Escherichia coli*”, *Appl. Environm. Microbial.*, 2006, 72, 7294-7300.
- Moreau, M.E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N.J., Marceau, F., Adam, A., “The kallikrein-hinin system: current and future pharmacological targets”, *J. Pharmacol. Sci.*, 2005, 99, 6-38.
- Morin, D., Grasland, B., Vallé-Réhel, C.D., Haras, D., “On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum-sensing signal molecules, in the presence of biological matrices”, *J. Chromatogr. A*, 2003, 1002, 79-92.
- Muise, A.M., Walters, T.D., Glowacka, W.K., Griffiths, A.M., Ngan, B-Y, Lan, H., Xu, W., Silverberg, M.S., “Polymorphisms in E-cadherin (*CDH1*) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn’s disease”, *Gut.*, 2009, 58, 1121-1127.
- Mullen, W., Archeveque, M.-A., Edwards, C.A., Matsumoto, H., Crozier, A., “Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt”, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 11157-11164.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H., “Manual of clinical microbiology”, 1999, 7th ed. ASM Press.
- Naldini, A., Carraro, F., “Role of inflammatory mediators in angiogenesis”, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2005, 4(1), 3-8.

- Néan, S., Boichot, E., Lagente, V., Bertrand, C.P., “Macrophage elastase (MMP12): a pro-inflammatory mediator?”, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2005, 100, 167-172.
- Nerich, V., Monnet, E., Etienne, A., Louafi, S., Rameé, C., Rican, S., Weill, A., Vallier, N., Vanbockstael, V., Auleley, G.R., Allemand, H., Carbonnel, F., “Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2006, 12(3), 218-226.
- Ni, N., Li, M., Wang, B., “Inhibitors and antagonists of bacterial *quorum sensing*”, *Med. Res. Rev.*, 2009, 29, 65-124.
- Nicholl, S.M., Roztocil, E., Davies, M.G., “Plaminogen activator system and vascular disease”, *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2006, 4, 101-116.
- Nielsen, I.L., Chee, W.S., Poulsen, L., Offord-Cavin, E., Rasmussen, S.E., Frederiksen, H., Enslin, M., Barron, D., Horcajada, M.N., Williamson, G., “Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial”, *J. Nutr.*, 2006, 136(2), 404-408.
- Nishimura, S., Takahashi, M., Ota, S., Hirano, M., Hiraishi, H., “Hepatocyte growth factor accelerates restitution of intestinal epithelial cells”, *J. Gastroenterol.*, 1998, 33, 172-178.
- Njoroge, J., Sperandio, V., “Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases”, *EMBO Mol. Med.*, 2009, 1, 201-210.
- Normann, A.J., Suter-Zimmermann, K., Bucher, H.C., Shai, I., Tuttle, K.R., Estruch, R., Briel, M., “Meta-analysis comparing Mediterranean diet to low-fat diets for modification of cardiovascular risk factor”, *Am. J. Med.*, 2011, 124, 841-851 e2.

- Okuno, T., Andoh, A., Bamba, S., Araki, Y., Fujiyama, Y., Fujiyama, M., Bamba, T.,
“Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expresión in human colonic subepithelial myofibroblasts”, *Scand. J. Gastroenterol.*, 2002, 37, 317-324.
- O’Leary, K.A., Day, A.J., Needs, P.W., Sly, W.S., O’Brien, N.M., Williamson, G.,
“Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase”, *FEBS Lett.*, 2001, 503, 103-106.
- O’May, C., Tufenkji, N., “Pseudomonas aeruginosa swarming motility is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 3061-3067.
- Onat, D., Brillon, D., Colombo, P.C., Schmidt, A.M., “Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis”, *Curr. Diab. Rep.*, 2011, 11, 193-202.
- Ortori, C.A., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., Barreto, D.A.,
“Comprehensive profiling of *N*-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 497-511.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., Wamhoff, B.R., “Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease”, *Physiol. Rev.*, 2004, 84, 767-801.
- Pacheco-Palencia, L.A., Talcott, S.T., Safe, S., Mertens-Talcott, S., “Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil *in vitro*”, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 3593-3600.
- Pang, G., Couch, L., Batey, R., Clancy, R., Cripps, A., “GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in

- human duodenal fibroblasts stimulates with lipopolysaccharide, IL-1 α and TNF- α ”, *Clin. Exp. Immunol.*, 1994, 96, 437-443.
- Pang, S., Smith, J., Onley, D., Reeve, J., Walker, M., Foy, C., “A comparability study of the emerging protein array platforms with established ELISA procedures”, *J. Immunol. Methods*, 2005, 302, 1-12.
- Pantuck, A.J., Leppert, J.T., Zomorodian, N., Arosen, W., Hong, J., Barnard, R.J., Seeram, N., Liker, H., Wang, H., Elashoff, R., Heber, D., Aviram, M., Ignarro, L., Beldegrun, A., “Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer”, *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 4018-4026.
- Papoutsis, Z., Kassi, E., Tsiapara, A., Fokialakis, N., Chrousos, G.P., Moutsatsou, P., “Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid *via* the estrogen receptor subtypes Era and Erb”, *J Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 7715-7720.
- Papoutsis, Z., Kassi, E., Chinou, I., Halabalaki, M., Skaltsounis, L.A., Moutsatsou, P., “Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483”, *Br. J. Nutr.*, 2008, 99, 715-722.
- Parsek, M.R., Singh, P.K., “Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2003, 57, 677-701.
- Patel, N., Sundaram, N., Yang, M., Madigan, C., Kalra, V.K., Malik, P., “Placenta growth factor (PIGF), a novel inducer of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in sickle cell disease (SCD), *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 16713-16722.
- Pelletier, M., Siegel, R.M., “Wishing away inflammation? New links between serotonin and TNF signaling”, *Mol. Interv.*, 2009, 9, 299-301.

- Pender, S.L.F., Li, C.K.F., Sabatino, A.D.I., Macdonald, T.T., Buckley, M.G., “Role of macrophage metalloelastase in gut inflammation”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, 1072, 386-388.
- Pepe, J.C., Miller, V.L., “Yersinia enterocolitica invasins: a primary role in the initiation of infection”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, 90, 6473-6477
- Pérez-Pérez, J.G., Castillo, I.P., García-Lidon, A., Botia, P., García-Sánchez, F., “Fino lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and Lisbon on two rootstocks in Murcia (Spain)”, *Sci. Hortic.*, 2005, 106, 530-538.
- Pfaff, E., Hildebrand, A., Mikula, H., Metzler, M., “Glucuronidation of zearalenone, zearanol and four metabolites *in vitro*: formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2010, 54, 1468-1476.
- Pinchuk, I.V., Mifflin, R.C., Saada, J.I., Powel, D.W., “Intestinal mesenchymal cells”, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 2010, 12(5), 310-318.
- Podolsky, D.K., “Inflammatory bowel disease”, *N. Engl. J. Med.*, 2002, 347(6), 417-429.
- Poggi, M., Paulmyer-Lacroix, O., Verdier, M., Peiretti, F., Bastelica, D., Boucraut, J., Lijnen, H.R., Juhan-Vague, I., Alessi, M.C., “Chronic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) overexpression dampens CD25⁺ lymphocyte recruitment after lipopolysaccharide endotoxemia in mouse lung”, *J. Thromb. Haemost.*, 2007, 5, 2467-2475.
- Pontz, B.F., Albini, A., Mensing, H., “Pattern of collagen synthesis and chemotactic response of fibroblasts derived from mucopolysaccharidosis patients”, *Exp. Cell Res.*, 1984, 155, 457-466.

- Postlethwaite, A.E., Seyer, J.M., "Stimulation of fibroblasts chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and a synthetic TNF- α 31-68 peptide, *J. Exp. Med.*, 1990, 172, 1749-1756.
- Powel, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., West, A.B., "Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease", *Am. J. Physiol.*, 1999a, 277, C1-C19.
- Powel, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., West, A.B., "Myofibroblasts. II. Intestinal su epithelial myofibroblasts", *Am. J. Physiol.*, 1999b, 277, C183-C201.
- Powel, D.W., Adegboyega, P.A., Di Mari, J.F., Mifflin, R.C., "Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2005, 289, G2-G7.
- Powel, D.W., Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Chen, X., Mifflin, R.C., "Mesenchymal cells of the intestinal lamina propia", *Annu. Rev. Physiol.*, 2011, 73, 213-237.
- Prantera, C., "What role do antibiotics have in the treatment of IBD?", *Nat. Clin. Pract. Gastroenteol. Hepatol.*, 2008, 5, 670-671.
- Qazi, Y., Maddula, S., Ambati, B., "Mediators of ocular angiogenesis", *J. Genet.*, 2009, 88, 495-515.
- Quideau, S., Fledman, K.S., "Ellagitannin chemistry", *Chem. Rev.*, 1996, 96, 475-504.
- Raczkowska, A., Brzóstkowska, M., Kwiatek, A., Bielecki, J., Brzostek, K., "Modulation of *inv* gene expression by the OmpR two-component response regulator protein of *Yersinia enterocolitica*", *Folia Microbiol.*, 2011a, 56, 313-319.
- Raczkowska, A., Skorek, K., Brzóstkowska, M., Lasińska, A., Brzostek, K., "Pleiotropic effects of a *Yersinia enterocolitica* OmpR mutation on adherent-

- invasive abilities and biofilm formation”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011b, 321, 43-49.
- Raczkowska, A., Skorek, K., Bieleki, J., Brzostek, K., “OmpR controls *Yersinia enterocolitica* motility by positive regulation of *flhDC* expression”, *Ant. Van Leeuwenhoeck*, 2011c, 99, 381-394.
- Ramos S, “Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention”, *J Nutr Biochem*, 2007, 18, 427-442.
- Ramos, V.C., Sanz-Rosa, D., de las Heras, N., Gil, E.C., Ortega, M.M., Juliá, V.L., “Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial”, *Hipertensión*, 2004, 21, 347-354.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., and Ahmad, N., “Dose translation from animal to human studies revisited”, *Faseb J*, 2008, 22, 659-661.
- Rechen, A.R., Smith, M.A., Kuhnle, G., Gibson, G.R., Debnam, E.S., Srai, S.K.S., Moore, K.P., Rice-Evans, C.A., “Colonic metabolism of dietary polyphenols influence of structure on microbial fermentation products”, *Free Radical Biol. Med.*, 2004, 36, 212-225.
- Reddy, M.K., Gupta, S.K., Jacob, M.R., Khan, S.L., Ferreira, D., “Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L.”, *Planta Med.*, 2007, 73, 461-467.
- Remesi, C., Deminge, C., “Determination of volatile fatty acids in plasma after ethanolic extraction”, *Biochem. J.*, 1974, 141, 85-91.
- Renckens, R., Roelofs, J.J.T.H., De Waard, V., Florquin, S., Lijnen, H.R., Carmeliet, P., Poll, T., “The role of plasminogen activator inhibitor type I in the inflammatory response to local tissue injury”, *J. Thromb. Haemost.*, 2005, 3, 1018-1025.

- Rieder, F., Brenmoehl, J., Leeb, S., Schölmerich, J., Rogler, G., “Wound healing and fibrosis in intestinal disease”, *Gut.*, 2007, 56, 130-139.
- Rieder, F., Georgieva, M., Schirbel, A., Artinger, M., Zügner, A., Blank, M., Brenmoehl, J., Schölmerich, J., Rogler, G., “Prostaglandin E2 inhibits migration of colonic lamina propria fibroblasts”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2010, 16, 1505-1513.
- Ríos, L.Y., Bennett, R.N., Lazarus, S.A., Rémésy, C., Scalbert, A., Williamson, G., “Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, 76, 1106-1110.
- Roowi, S., Mullen, W., Edwards, C.A., Crozier, A., “Yoghurt impacts on the excretion of phenolic acids derived from colonic breakdown of orange juice flavanones in humans”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009, 53, S68-S75.
- Ros, E., NÚñez, I., Pérez-Heras, A., Serra, M., Gilabert, R., Casals, E., Deulofeu, R., “A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial”, *Circulation*, 2004, 109, 1609-1614.
- Rosenblat, M., Hayek, T., Aviram, M. “Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages”, *Atherosclerosis*, 2006, 187, 363-71.
- Roy, V., Adams, B.L., Bentley, W.E., “Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing”, *Enzyme Microb. Technol.*, 2011, 49, 113-23.
- Rubin, D.C., Shaker, A., Levin, M.S., “Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer”, *Front Immunol.*, 2012, 3, 1-10.

- Rubio, C.A., Brefits, R., “Colorectal cancer in Crohn’s disease--review of a 56-year experience in Karolinska Institute University Hospital”, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2008, 27(4), 257-266.
- Rudrappa, T., Bais, H.P., “Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant animal pathogenicity models”, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 1955-1962.
- Saebo, A., Vik, E., Lange, O.J., Matuszkiewicz, L., “Inflammatory bowel disease with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection”, *Eur. J. Intern. Med.*, 2005, 16, 176-182.
- Sartor, R.B., “Pathogenesis and immune mechanism of chronic inflammatory bowel diseases”, *Am. J. Gastroenterol.*, 1997, 92, 5S-11S.
- Sartor, R.B., “Microbial influences in inflammatory bowel disease”, *Gastroenterology*, 2008, 134, 577-594.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., Masella, R., “Polyphenols, intracellular signalling and inflammation”, *Ann Ist Super Sanita*, 2007, 43(4), 394-405.
- Sartippour, M.R., Seeram, N.P., Rao, J.Y., Moro, A., Harris, D.M., Henning, S.M., Frouzi, A., Rettig, M.B., Aronson, W.J., Pantuck, A.J., Heber, D., “Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer *in vitro* and *in vivo*”, *International Journal of Oncology*, 2008, 32, 475-480.
- Sartor, R.B., “Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Gastroenterol. Hepatol.*, 2006, 3, 390-407.
- Scalbert, A., “Antimicrobial properties of tannins”, *Phytochemistry*, 1991, 30, 3875-3883.
- Scalbert, A., Williamson, G., “Dietary intake and bioavailability fo polyphenols”, *J. Nutr.*, 2000, 130, 2073S-2085S.

- Schiffrin, E.L., "Antioxidants in hypertension and cardiovascular disease", *Mol. Interv.*, 2010, 10, 354-362.
- Scholz, H., Sandberg, W., Damas, J.K., Smith, C., Andreasen, A.K., Gullestad, L., Frøland, S.S., Yndestad, A., Aukrust, P., Halvorsen, B., "Enhanced plasma levels of LIGHT in unstable angina; Possible pathogenic role in foam cell formation and thrombosis", *Circulation*, 2005, 112, 2121-2129.
- Scivo, R., Vasile, M., Bartosiewicz, I., Valesini, G., "Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases", *Autoimmun. Rev.*, 2011, 10, 369-374.
- Seeram, N.P., Lee, R., Heber, D., "Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice", *Clin. Chim. Acta*, 2004, 348, 63-68.
- Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D., "Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine up to 48 hours", *J. Nut.*, 2006, 136, 2481-2485.
- Sharma, S., Chopra, K., Kulkarni, S.K., Agrewala, J.N., "Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway", *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, 147, 155-163.
- Shi, C., Pamer, E.G., "Monocyte recruitment during infection and inflammation", *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, 11, 762-774.
- Shimoi, K., Saka, N., Nozawa, R., Sato, M., Amano, I., Nakayama, T., Kinoshita, N., "Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation", *Drug. Metab. Dispos.*, 2001, 29, 1521-1524.
- Shimoi, K., Nakayama, T., "Glucuronidase deconjugation in inflammation", *Methods Enzymol.*, 2005, 400, 263-272.

- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., van Blankenstein, M., “Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD)”, *Gut*, 1996, 39(5), 690-697.
- Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K.A., Haqqi, T.M., “Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis”, *Nutrition*, 2008a, 24, 733-743.
- Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K.A., Haqqi, T.M., “Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L.) preferentially inhibit COX-2 activity *ex vivo* and IL-1 β -induced PGE₂ production in human chondrocytes *in vitro*”, *J. Inflamm.*, 2008b, 13, 5-9.
- Silberberg, M., Gil-Izquierdo, A., Combaret, L., Remesy, C., Scalbert, A., Morand, C., “Flavanone metabolism in healthy and tumor-bearing rats”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2006, 60, 529-535.
- Simmons, J.G., Pucilowska, J.B., Keku, T.O., Lund, P.K., “IGF-I and TGF- β 1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts”, *Am. J. Physiol. Gastroenterol. Liver Physiol.*, 2002, 283, G809-G818.
- Singer, A.J., Clark, R.A., “Cutaneous wound healing”, *N. Engl. J. Med.*, 1999, 341, 738-746.
- Smart, R.C., Huang, M.T., Chang, R.L., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Conney, A.H., “Disposition of the naturally occurring antimutagenic plant phenol, ellagic acid, and its synthetic derivatives, 3-*O*-decylellagic acid and 3,3'-*di-O*-methylellagic acid in mice”, *Carcinogenesis*, 1986, 7, 1663-1667.

- Snoeck, V., Goddeeris, B., Cox, E., “The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake”, *Microbes. Infect.*, 2005, 7, 997-1004.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., Doré, J., “Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota”, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2009, 15(8), 1183-1189.
- Sprague, A.H., Khalil, R.A., “Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease”, *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 78, 539-552.
- Staton, C.A., Stribbling, S.M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N.J., Lewis, C.E., “Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*”, *Int. J. Path.*, 2004, 85, 233-248.
- Stecher, B., Hardt, W.D., “The role of microbiota in infectious disease”, *Trends Microbiol.*, 2008, 16, 107-114.
- Stefansson, S., McMahon, G.A., Petitclerc, E., Lawrence, D.A., “Plaminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodelling”, *Curr. Pharm. Des.*, 2003, 9, 1545-1564.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W., “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms”, *Lancet*, 2001, 358, 135-138.
- Stoner, G.D., Sardo, C., Apseloff, G., Mullet, D., Wargo, W., Pound, V., Singh, A., Sanders, J., Aziz, R., Casto, B., Sun, X., “Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days”, *J. Clin. Pharmacol.*, 2005, 45, 1153-1164.
- St-Onge, M., Flamand, N., Biarc, J., Picard, S., Bouchard, L., Dussault, A.A., Laflamme, C., James, M.J., Caughey, G.E., Clealand, L.G., Borgeat, P., Pouliot, M., “Characterization of prostaglandin E2 generation through the

- cyclooxygenase (COX)-2 pathway in human neutrophils”, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, 1771, 1235-1245.
- Suganuma, H., Sato, A., Tamura, R., Chida, K., “Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions”, *Thorax.*, 1995, 50, 984-989.
- Suri, S., Taylor, M.A., Verity, A., Tribolo, S., “A comparative study of the effects of quercetin and its glucuronide and sulphate metabolites on human neutrophil function *in vitro*”, *Biochem. Pharmacol.*, 2008, 76, 645-653.
- Suzuki, R., Miyamoto, S., Yasui, Y., Sugie, S., Tanaka, T., “Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate”, *BMC Cancer*, 2007, 7, 1-13.
- Szekanecz, Z., Shah, M.R., Harlow, L.A., Pearce, W.H., Koch, A.E., “Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are involved in human aortic endothelial cell migration. The possible role of these cytokines in human aortic aneurysmal blood vessel growth”, *Pathobiology*, 1994, 62, 134-139.
- Taganna, J.C., Quanico, J.P., Perono, R.M.G., Amor, E.C., Rivera, W.L., “Tannin-rich fraction from *Terminalia catappa* inhibits quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-controlled biofilm maturation and LasA staphylolytic activity in *Pseudomonas aeruginosa*”, *J. Ethnopharmacol.*, 2011, 134, 865-871.
- Takaishi, H., Matsumi, T., Nakazawa, A., Takada, T., Kado, S., Asahara, T., Kamada, N., Sakuraba, A., Yajima, T., Higuchi, H., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Nomoto, K., Tanaka, R., Hibi, T., “Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease”, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2008, 298, 463-472.

- Takimoto, T., Suzuki, K., Arisaka, H., Murata, T., Ozaki, H., Koyama, N., “Effect of N-(p-coumaroyl)serotonin and N-feruloylserotonin, major anti-atherogenic polyphenols in safflower seed, on vasodilation, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, 55, 1561-1571.
- Tangerman, A., van Schaik, A., Meuwese-Arends, M.T., van Tongeren, J.H., “Quantitative determination of C2-C8 volatile fatty acids in human serum by vacuum distillation and gas chromatography”, *Clin. Chim. Acta*, 1983, 133, 341-348.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., Vidal, A., “Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease”, *World J. Gastroenterol.*, 2007, 13, 2826-2832.
- Teel, R.W., Martin, R.W., “Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage”, *Xenobiotica*, 1988, 18, 397-405.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G.S., Bycroft, B.W., Pritchard, D.I., “The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity”, *Infect. Immun.*, 1998, 66, 36-42.
- Tenopoulou, M., Kurz, T., Doulias, P.T., Galaris, D., Brunk, U.T., “Does the calcein-AM method assay the total cellular ‘labile iron pool’ or only a fraction of it?”, *Biochem. J.*, 2007, 403, 261-266.
- Terao, J., Murota, K., Kawai, Y., “Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone *in vivo*”, *Food Funct.*, 2011, 2, 11-17.
- Throup, J.P., Camara, M., Briggs, G.S., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P., Stewart, G.S., “Characterisation of the *yenI/yenR* locus from

- Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two *N*-acylhomoserine lactone signal molecules”, *Mol. Microbiol.*, 1995, 17, 345-356.
- Tobe, T., Nakanishi, N., Sugimoto, N., “Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in aflagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*”, *Infect. Immun.*, 2011, 79, 1016-1024.
- Torabian, S., Haddad, E., Rajaram, S., Banta, J., Sabaté, J., “Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation”, *J. Hum. Nutr. Diet*, 2009, 22, 64-71.
- Torabian, S., Haddad, E., Cordero-MacIntyre, Z., Tanzman, J., Fernandez, M.L., Sabate, J., “Long-term walnut supplementation without dietary advice induces favorable serum lipid changes in free-living individuals”, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2010, 64, 274-279.
- Toklu, H.Z., Dumlu, M.U., Sehirli, O., Ercan, F., Gedik, N., Gökmen, V., Sener, G., “Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats”, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2007, 59, 1287-1295.
- Tomás-Barberán, F.A., Clifford, M.N., “Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden”, *J. Sci. Food Agric.*, 2000, 80, 1073-1080.
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., “Phenolic compounds and related enzymes of quality in fruit and vegetables”, *J. Sci. Food Agric.*, 2001, 81, 853-876.
- Törrönen, R., “Sources and health effects of dietary ellagitannins”, 2009, In S. Quideau (ed), *Chemistry and Biology of Ellagitannins*. World Scientific, London. pp 298–319.
- Tribolo, S., Lodi, F., Connor, C., Suri, S., Wilson, V.G., Taylor, M.A., Needs, P.W., Kroon, P.A., Hughes, D.A., “Comparative effects of quercetin and its

- predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells”, *Atherosclerosis*, 2008, 197, 50-56.
- Triggs, C.M., Munday, K., Hu, R., Fraser, A.G., Gearry, R.B., Barclay, M.L., Ferguson, L.R., “Dietary factors in chronic inflammation: food tolerance and intolerance of a New Zealand caucasian crohn’s disease population”, *Mutat. Res.*, 2010, 690, 123-138.
- Truchado, P., Gil-Izquiero, A., Tomás-Barberán, F.A., Allende, A., “Inhibition of chestnut honey of N-acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*”, *J. Agric. Food Chem.*, 2009a, 57, 11186-11193.
- Truchado, P., López-Gálvez, F., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Allende, A., “*Quorum sensing* inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics”, *Food Chem.*, 2009b, 115, 1337-1344.
- Truchado, P., Tomás-Barberán, F.A., Larrosa, M., Allende, A., “Food phytochemicals act as *quorum sensing* inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*”, *Food Control*, 2012, 24, 78-85.
- Tsai, C.S., Winans, S.C., “The quorum-hindered transcription factor *yenR* of *Yersinia enterocolitica* inhibits pheromone production and promotes motility via a small non-coding RNA”, *Mol. Microbiol.*, 2011, 80, 556-571.
- Tugcu, V., Kemahli, E., Ozbek, E., Arinci, Y.V., Uhri, M., Ertukuner, P., Metin, G., Seckin, I., Karaca, C., Ipekoglu, N., Altug, T., Cekmen, M.B., Tasci, A.I., “Protective effect of a potent antioxidant, pomegranate juice, in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethyleneglycol”, *J. Endourol.*, 2008, 22, 2723-2731.

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., “The human microbiome project”, *Nature*, 2007, 449, 804-810.
- Ugwu, F., Lemmens, G., Collen, D., Lijnen, R., “Matrix metalloproteinase deficiencies do not impair cell-associated fibrinolytic activity”, *Thromb. Res.*, 2001, 102, 61-69.
- Umesalma, S., Sudhandiran, G., “Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α e IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon”, 2010, *Carcinogenesis basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2010, 107, 650-655.
- Uroz, S., Dessaux, Y., Oger, P., “Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication”, *ChemBioChem*, 2009, 10, 205-216.
- Vallejo, F., Larrosa, M., Escudero, E., Zafrilla, M.P., Cerdá, B., Boza, J., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., “Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans”, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 6516-6524.
- van Merlo, J., Kaspers, G.J., Cloos, J., “Cell sensitivity assays: The MTT assay”, *Methods Mol. Biol.*, 2011, 731, 237-245.
- Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., El Jaziri, M., Baucher, M., “Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of *quorum-sensing*-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”, *Appl. Environm. Microbiol.*, 2010, 76, 243-253.
- Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rasamiravaka, T., Stévigny, C., Duez, P., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., Baucher, M., El Jaziri, M., “The flavanone naringenin reduces the production of *quorum sensing*-controlled virulence

- factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”, *Microbiology*, 2011, 157, 2120-2132.
- Varol, C., Zigmond, E., Jung, S., “Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria”, *Nature*, 2010, 10, 415-426.
- Vattem, D.A., Mihalik, K., Crixell, S.H., Mclean, R.J.C., “Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors”, *Fitoterapia*, 2007, 78, 302-310.
- Verzelloni, E., Pellacani, C., Tagliazucchi, D., Tagliaferri, S., Calani, L., Costa, L.G., Brighenti, F., Borges, G., Crozier, A., Conte, A., Del Río, D., “Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, 55, S35-S43.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G.K., Jesudhasan, P.R., Pillai, S.D., Patil, B.S., “Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids”, *J. Appl. Microbiol.*, 2010a, 109, 515-527.
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G.K., Pillai, B.S., Patil, B.S., “Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm”, *Int. J. Food Microbiol.*, 2010b, 140, 109-116.
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G.K., Pillai, B.S., Jayaraman, A., Patil, B.S., “Citrus flavonoid represses Salmonella pathogenicity island 1 and motility in *S. Typhimurium* LT2”, *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 145, 28-36.
- Villablanca. A.C., Jayachandran, M., Banka, C., “Atherosclerosis and sex hormones: current concepts”, *Clin. Sci.*, 2010, 199, 493-513.
- Vitela, S., Vilaseca, J., Antolin, M., García-Lafuente, A., Guarner, F., Crespo, E., Casalots, J., Salas, A., Malagelada, J.R., “Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat”, *Am. J. Gastroenterol.*, 2001, 96, 1486-1493.

- von Ruesten, A., Steffen, A., Floegel, A., van der A, D.L., Masala, G., Tjønneland, A., Halkjaer, J., Palli, D., Wareham, N.J., Loos, R.J.F., Sørensen, T.I.A., Boeing, H., “Trend in obesity prevalence in european adult cohort populations during follow-up since 1996 and their predictions to 2015, *Plos one*, 2011, 6(11), 1-9.
- Wang, C., Peyron, P., Mestre, O., Kaplan, G., van Soolinger, D., Gao, Q., Gicquel, B., Neyrolles, O., “Innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and other genotypes”, *PloS One*, 2010, 5, 1-8.
- Wang, S., Liu, Z., Wang, L., Zhang, X., “NF- κ B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer”, *Cell. Mol. Immunol.*, 2009, 6, 327-334.
- Wang, W.B., Lai, H.C., Hsueh, P.R., Chiou, R.Y.Y., Lin, S.B., Liaw, S.J., “Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol”, *J. Med. Microbiol.*, 2006, 55, 1313-1321.
- Waterhouse AL, “Wine phenolics”, *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 957, 21-36.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C., “Quorum-sensing in Gram-negative bacteria”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, 25, 365-404.
- Widlansky, M.E., Duffy, S.J., Hamburg, N.M., Gokce, N., Warden, B.A., Wiseman, S., Keaney, J.F. Jr., Frei, B., Vita, J.A., “Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease”, *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, 38, 499-506.
- Witkowski, J., Yang, L., Wood, D.J., Sung, P.K.L., “Migration and healing of ligament cells under inflammatory conditions”, *J. Orthoped. Res.*, 1997, 15, 269-277.
- Whitley, A.C., Stoner, G.D., Darby, M.V., Walle, T., “Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid-extensive binding to protein and DNA”, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, 66, 907-915.

- Willemsen, L.E.M., Koetsier, M.A., van Deventer, S.J.H., van Tol, E.A.F., “Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E₁ and E₂ production by intestinal myofibroblasts”, *Gut*, 2003, 52, 1442-1447.
- Winterbone, M.S., Tribolo, S., Needs, P.W., Kroon, P.A., Hughes, D.A., “Physiologically relevant metabolites of quercetin have no effect on adhesion molecule or chemokine expression in human vascular smooth muscle cells”, *Atherosclerosis*, 2009, 202, 431-438.
- Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W. Emam, A., Jenkins, D.J., “Colonic health: fermentation and short chain fatty acids”, *J. Clin. Gastroenterol.*, 2006, 40, 235-243.
- Wu, X., Schauss, A.G., “Mitigation of inflammation with foods”, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, [Epub ahead of print].
- Xie, S.X., Baek, Y., Grossman, M., Arnold, S.E., Karlawish, J., Siderowf, J., Hurtig, H., Elman, L., McCluskey, L., Van Deerlin, V., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., “Building an integrated neurodegenerative disease database at an academic health center”, *Alzheimers Dement.*, 2011, 7(4), e84-e93.
- Xu, L., Yang, Z.L., Li, P., Zhou, Y.Q., “Modulating effect of hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulfate sodium”, *Phytomedicine*, 2009, 16, 989-995.
- Yang G.Y., Taboada, S., Liao, J., “Inflammatory bowel disease: a model of chronic inflammation-induced cancer”, *Methods Mol. Biol.*, 2009, 511, 193-233.
- Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Cámara, M., Smith, H., Williams, P., “N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature- and acyl

- chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*”, *Infect. Immun.*, 2002, 70, 5635-5646.
- Yeh, C.C., Kao, S.J., Lin, C.C., Wang, S.D., Liu, C.J., Kao, S.T., “The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin *in vivo* and *in vitro*”, *Life Sci.*, 2007, 80, 1821-1831.
- Yochum, L., Kushi, L.H., Meyer, K., Folsom, A.R., “Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women”, *Am. J. Epidemiol.*, 1999, 149, 943-949.
- Yoo, J., Chung, C., Slice, L., Sinnet-Smith, J., Rozengurt, E., “Protein kinase D mediates synergistic expression of COX-2 induced by TNF- α and bradykinin in human colonic myofibroblasts”, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2009, 297, C1576-C1587.
- Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., Kuwano, M., “Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblasts growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis”, *Mol. Cell Biol.*, 1997, 17, 4015-4023.
- Young, G.M., Badger, J.L., Miller, V.L., “Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*”, *Infect. Immun.*, 2000, 68, 4323-4326.
- Young, G.M., “Flagella: organelles for motility and protein secretion, In: E. Carniel and B.J. Hinnebusch (ed.), *Yersinia: molecular and cellular biology*”, Horizon bioscience, Wymondham, United Kingdom, 2004, 243-256.
- Zargochev, L., Mulligan-Keboe, M.J., “Advances in imaging angiogenesis and inflammation in atherosclerosis”, *Thromb. Haemost.*, 2011, 105, 820-827.

- Zeng, Z., Qian, L., Cao, L., Tan, H., Huang, Y., Xue, X., Shen, Y., Zhou, S., “Virtual screening for novel *quorum sensing* inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 79, 119-126.
- Zhang, Y., Daaka, Y., “PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cy pathway”, *Blood*, 2011, 118, 5355-5364.
- Zhang, H., Park, Y., Wu, J., Chen, X., Lee, S., Yang, J., Dellsperger, K.C., Zhang, C., “Role of TNF- α in vascular dysfunction”, *Clin. Sci.*, 2009, 116, 219–230.
- Zheng, J., Shin, O.S., Cameron, D.E., Mekalanos, J.J., “*Quorum sensing* and global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 7, 21128-21133.
- Zieman S.J., Melenovsky, V., Kass, D.A., “Mechanism, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25, 932-943.
- Zijlstra, J.B., Beukema, J., Wolthers, B.G., Byrne, B.M., Groen, A., Dankert, J., “Pretreatment methods prior to gaschromatographic analysis of volatile fatty acids from faecal samples”, *Clin. Chim. Acta.*, 1997, 78, 243-250.
- Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., de Vos, W.M., “A microbial world within us”, *Mol. Microbiol.*, 2006, 59, 1639-1650.