

VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

Efecte protector dels compostos fenòlics àcid el·làgic, apocinina i rutina en el tractament de la colitis ulcerosa induïda per dextranosulfat sòdic

TESI DOCTORAL  
Marta Marín Vázquez



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

*Doctorat en Biomedicina i Farmàcia*

**Efecte protector dels compostos fenòlics àcid el·làgic, apocinina i rutina en el tractament de la colitis ulcerosa induïda per dextranosulfat sòdic**

TESI DOCTORAL

PRESENTADA PER  
Marta Marín Vázquez

DIRIGIDA PER  
Rosa M<sup>a</sup> Giner Pons  
M<sup>a</sup> Carmen Recio Iglesias

València, 2014



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

*Doctorat en Biomedicina i Farmàcia*

**Efecte protector dels compostos fenòlics  
àcid el·làgic, apocinina i rutina en el  
tractament de la colitis ulcerosa induïda  
per dextranosulfat sòdic**

**TESI DOCTORAL**

Escrita i presentada per:

**Marta Marín Vázquez**

València, Març 2014





# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

**Rosa M<sup>a</sup> Giner Pons**, Catedràtica del Departament de Farmacologia de la Universitat de València i **M<sup>a</sup> Carmen Recio Iglesias**, Professora Titular del Departament de Farmacologia de la Universitat de València

## CERTIFIQUEN:

Que el treball presentat per la Llicenciada D<sup>a</sup> **Marta Marín Vázquez**, titulat **“Efecte protector dels compostos fenòlics àcid el·làgic, apocinina i rutina en el tractament de la colitis ulcerosa induïda per dextranosulfat sòdic”**, ha sigut realitzat a la Unitat Docent de Farmacognòsia i Farmacodinàmia del Departament de Farmacologia de la Universitat de València, sota la nostra direcció i assessorament.

Conclòs el treball experimental i bibliogràfic, autoritzem la presentació d'aquesta Tesi Doctoral per tal que siga jutjada pel Tribunal corresponent.

En Burjassot, a 12 de Març de 2014.

Rosa M<sup>a</sup> Giner Pons

M<sup>a</sup> Carmen Recio Iglesias





La present Tesi Doctoral ha estat finançada pel projecte SAF2009-13059-C03-01 concedit pel Ministeri Espanyol de Ciència i Innovació (MICINN) junt amb el Fons Europeu de Desenvolupament Regional (FEDER), amb el Títol "*Fenols d'origen natural en el tractament i prevenció de la malaltia inflamatòria intestinal. Screening virtual, selecció i assajos farmacològics*".



La present tesi doctoral ha donat lloc a les següents publicacions:

### **ARTÍCLES**

Marín M, Giner RM, Ríos JL, Recio MC. Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. *J Ethnopharmacol.* 2013;150:925-34.

Marín M, Giner RM, Ríos JL, Recio MC. Protective Effect of apocynin in a mouse model of chemically-induced colitis. *Planta Med.* 2013;79:1392-400.

### **COMUNICACIONS A CONGRESOS**

Marín M, Giner E, Giner RM, Ríos JL, Recio MC. Effect of Ellagic acid on experimental Inflammatory Bowel Disease. XXXII Congrés de la Societat Espanyola de Farmacologia. León, 2010. Publicat en: *Eur J Clin Pharmacol.* (2010);66:S90. **Pòster.**

Giner RM, Marín M, Giner E, Ríos JL, Recio MC. Apocynin reduces dextran sulfate sodium-induced colonic inflammation in mice. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Berlín, 2010. Publicat en: *Planta Med.* 2010;76:1356. **Pòster.**

Giner E, Marín M, Recio MC, Ríos JL, Giner RM. Naringin protects against dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Berlín, 2010. Publicat en: *Planta Med.* 2010;76:1357. **Pòster.**

Marín M, Giner RM, Ríos JL, Recio MC. Looking for the anti-inflammatory activity of apocynin and its metabolite diapocynin on LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. XXXIII Congrès de la Societat Espanyola de Farmacologia. Málaga, 2011. Publicat en: *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;109:25. **Comunicació oral.**

Marín M, Giner-Ventura E, Giner RM, Ríos JL, Recio MC. Ellagic acid ameliorates experimental chronic ulcerative colitis. The Federation of European Pharmacological Societies (EPHAR). Granada, 2012. Publicat en: *Br J Pharmacol*. P137. **Pòster**

Giner-Pons RM, Marín M, Giner-Ventura E, Ríos JL, Recio MC. Rutin reduces colonic damage, expression of COX-2 and iNOS, and mRNA expression of IL-6 on DSS-induced experimental chronic ulcerative colitis. The Federation of European Pharmacological Societies (EPHAR). Granada, 2012. Publicat en: *Br J Pharmacol*. P154. **Pòster**

Sánchez-Rivera JP, Domingo A, Marín M, Garrigues TM, Recio MC. Study of the absorption of apocynin, anti-inflammatory natural product, in rats with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS). The Federation of European Pharmacological Societies (EPHAR). Granada, 2012. Publicat en: *Br J Pharmacol*. P396. **Pòster**

Recio MC, Marín M, Giner RM, Ríos JL. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin and its oxidative metabolite diapocynin ameliorate inflammation in mice. XXXIV Congrès de la Societat Espanyola de Farmacologia. Murcia, 2013. Publicat en: *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;113:27. **Pòster**

## Abreviatures

---

AA	Àcid araquidònic
ADN	Àcid desoxiribonucleic
Akt	Proteïna cinasa B ( <i>Protein Kinase B</i> )
ANOVA	Anàlisi de variància
AP-1	Proteïna activadora-1
ARN	Àcid ribonucleic
ATF-2	Factor activador de la transcripció 2 ( <i>Activating Transcription Factor 2</i> )
5-ASA	Àcid 5-aminosalicílic
Bcl-2	Proteïna 2 del limfoma de cèl·lules B ( <i>B cell lymphoma 2</i> )
Bcl-x <sub>L</sub>	Isoforma llarga de la proteïna Bcl-x ( <i>B-cell lymphoma-extra large</i> )
BSA	Albúmina sèrica bovina
CAM	Medicina complementaria i alternativa ( <i>Complementary and alternative medicines</i> )
COX	Ciclooxigenasa
CU	Colitis ulcerosa
DAB	3,3'-Diaminobencidina
DCFH-DA	Diacetat de 2',7'-diclorofluoresceïna
DMEM	Medi Eagle modificat per Dulbecco
DMSO	Dimetilsufòxid
DSS	Dextranosulfat sòdic
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EEM	Error estàndard de la mitja



EGCG	Gal·lat d'epigal·locatequina
EIA	Enzimoimmunoassaig
ELISA	Assaig per immunoadsorció lligat a enzims ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )
ERK	Cinases regulades per senyals extracel·lulars ( <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> )
ETs	El·lagitanins
EROs	Espècies reactives de l'oxigen
ERNs	Espècies reactives del nitrogen
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
HEPES	Àcid 4-(2-hidroxiètil)-1-piperazinetanosulfònic
HRP	Peroxidasa de rave
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peròxid d'hidrogen
IAM	Índex d'activitat de la malaltia
IFN	Interferó
IKK	Cinasa dels inhibidors de NF-κB
IL	Interleucina
iNOS	Òxid nítric sintasa induïble ( <i>Inducible NO synthase</i> )
IκB	Inhibidor de NF-κB
JAK	Cinases Janus ( <i>Janus kinases</i> )
JNK	Cinases del NH <sub>2</sub> terminal de c-Jun ( <i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i> )
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
LOX	Lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacàrid
LTB <sub>4</sub>	Leucotrié B <sub>4</sub>

MAPK	Proteïna-cinases activades per mitògens ( <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
MC	Malaltia de Crohn
MII	Malaltia inflammatòria intestinal
MMP	Metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazoli
NAD(P)	Fosfat dinucleòtid de nicotinamida i adenina
NF-κB	Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades ( <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
NO	Òxid nítric
Nrf2	Factor de transcripció 2 relacionat amb el factor nuclear eritroide-2 ( <i>Nuclear Factor Erythroid 2-related factor</i> )
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida ( <i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i> )
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa ( <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> )
PKC	Proteïna quinasa C
PLA	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PMN	Leucòcits polimorfonuclears
PMSF	Fluorur de metilsulfoni
PVDF	Poli(fluorur de vinilidé)

RPMI	Medi Roswell Park Memorial Institute
RT	Transcripció reversa ( <i>Reverse transcription</i> )
SCSIE	Servei Central de Suport a la Investigació Experimental
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SFB	Sèrum fetal boví
STAT	Transductor de senyal i activador de la transcripció ( <i>Signal transducers and activators of transcription</i> )
TEMED	Tetrametiletilendiamina ( <i>Tetramethylethylenediamine</i> )
TGF- $\beta$	Factor de creixement transformant ( <i>Transforming growth factor- <math>\beta</math></i> )
Th	Cèl·lules T col·laboradores ( <i>T helper</i> )
TMB	Tetrametilbencidina
TNBS	Àcid trinitrobencenosulfònic
TNF	Factor de necrosi tumoral ( <i>Tumoral necrosis factor</i> )
TPA	13-Acetata de 12-O-tetradecanoilforbol
VCAM-1	Molècula d'adhesió cel·lular vascular-1 ( <i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> )
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular ( <i>Vascular endothelial growth Factor</i> )

# Índex

---

<b>I. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA</b>	<b>7</b>
II.1. MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL (MII)	9
II.1.1. GENERALITATS	9
II.1.2. ETIOLOGIA I PATOGÈNESI	11
II.1.3. PRINCIPALS VIES DE SENYALITZACIÓ INVOLUCRADES EN LA MII	13
II.1.3.1. Factor Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)	13
II.1.3.2. Proteïna-cinases activades per mitògens (MAPKs)	17
II.1.3.2.1. ERK MAPK	17
II.1.3.2.2. JNK MAPK	18
II.1.3.2.3. p38 MAPK	18
II.1.3.3. Transductors de senyals i activadors de la transcripció (STATs)	19
II.1.3.4. Fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)	24
II.1.4. MODELS ANIMALS DE MII	25
II.1.4.1. Models induïts químicament	26
II.1.4.1.1. Colitis induïda per dextranosulfat sòdic (DSS)	26
II.1.4.1.2. Fàrmacs emprats en el tractament de la MII per DSS	28
– Àcid 5-aminosalicílic (5-ASA)	30
– Corticoides	31
– Immunosupressors	31
– Teràpia Biològica	32
II.1.5. NOVES PERSPECTIVES TERAPÈUTIQUES	33
II.1.5.1. Antiinflamatoris d'origen vegetal. Compostos fenòlics	35
II.1.5.1.1. Interès com agents antiinflamatoris	37
II.1.5.1.2. Principals compostos fenòlics en el tractament de la MII	39



III.2.2.2.1. Inflamació auricular aguda _____	78
III.2.2.2.2. Inflamació auricular crònica _____	79
III.2.2.2.3. Anàlisi histològica _____	81
III.2.2.3. Edema plantar induït per carragenina _____	81
III.3. DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES _____	83
III.3.1. EN L'HOMOGENEÏTZAT DE TEIXIT _____	83
III.3.1.1. Preparació de les mostres _____	83
III.3.1.2. Producció d'òxid nítric (NO) _____	84
III.3.1.3. Infiltració leucocitària _____	85
III.3.1.4. Producció de prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) _____	87
III.3.1.5. Producció de citocines _____	89
III.3.1.6. Quantificació de l'expressió proteica per electroforesi i Western Blot _____	92
III.3.1.7. Quantificació de l'expressió gènica per retrotranscripció i reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) _____	97
III.3.2. EN MOSTRES PLASMÀTIQUES _____	103
III.3.2.1. Obtenció de la mostra de sang _____	103
III.3.2.2. Determinació de la producció de citocines _____	103
III.4. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIINFLAMATÒRIA <i>IN VITRO</i> _____	103
III.4.1. CULTIU DE MACRÒFAGS RAW 264.7 _____	103
III.4.1.1. Tractaments _____	104
III.4.1.2. Assaig de proliferació i citotoxicitat _____	105
III.4.1.3. Determinacions bioquímiques _____	107
III.4.1.3.1. Producció de NO _____	107
III.4.1.3.2. Producció de PGE <sub>2</sub> _____	107
III.4.1.3.3. Formació intracel·lular d'EROs _____	108
III.4.1.3.4. Producció de citocines _____	109
III.4.1.3.5. Quantificació de l'expressió proteica per Western blot _____	109
III.5. ANÀLISI ESTADÍSTICA _____	111



<b>IV. RESULTATS</b>	113
IV.1. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIINFLAMATÒRIA <i>IN VIVO</i>	115
IV.1.1. COLITIS ULCEROSA AGUDA INDUÏDA PER DSS	116
IV.1.1.1. Estudi de paràmetres clínics: Índex d'activitat de la malaltia (IAM)	116
IV.1.1.2. Anàlisi de dany macroscòpic	118
IV.1.1.3. Anàlisi histològica	120
IV.1.1.4. Estudi bioquímic	122
IV.1.1.4.1. Activitat MPO	122
IV.1.1.4.2. Producció de mediadors inflamatoris	123
IV.1.1.4.3. Expressió proteica de COX-2 i iNOS, i producció de NO i PGE <sub>2</sub>	127
IV.1.1.4.4. Activació de NF-κB i STAT3	129
IV.1.2. COLITIS ULCEROSA CRÒNICA INDUÏDA PER DSS	131
IV.1.2.1. Estudi de paràmetres clínics: IAM	131
IV.1.2.2. Anàlisi de dany macroscòpic	132
IV.1.2.3. Anàlisi histològica	133
IV.1.2.4. Estudi bioquímic	135
IV.1.2.4.1. Expressió gènica de citocines inflamatòries	135
IV.1.2.4.2. Expressió proteica de COX-2 i iNOS	136
IV.1.2.4.3. Activació de p38 MAPK	138
IV.1.2.4.4. Degradació d'IκBα i activació transcripcional de NF-κB	139
IV.1.2.4.5. Activació de STAT3	141
IV.1.2.4.6. Activació d'Akt	143
IV.1.3. INFLAMACIÓ AURICULAR AGUDA INDUÏDA PER TPA	144
IV.1.4. INFLAMACIÓ AURICULAR CRÒNICA INDUÏDA PER APLICACIÓ REPETIDA DE TPA	145
IV.1.4.1. Anàlisi histològica	146
IV.1.4.2. Estudi bioquímic	148
IV.1.4.2.1. Activitat MPO	148

IV.1.4.2.2. Expressió de COX-2	148
IV.1.5. EDEMA PLANTAR INDUÏT PER CARRAGUENINA	149
IV.2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIINFLAMATÒRIA <i>IN VITRO</i> EN MACRÒFAGS RAW 264.7	150
IV.2.1. CITOTOXICITAT	150
IV.2.2. EFECTE SOBRE LA PRODUCCIÓ D'EROS	151
IV.2.3. EFECTE SOBRE LA PRODUCCIÓ DE NO I L'EXPRESSIÓ D'INOS	152
IV.2.4. EFECTE SOBRE L'EXPRESSIÓ DE COX-2 I LA PRODUCCIÓ DE PGE <sub>2</sub>	154
IV.2.5. EFECTE SOBRE LA PRODUCCIÓ DE CITOCINES PROINFLAMATÒRIES	156
IV.2.6. EFECTE EN L'ACTIVACIÓ DE NF-κB	156
<b>V. DISCUSSIÓ</b>	159
<b>VI. CONCLUSIONS</b>	183
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	187
<b>VIII. ANNEXOS</b>	229
ANNEX I. SEMISÍNTESI DE DIAPOCININA	231
ANNEX II. ESTUDI PRELIMINAR D'ABSORCIÓ D'APOCININA EN RATES AMB CU INDUÏDA PER DSS	235
ANNEX III. CERTIFICAT DEL COMITÉ ÈTIC	239
<b>IX. ARTICLES PUBLICATS</b>	241



# I. INTRODUCCIÓ

---



Sota el nom de malaltia inflamatòria intestinal (MII) s'agrupen dos patologies inflamatòries cròniques i recidivants principals: la malaltia de Crohn (MC) i la colitis ulcerosa (CU). Encara que d'etiologia desconeguda, s'accepta en la seua patogènia una sensibilització del sistema immune determinada, en part, genèticament, front a la flora resident autòctona i a altres antígens intraluminals. Aquesta resposta resulta en una hiperreactivitat limfocitària i una sobreproducció de mediadors proinflamatoris que perpetuen la resposta en el temps, condicionant el caràcter crònic i recurrent d'aquests processos (Xavier i Podolsky, 2007). Dins el tub digestiu, el procés inflamatori que caracteritza la CU afecta potencialment a la mucosa del còlon des del recte fins a la seua totalitat (Fantini *et al.*, 2007). Per contra, la MC pot afectar a qualsevol tram del tub digestiu, sent l'ili terminal i el còlon les àrees més freqüentment involucrades. Ambdós entitats difereixen al mateix temps en les seues característiques i evolució natural de la resposta immune, en funció del distint perfil de mediadors que alliberen (Bouma i Strober, 2003).

En l'actualitat, el tractament d'aquestes malalties es fonamenta en alterar el seu curs, actuant sobre la resposta autoimmune i inflamatòria que danya la mucosa gastrointestinal. Amb l'ús d'esteroides o d'antagonistes de citocines proinflamatòries com el factor de necrosi tumoral (TNF)- $\alpha$ , es busca induir la remissió de l'activitat immune en pacients amb la malaltia activa en les formes moderades i severes. En canvi, l'ús de fàrmacs immunosupressors i aminosalicilats afavoreix el manteniment i evita l'aparició de recaigudes (Bousoño i Ramos, 2006; Mowat *et al.*, 2011). No obstant això, l'eficàcia clínica d'aquests agents és limitada degut, entre altres, a una menor taxa en el manteniment de la



remissió i a l'augment del risc de neoplàsies malignes amb agents com anti-TNF (Beaugerie *et al.*, 2009; Afif i Loftus, 2010; Galloway *et al.*, 2011).

Així, l'ampli reconeixement dels límits de la medicina convencional ha suscitat un interès cada vegada major en l'ús de la medicina complementària i alternativa (CAM), sent aquesta una opció important entre aquells que pateixen malalties cròniques. En general, les persones que opten per aquest tipus de tractament busquen, bé millorar la seua salut i benestar i alleujar els símptomes associats a aquest tipus de malalties, bé reduir els efectes secundaris dels tractaments convencionals (Shen *et al.*, 2002a; Humpel i Jones, 2006).

L'ús de productes naturals s'inclou dins de les opcions més emprades i reconegudes dels tractaments complementaris a la medicina convencional. Cada vegada més estudis epidemiològics destaquen la modulació de la resposta inflamatòria a través de la implantació d'uns hàbits de vida saludables, relacionats amb una dieta rica en aliments d'origen vegetal (Bravo, 1998; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Hu, 2003; Most, 2004; Shapiro *et al.*, 2007). Es tracta d'aliments amb un potencial efecte beneficiós atribuït, en gran part, a l'elevat contingut en substàncies bioactives com són els compostos fenòlics (Tsao, 2010). Una de les propietats més estudiades que reconeixen aquest grup de metabòlits secundaris com a promotors de la salut, és la seua potent activitat antioxidant demostrada *in vitro*, la qual podria ser responsable dels seus efectes protectors demostrats *in vivo*. No obstant això, l'opinió actual sosté que els efectes *in vivo* deriven, en part, de la seua interacció amb

proteïnes involucrades en la transducció de senyals i l'expressió gènica (Heiss *et al.*, 2005, Scalbert *et al.*, 2005).

Una visió global demostra que aquests compostos bioactius actuen evitant les causes del dany al teixit, inhibint les vies de senyalització i l'activació de factors de transcripció (Nomura *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2006), inhibint enzims generadors d'espècies oxidants i mediadors de la inflamació (Yoon i Baek, 2005), capturant espècies reactives de l'oxigen (EROs) i nitrogen (ERNs) generades per cèl·lules inflamatòries (Rice-Evans, 1996) i modulant l'angiogènesi i la metàstasi (Watson *et al.*, 2000; Ramos, 2008). Un exemple ben clar és la curcumina, obtinguda a partir dels rizomes de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) (Gupta, 2012). Des que en 1949 es va demostrar la seua activitat antibacteriana, s'ha convertit en un dels nutraceutics més àmpliament estudiats i fins i tot s'han realitzat estudis preclínics en un gran nombre de malalties (Aggarwal i Harikumar, 2009) on ha demostrat ser eficaç pel seu efecte sobre la interacció amb nombroses molècules de senyalització (Gupta *et al.*, 2011, 2013).

El nostre grup d'investigació compta amb una dilatada experiència en l'estudi de l'activitat antiinflamatòria de productes d'origen vegetal (Recio *et al.*, 1995, Cuéllar *et al.*, 2001, Sala *et al.*, 2002, Prieto *et al.*, 2004 i 2008, Hernández *et al.*, 2005; Olmos *et al.*, 2007; Andújar *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2011a). Açò, junt amb la indiscutible rellevància dels derivats fenòlics com agents farmacològics amb activitat antiinflamatòria demostrada, ha permès que el grup haja orientat la seua investigació cap a l'estudi de l'efecte protector de derivats fenòlics seleccionats en una de les malalties amb un component inflamatori important com es la CU. En aquest context, en 2009 l'antic Ministeri de Ciència i Innovació, va finançar

un projecte que tenia com hipòtesi demostrar que diferents compostos d'origen natural amb estructura fenòlica són actius en diferents models *in vivo* e *in vitro* d'inflamació intestinal, alleujant i millorant els símptomes de la malaltia, arribant fins i tot a poder elucidar el mecanisme d'acció dels compostos estudiats.

Així, en els últims anys, s'han obtingut bons resultats en el tractament de la CU experimental amb alguns productes naturals purs com shikonina (Andújar *et al.*, 2012) i oleuropeïna (Giner *et al.*, 2011b, 2013), i amb un extracte de cacau (*Theobromacacao* L., Sterculiaceae) enriquit amb polifenols (Andújar *et al.*, 2011). Per tant, aquest estudi planteja continuar en aquesta línia d'investigació i selecciona tres dels compostos fenòlics inclosos al projecte concedit, àcid el·làgic, apocinina i rutina. Així doncs, els objectius de la present tesi doctoral són els següents:

- Adequació del mètode d'administració oral dels compostos, àcid el·làgic, apocinina i rutina, incorporats a la dieta normal dels ratolins.
- Avaluació, en absència de malaltia, els efectes dels compostos en estudi.
- Estudi de l'activitat antiinflamatòria de l'àcid el·làgic, apocinina i rutina en un model experimental de colitis ulcerosa aguda induïda per DSS en ratolins Balb/C. Anàlisi macroscòpica, histològica i bioquímica.

- Establir les condicions, amb l'administració cíclica de DSS, que simulen una inflamació intestinal crònica i avaluar els efectes dels compostos en estudi.
- Elucidar els mecanismes moleculars mitjançant els quals els compostos poden modular el procés inflamatori intestinal.



## II. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA





## II.1. MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL (MII)

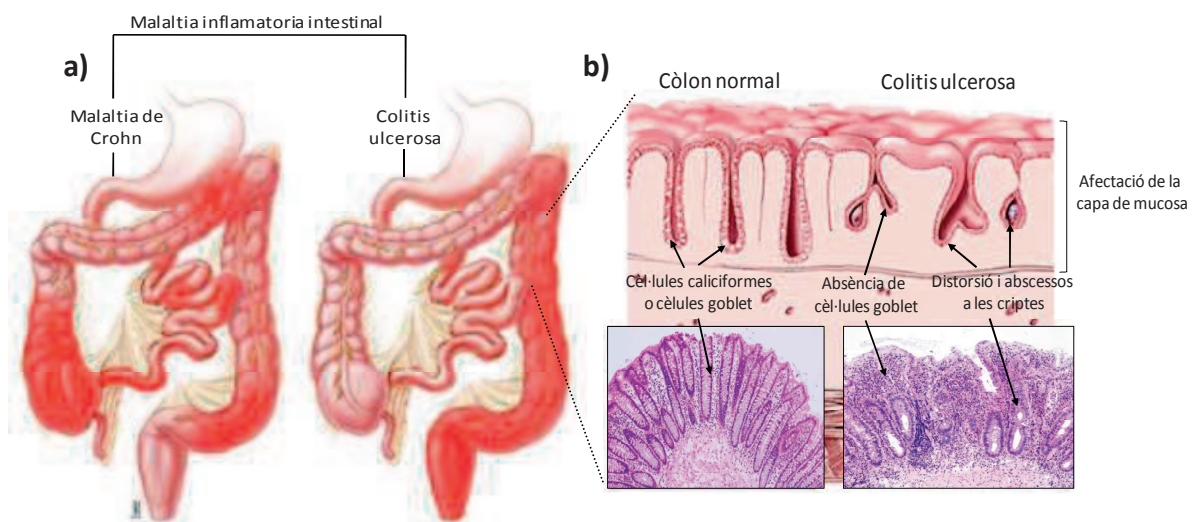
### II.1.1. GENERALITATS

La malaltia inflamatòria intestinal (MII) inclou una àmplia varietat de presentacions i manifestacions clíniques, la principal característica de les quals és la inflamació crònica del tracte digestiu en diferents localitzacions. Aquesta cronicitat en el curs clínic de la malaltia es fonamenta amb l'alternança de períodes d'inactivitat o quiescència, identificats com les fases de remissió, amb períodes d'activitat clínica de diferent intensitat, coneguts com a brots o recidives (Mendoza *et al.*, 2007). Actualment, el concepte de MII engloba dos entitats principals: la colitis ulcerosa (CU) i la malaltia de Crohn (MC). Malgrat les diferències en la localització, extensió i severitat de la inflamació, ambdues entitats presenten característiques patològiques comunes que en moltes ocasions fan difícil diferenciar-les.

D'una banda, la CU es defineix com una inflamació difusa del còlon, amb afectació del recte, i que s'estén de manera proximal i continua. La lesió histològica característica és la presència d'abscessos a les criptes, produint-se un elevat infiltrat inflamatori a la *lamina propria*, que s'estén tant lateral com verticalment al llarg de la mucosa del còlon. No obstant això, les dades clau en el diagnòstic de la CU són les que mostren cronicitat, com la deformació arquitectònica i l'atròfia de les criptes, produint-se un augment de la separació entre elles i una disminució significativa del seu nombre, així com la troballa d'agregats limfoides basals i infiltrat inflamatori crònic, tot això associat a la disminució de moc (Jewel, 2004) (Figura II.1).

D'altra banda, la MC es caracteritza per una inflamació crònica i transmural (afectant a totes les capes de l'intestí) que pot afectar a qualsevol part del tracte digestiu des de la boca fins a l'anus, sent típicament discontinua o irregular. La característica histològica clau en la MC és la presència de granulomes no caseïficans, es a dir, un conjunt de macròfags epitelioides (macròfags grans i rosats semblants a les cèl·lules epitelials), rodejats d'un anell de limfòcits, i en ocasions cèl·lules plasmàtiques, envoltats alhora per un anell de fibroblasts i teixit conjuntiu (Mendoza *et al.*, 2007).

En ocasions, ni les lesions endoscòpiques ni l'estudi histològic permeten diferenciar, en aquesta malaltia, entre les dues entitats, la CU i la MC, la qual cosa fa impossible un diagnòstic definitiu conegut com a colitis indeterminada (Romano *et al.*, 2008).



Adaptat de:  
[https://gi.ihsp.org/GDL\\_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL\\_Disease\\_ID=2A4995B2-DFA5-4954-B770-F1F5BAFED033&GDL\\_DC\\_ID=D03119D7-57A3-4890-A717-CF1E7426C8BA](https://gi.ihsp.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Disease_ID=2A4995B2-DFA5-4954-B770-F1F5BAFED033&GDL_DC_ID=D03119D7-57A3-4890-A717-CF1E7426C8BA)

**Figura II.1.** a) Distribució anatòmica de la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa, b) representació de la lesió histològica que caracteritza la colitis ulcerosa.

## II.1.2. ETIOLOGIA I PATOGÈNESI

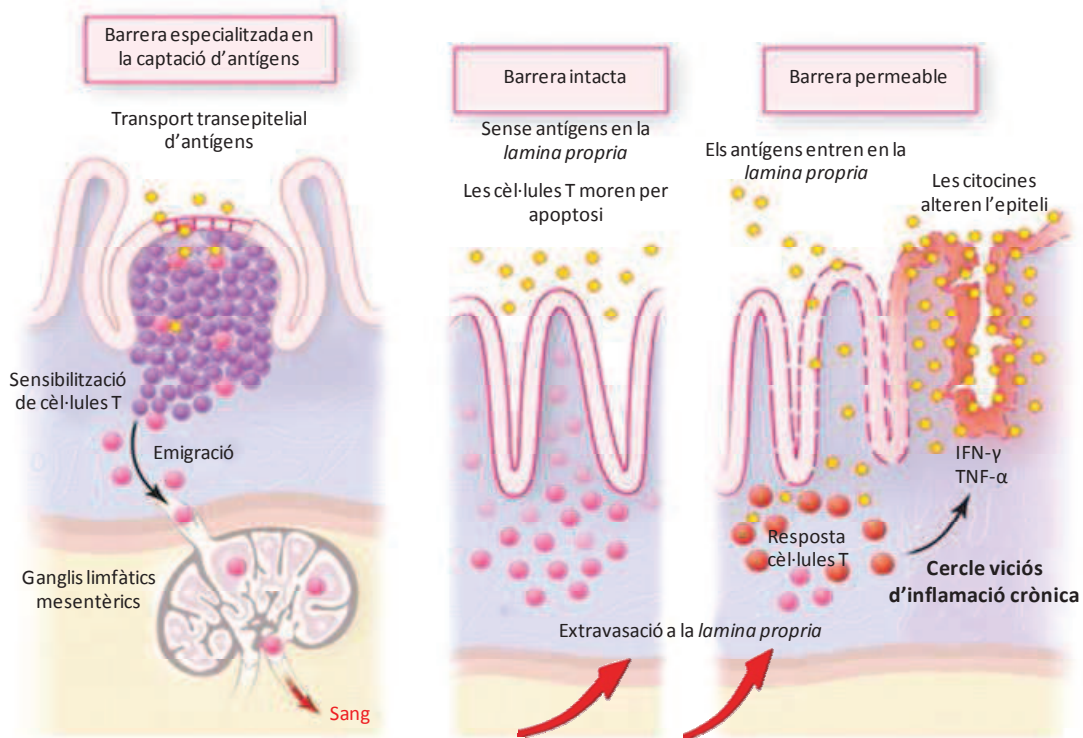
Malgrat que els mecanismes fisiopatològics implicats amb l'inici i la perpetuació de la MII encara no han estat establerts amb exactitud, es suggereixen alguns factors etiològics comuns entre les diferents entitats. Es creu que existeix una complexa interacció entre la susceptibilitat genètica, el sistema immunològic i determinats desencadenants mediambientals, on s'inclou la població microbiana resident al tracte intestinal (Abraham i Cho, 2009).

En condicions normals, la presentació d'antígens intestinals condueix a una tolerància local o una resposta immune controlada i no sistèmica que pot ser caracteritzada com una inflamació de baix grau o fisiològica. Un mal funcionament d'aquest mecanisme immunoregulador, que prevé una resposta fisiològica front a antígens en la dieta o bacteris comensals, comporta una reacció inflamatòria intestinal permanent que causa la MII.

El procés s'inicia amb l'alteració de la barrera mucosa-epitelial, el que origina una activació seqüencial de la resposta immune innata, iniciada per un flux incontrolat d'antígens cap a la *lamina propria*. Les cèl·lules dendrítiques residents a la *lamina propria*, a través d'una presentació anormal secundària d'antígens a les cèl·lules T CD4+, indueixen l'activació i la diferenciació de les cèl·lules T específiques en cèl·lules T efectores. Aquestes últimes formen part d'una resposta immune adaptativa exagerada que intenta compensar el defecte en la resposta immune innata anterior (Blumberg, 2009).

Las cèl·lules T efectores són polaritzades a tipus cel·lulars altament especialitzats que es defineixen segons siguin cèl·lules T col·laboradores o *helper* 1 (Th1), Th2 o Th17. La mucosa de pacients amb MC està dominada pel fenotip cel·lular Th1, caracteritzat per una sobreproducció d'interferó (IFN)- $\gamma$  i interleucina (IL)-2 (Parronchi *et al.*, 1997). D'altra banda, la mucosa de pacients amb CU està dominada pel fenotip Th2, amb una elevada producció d'IL-4, IL-5 i IL-13 (Heller *et al.*, 2005). No obstant això, tant a l'estat estacionari com a l'estat inflammat de la mucosa intestinal, el nou llinatge de cèl·lules T CD4+, Th17, representa la major població cel·lular, encarregada de la producció del factor de transcripció específic d'aquest llinatge cel·lular (el receptor orfe relacionat amb l'àcid retinoic [ROR]- $\gamma$ t), de la producció de les citocines IL-17, IL-17F, IL-21, IL-22 i del factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF). A més, els macròfags en la CU i la MC, són els principals productors de les citocines proinflamatòries IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , el que permet l'amplificació d'una gran varietat de cascades inflamatòries promocionant el procés inflamatori (Podolsky, 2002).

Per tant, la incontrolada proliferació i activació de limfòcits T en la *lamina propria* junt amb la migració de més cèl·lules inflamatòries procedents del teixit vascular (Rutgeerts *et al.*, 2003) i la sobreproducció de citocines proinflamatòries i la resistència a l'apoptosi permeten l'acumulació de més cèl·lules T i, amb això, la perpetuació de la resposta inflamatòria (Podolsky, 2002) (Figura II.2).



Adaptat de MacDonald i Monteleone (2005)

**Figura II.2.** Efecte de l'increment en la permeabilitat epitelial sobre el desenvolupament de la inflamació crònica intestinal mediada per cèl·lules T.

### II.1.3. PRINCIPALS VIES DE SENYALITZACIÓ INVOLUCRADES EN LA MII

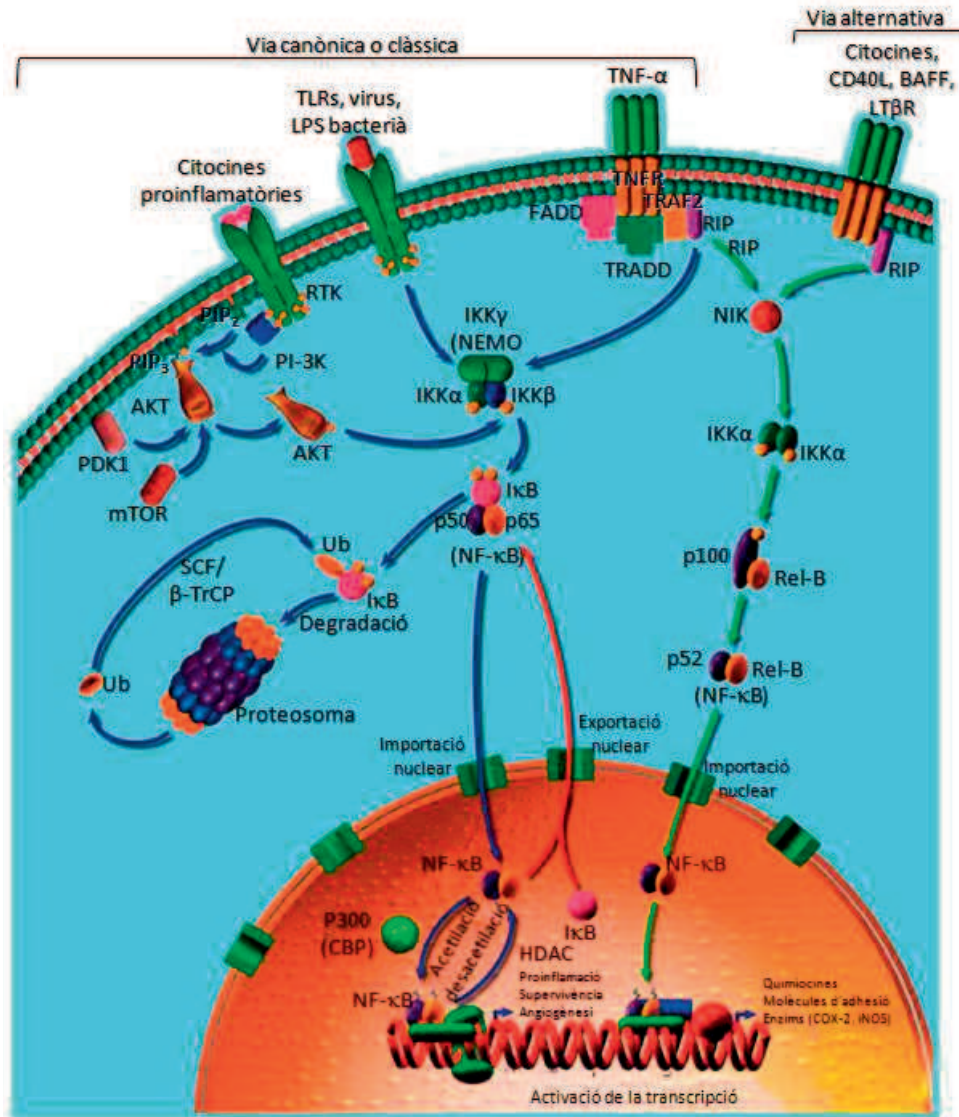
#### II.1.3.1. Factor Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

El NF- $\kappa$ B pertany a una família de factors de transcripció induïbles que modula l'expressió de gens involucrats en el control de la resposta immune i inflamatòria. En cèl·lules en repòs, els membres de la família del factor de transcripció (RelA o p65, RelB, c-REL, p105/p50 i p100/p52) existeixen com a dímers inactius en associació amb l'inhibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Després de l'estimulació per una gran varietat d'agents (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , lipopolisacàrid bacterià [LPS], bacteris, virus, estrès oxidatiu, etc.), el I $\kappa$ B és fosforilat per l'acció del complex I $\kappa$ B cinasa (IKK) i degradat pel sistema

ubiquitina-proteosoma (Karin i Ben-neriah, 2000). El NF- $\kappa$ B lliure migra al nucli, on regula la transcripció de mediadors proinflamatoris com citocines i quimiocines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), enzims (òxid nítric sintasa induïble [iNOS] i ciclooxigenasa [COX]-2) i molècules d'adhesió cel·lular (molècules d'adhesió cel·lular vascular [VCAM]-1, molècules d'adhesió intercel·lular [ICAM]-1 i E-selectina) (Fan *et al.*, 2013).

En aquest esquema general d'activació del NF- $\kappa$ B es poden diferenciar dues vies independents, basades en l'ús de la subunitat catalítica IKK. Aquest complex cinasa consisteix en dos subunitats, l'IKK1 i l'IKK2 (també anomenades IKK $\alpha$  i  $\beta$ , respectivament), i una subunitat reguladora coneguda com modulador essencial de NF- $\kappa$ B (NEMO) o subunitat IKK $\gamma$ . D'una banda, la via canònica o clàssica, dependent de l'activitat d'IKK2, és activada per una àmplia varietat de citocines proinflamatòries que indueixen l'alliberació dels dímers p65 i c-Rel del factor de transcripció. Aquesta via està principalment involucrada en la regulació de la inflamació i la supervivència cel·lular. En canvi, la via alternativa, dependent del complex IKK1, resulta amb el processament de la subunitat p100 i l'activació dels dímers p52/RelB. El seu paper és poc conegut en la inflamació intestinal (Wullaert, 2010) (Figura II.3).





Adaptada de <http://www.thisisms.com/forum/general-discussion-f1/topic12548.html>

**Figura II.3.** Esquema general d'activació de NF-κB

Degut a la seua capacitat per a induir l'expressió de nombrosos mediadors proinflamatoris, el NF-κB es considera un dels factors de transcripció clau en la fisiopatologia de moltes malalties inflamatòries cròniques (Hayden *et al.*, 2006). Els primers indicis que impliquen al NF-κB en la patogènesi de la MII provenen d'estudis que demostren una elevada presència nuclear de la subunitat p65 en biòpsies de la mucosa del còlon i en cèl·lules mononuclears de la *lamina propria* en pacients amb la malaltia



activa (Ellis *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998). Posteriorment, s'ha vist que el NF- $\kappa$ B s'expressa i es manté en estat d'activació especialment en cèl·lules epitelials i macròfags de la mucosa d'aquests pacients, la qual cosa indica que la transcripció dependent del factor en ambdós tipus cel·lulars contribueix a la patogènesi de la MII. A més, s'ha establert que la quantitat de NF- $\kappa$ B també es correlaciona de forma significativa amb la severitat de la inflamació intestinal (Rogler *et al.*, 1998; Monteleone *et al.*, 2004).

No obstant això, mentre que als macròfags el NF- $\kappa$ B es considera un clar agent proinflamatori en la MII, per la vital importància de la seua activació en la resposta de les cèl·lules immunes innates front a patògens intestinals, en l'actualitat és ben conegut que la senyalització del factor de transcripció en cèl·lules epitelials podria tenir efectes protectors pel manteniment de la integritat del teixit. De fet, la seua resposta antiapoptòtica és imprescindible en les cèl·lules endotelials per tal de controlar l'homeòstasi intestinal immune (Wullaert, 2010).

Dins el panorama general d'actuació en el tractament de la MII, fàrmacs como la sulfasalazina, mesalamina i els corticoides prevenen l'activació del factor de transcripció, encara que manquen d'especificitat. Així doncs, s'estan desenvolupant noves estratègies de tractament dirigides al bloqueig selectiu de l'activació del NF- $\kappa$ B en macròfags i cèl·lules T de la mucosa intestinal. No obstant això, cal tenir en compte que molts dels gens regulats pel factor de transcripció estan involucrats en la supervivència cel·lular.

### II.1.3.2. Proteïna-cinases activades per mitògens (MAPKs)

Les MAPKs constitueixen un grup heterogeni d'enzims que actuen com a components bàsics de les cascades de senyalització en cèl·lules eucariotes, on diferents estímuls extracel·lulars convergeixen per tal d'iniciar una àmplia varietat de processos cel·lulars, on s'inclouen el creixement, la proliferació, diferenciació, migració, supervivència i inflamació cel·lular (Coskun *et al.*, 2011). L'activació d'aquestes cascades per citocines proinflamatories com IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , patògens, LPS i factors estressants, condueix a la fosforilació i activació d'aquests factors transcripcionals que regulen gens implicats en la MII (Waetzig *et al.*, 2002; Mitsuyama *et al.*, 2006a).

Es distingeixen actualment tres grups de MAPKs en humans: les cinases regulades per senyals extracel·lulars (ERK1/2, també conegudes com p42/p44 MAPKs), les cinases del NH<sub>2</sub> terminal de c-Jun (JNK1/2/3) i la família p38 MAPKs (amb les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ) (Coskun *et al.*, 2011).

#### II.1.3.2.1. ERK MAPK

La ruta mediada per ERK és vital en un gran nombre de transformacions que comprenen el creixement, la diferenciació i la supervivència cel·lular. Se sap que regulen l'activació de la família de la proteïna activadora 1 (AP-1) on s'inclouen c-Jun, c-Fos i el factor d'activació de la transcripció 2 (ATF-2) (Hommes *et al.*, 2003). A més, actualment sembla clar que també participen en processos inflamatoris mitjançant l'activació de la producció de citocines a partir de cèl·lules T (Egerton *et al.*, 1996).

El paper de les ERK1/2 en el desenvolupament i la progressió de la MII ha estat demostrat per la seua participació com a mediadors en les vies de senyalització de citocines com IL-1 i IL-21 (Caruso *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2007), tant en cèl·lules del sistema immune com en colonòcits. La seua fosforilació i conseqüent activació es troben significativament elevades als estadis de la malaltia activa (Waetzig *et al.*, 2002). No obstant això, malgrat la seua coneguda implicació en la MII i en la inflamació en general, la investigació sobre el paper de les MAPKS en la MII s'ha centrat principalment en les dos famílies següents:

#### **II.1.3.2.2. JNK MAPK**

La ruta de senyalització de JNK és activada per senyals d'estrès i fosforila els dos components primaris de transcripció c-Jun (Roy *et al.*, 2008) i ATF-2 de la família de AP-1, el que el relaciona amb l'apoptosi i la proliferació cel·lular (Jeong *et al.*, 2008); ambdós processos són d'especial importància tenint en compte que una disfunció del procés apoptòtic s'observa comunament en cèl·lules T i monòcits durant la MII (Sartor, 2006). A més, la seua activitat sobre la família de factors de transcripció AP-1 implica la regulació de la transcripció gènica de citocines com TNF- $\alpha$  i ILs, els quals són potents mediadors de la malaltia (Novotny *et al.*, 1998; Zenz *et al.*, 2008).

#### **II.1.3.2.3. p38 MAPK**

La via de la cinasa p38 és activada per un gran nombre d'estímuls cel·lulars estressants i citocines inflamatòries (IL-1, IL-2, IL-7, IL-17, IL-18, factor de creixement transformant [TGF]- $\beta$  i TNF- $\alpha$ ). Comparteix moltes similituds amb la resta de cascades de MAPKs, participant en molts

aspectes de la fisiologia cel·lular i exercint un paper crític per a la resposta inflamatòria normal. La seua activació condueix a l'activació del factor de transcripció ATF-2, el factor potenciador de miòcits (MEF-2) (Ono *et al.*, 2000) i el NF- $\kappa$ B (Hollenbach *et al.*, 2004), entre d'altres. La principal resposta biològica a l'activació de p38 consisteix en estimular la producció de mediadors de la inflamació per tal d'iniciar el reclutament i l'activació de leucòcits. Un exemple d'això és la seua capacitat per a regular l'expressió de VCAM-1 induïda per TNF- $\alpha$  en cèl·lules endotelials (Pietersma *et al.*, 1997). En pacients amb la MII, s'ha descrit una sobreexpressió de la isoforma p38 $\alpha$  en macròfags i neutròfils de la *lamina propria* intestinal (Waetzig *et al.*, 2002).

### **II.1.3.3. Transductors de senyals i activadors de la transcripció (STATs)**

La família citoplasmàtica de factors de transcripció STATs és reconeguda com una de les principals mediadores de la senyalització durant la resposta immune, on exerceix un paper clau en el desenvolupament i la diferenciació cel·lular. Per a la seua activació es requereix la fosforilació del residu tirosina per part de la família de Janus cinases (JAKs), associades a receptors de citocines en la superfície cel·lular (Egwuagu, 2009). La unió de citocines i factors de creixement al seus receptors específics comporta la fosforilació de les proteïnes STAT al residu de tirosina (Tyr 705 en el cas de STAT3), el que dóna lloc a la seua dimerització i migració al nucli, on s'uneixen a les regions promotores de gens que codifiquen proteïnes inflamatòries i reguladores del cicle cel·lular.

Entre ells, se sap que el STAT3 participa en la patogènesi de la MII, ja que la seua activitat i expressió es correlacionen amb el curs de la malaltia (Suzuki *et al.*, 2001; Mudter *et al.*, 2005). No obstant això, la seua activitat no està exempta de controvèrsia. D'una banda, l'activació del factor de transcripció en les cèl·lules innates té un paper regulador de la colitis controlant la funció barrera de les cèl·lules epitelials i l'activació dels macròfags; d'aquesta forma, contribueix a la supressió de la malaltia per mitjà de la reparació de la mucosa i la inducció de la producció de mucina. D'altra banda, la seua activació en cèl·lules de la immunitat adquirida té un paper patològic en la colitis crònica; el STAT3 fosforilat (pSTAT3) augmenta la supervivència del fenotip patogènic cel·lular Th17 i, així, l'expressió gènica de les proteïnes antiapoptòtiques, la proteïna 2 del limfoma de cèl·lules B (Bcl-2) i la isoforma llarga del Bcl-x (Bcl-x<sub>L</sub>), el que indueix una prolongada supervivència de les cèl·lules T CD4+ activades (Sugimoto, 2008; Li *et al.*, 2010a). Malgrat aquestes activitats contraposades, cada vegada més estudis demostren que els efectes proinflamatoris mediats per l'activació de STAT3 a les cèl·lules del sistema immune adquirit són més importants en desenvolupar i perpetuar la resposta inflamatòria del còlon que els efectes antiinflamatoris de l'activació del factor a les cèl·lules del sistema immune innat (Suzuki *et al.*, 2001).

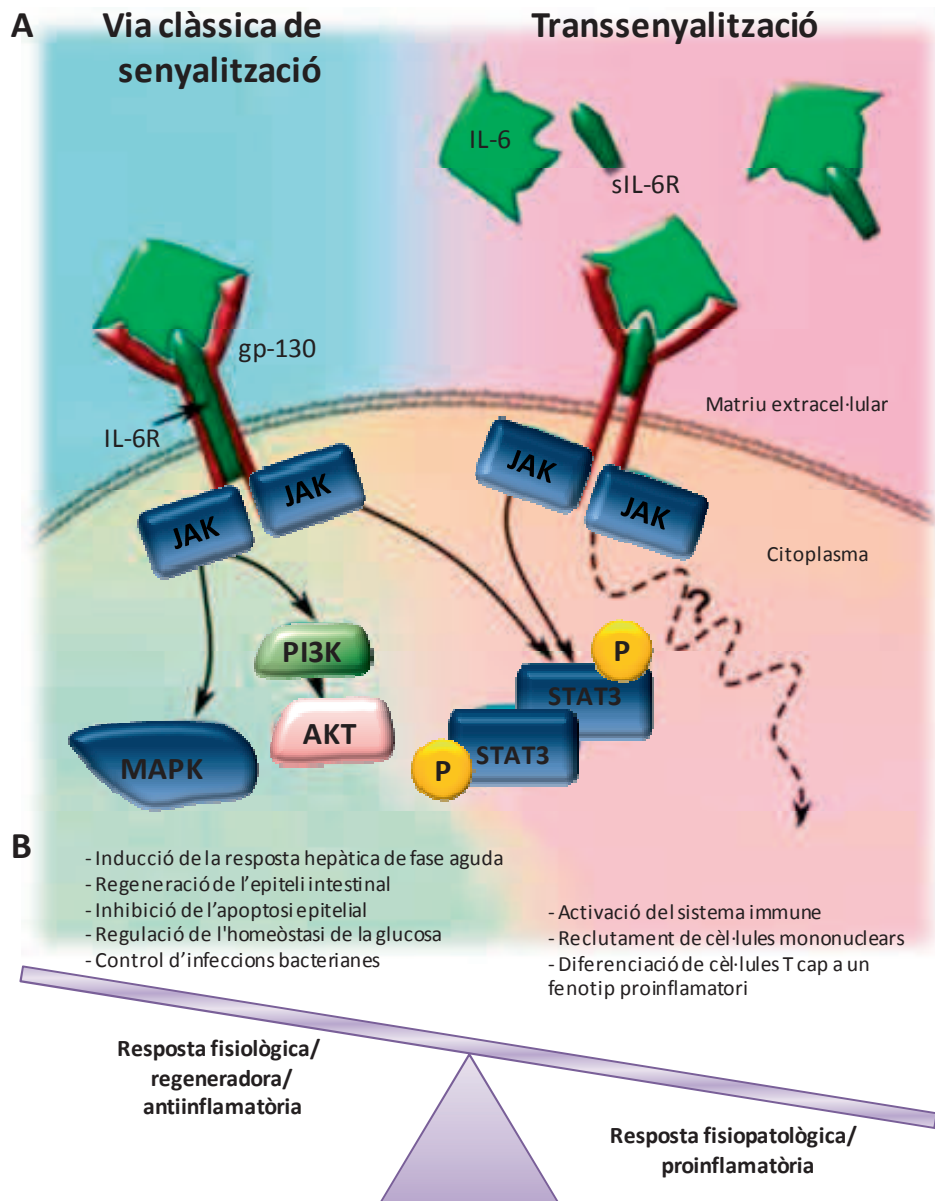
Un potent mediador del STAT3 és la citocina IL-6, per a la que existeixen dos tipus de receptors diferents: IL-6R i gp130. D'una banda, la IL-6 s'uneix al receptor IL-6R en les cèl·lules diana formant un complex que s'associa posteriorment a la proteïna gp130; aquesta associació promou la seua dimerització i la consegüent activació de la senyalització intracel·lular

mitjançant la fosforilació de proteïnes associades al seu domini intracel·lular (per exemple la de STAT3 per les JAKs). A més del receptor IL-6R unit a la membrana, una forma soluble d'aquest (sIL-6R) s'ha identificat en fluids biològics. Se sap, que el complex sIL-6R-IL-6 estimula tan sols cèl·lules que expressen gp130 en un procés conegut com transsenyalització. Curiosament, quasi totes les cèl·lules del cos expressen gp130, no obstant això, l'expressió d'IL-6R està restringida a neutròfils, monòcits/macròfags i alguns limfòcits. Així doncs, en pacients amb la MII, la majoria de les cèl·lules de la *lamina propria* no expressen el receptor IL-6R i, en canvi, s'ha observat un increment en les concentracions sèriques de la forma soluble d'aquest en cèl·lules mononuclears intestinals i en biòpsies de pacients amb MC i CU, el que suggereix que la producció del receptor és coordinada com part de la resposta inflamatòria en la MII (Yao *et al.*, 2014) (Figura II.4).

D'una banda, la generació d'sIL-6R per part de l'infiltrat de neutròfils en la fase aguda de la inflamació regula l'expressió de quimiocines que suprimeixen el reclutament de més neutròfils, però promouen l'atracció de monòcits i limfòcits, el que pot ser significatiu en l'inici de la malaltia crònica. A més, el bloqueig de la transsenyalització s'ha demostrat que suprimeix l'expressió dels gens antiapoptòtics dependents de STAT3, el que comporta la retenció dels leucòcits activats al lloc de la inflamació (Mitsuyama *et al.*, 2006b). A més, el grau d'inflamació intestinal es correlaciona amb la quantitat de pSTAT3 en seccions histològiques de pacients amb la MII (Li *et al.*, 2010a). En aquest sentit, s'ha demostrat que la inactivació de la cascada IL-6/STAT3 en les cèl·lules T de la *lamina propria* contribueix a atenuar la inflamació intestinal crònica mediada per les cèl·lules T de la immunitat adquirida

(Yamamoto *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001), el que demostra que IL-6 participa no sols en mitjançar la inflamació sinó que també contribueix en la patologia de la MII.

A més d'aquest senyal específic de STAT3, l'activació de gp130 activa lateralment dos cascades intracel·lulars importants: la via de les MAPKs i la mediada per la fosfatidilinositol-cinasa/proteïna-cinasa B (PI3K/Akt), ambdues rellevants en la inducció de factors proinflamatoris i la supervivència cel·lular (Heinrich *et al.*, 2003) (Figura II.4).



Adaptat de Yamamoto i Rose-John (2012)

**Figura II.4.** Activitats pro- i antiinflamatòries d'IL-6 per la via clàssica de senyalització i la transsenyalització. A) La via clàssica és intervinguda pel receptor d'IL-6 unit a membrana (IL-6R) (esquerra), mentre que la transsenyalització actua mitjançant la forma soluble d'aquest últim (sIL-6R) (dreta). B) La via clàssica estimula les respostes fisiològica, regenerativa i antiinflamatòria, mentre que la transsenyalització s'utilitza en condicions fisiopatològiques i és principalment proinflamatòria.



#### II.1.3.4. Fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)

La via de senyalització de la PI3K, estimulada fisiològicament com a conseqüència de l'activació de receptors de membrana tirosina cinasa, participa en nombrosos aspectes cel·lulars involucrats amb el creixement i la supervivència cel·lular. Un vegada és activa, la cinasa lipídica PI3K fosforila el grup hidroxil en tercera posició en l'anell inositol del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>), el que dóna lloc al fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat (PIP<sub>3</sub>); aquest últim actua com un segon missatger i regula la fosforilació i activació de la cinasa de serina/treonina relacionada amb la proteïna-cinasa C (PKC), Akt (Huang *et al.*, 2011). Així doncs, la fosforilació d'Akt pot ser emprada com un indicador de l'activitat de PI3K (Lin *et al.*, 2001).

En condicions patològiques, una activació anormal d'Akt condueix a una resposta proliferativa y antiapoptòtica relacionada amb el desenvolupament de molts tipus de càncer. S'ha establert que la senyalització per Akt inactiva diversos factors proapoptòtics com BAD, la procaspasa-9 i factors de transcripció de la família *Forkhead*, i activa l'expressió de gens antiapoptòtics com la proteïna d'unió a l'element de resposta a AMP cíclic (CREB), el NF- $\kappa$ B i el factor 1 $\alpha$  induït per la hipòxia (HIF-1 $\alpha$ ).

En concret, l'activació del NF- $\kappa$ B per Akt es pot produir per múltiples mecanismes. Ozes *et al.* (1999) van demostrar que el TNF activa Akt, la qual fosforila i activa IKK $\alpha$  i promou així la funció del factor de transcripció. A més, TNF i IL-1 també poden incrementar la transactivació de la subunitat RelA/p65 de NF- $\kappa$ B per mitjà d'un mecanisme en el que Akt ha

estat implicada. Tanmateix, Akt pot activar un membre de la família de les MAPKs, Cot i, indirectament, afectar a l'activitat d'IKK i NF- $\kappa$ B (Gustin *et al.*, 2004). Al seu torn, l'activació de NF- $\kappa$ B també facilita l'expressió i secreció de citocines proinflamatòries com TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , la qual cosa resulta en una desequilibrada secreció de citocines i en conseqüència una sèrie de respostes inflamatòries que indueixen dany en la mucosa i, en última instància, permeten el desenvolupament de la CU (Huang *et al.*, 2011).

#### II.1.4. MODELS ANIMALS DE MII

Encara que els models animals experimentals no representen amb exactitud la complexitat de la MII humana, són ferramentes bàsiques i indispensables que faciliten la tasca d'aprofundir en la fisiopatologia de la malaltia, i avaluar així diferents opcions terapèutiques i aspectes de l'estil de vida que poden influir en el curs d'aquella. Actualment, existeix una àmplia varietat de models animals, classificats segons siguin espontanis, induïts químicament, modificats genèticament i de transferència cel·lular. En la majoria es desenvolupa una inflamació intestinal que pot ser considerada crònica, si persisteix durant el curs entre poques setmanes o mesos, o aguda, quan es desenvolupa en un parell de dies i dura menys d'un parell de setmanes (Perše i Cerar, 2012).

Les característiques clíniques en els models animals rellevants per a la MII humana inclouen la pèrdua de pes, anèmia, diarrea, sang visible i oculta i, de vegades, moc als excrements. Patològicament, existeixen similituds com la ulceració de grau variable i en gran mesura confinada a la mucosa, una certa pèrdua d'hastració (es a dir, la desaparició dels plecs horitzontals del còlon) i la mucosa d'aspecte granular, junt amb

pseudopòlips i formacions polipoides (característiques de la CU), així com l'estenosi que condueix a l'obstrucció intestinal (característica de la MC). Entre les característiques histològiques comunes es troben canvis inflamatoris en la mucosa que poden ser aguts, subaguts i crònics, amb abscessos a les criptes i dilatació quística o la distorsió de les glàndules mucoses, ulceració de la mucosa en varies etapes de la progressió i la curació, i canvis hiperplàsics de l'epiteli glandular (Barnett i Fraser, 2011).

#### **II.1.4.1. Models induïts químicament**

Els models induïts per l'administració de diversos agents químics van adquirir rellevància per ser relativament barats, fàcilment manejables per les espècies principalment emprades, rata o ratolí, i altament reproduïbles. Així, la colitis experimental pot ser induïda mitjançant l'administració d'ènemes intracolònics d'haptens i àcids orgànics, per via oral emprant polímers i polisacàrids sulfatats, per injecció transmural de polisacàrids microbians i, per via subcutània amb fàrmacs com la indometacina i la ciclosporina (Mañé, 2007). Dels anomenats, un dels més àmpliament emprats com agent inductor per via oral és el dextranosulfat sòdic (DSS).

##### **II.1.4.1.1. Colitis induïda per dextranosulfat sòdic (DSS)**

Un factor important a tenir en compte en la inducció de la colitis és el pes molecular de l'agent químic, del que depenen la severitat, l'activitat carcinògena i la diferent localització de la colitis induïda. El DSS ( $C_6H_7Na_3O_{14}S_3$ ) és un polisacàrid sulfatat amb un pes molecular establert en un rang àmpliament variable, entre 5 i 1400 kDa. Tanmateix, modificant la concentració, la duració i la freqüència d'administració, els

animals poden desenvolupar una colitis aguda o crònica i, fins i tot, de forma similar a d'allò que ocorre en humans, fenòmens oncogènics en les fases més tardanes de la malaltia (Perše i Cerar, 2012).

L'addició de DSS entre 5 i 30 kDa en l'aigua de beguda (2-5%) durant un període entre 5 i 7 dies indueix, en rosegadors, lesions al còlon que semblen una forma aguda de CU, caracteritzada per la pèrdua de pes, deposicions molles/diarrea, sang rectal i curtament del còlon. L'anàlisi histològica típica revela un dany important a les criptes i l'epiteli cel·lular, una significativa infiltració de granulòcits i cèl·lules immunes mononuclears i edema tissular, sovint acompanyat d'ulceració severa, sent la porció de còlon distal la més afectada (Kawada *et al.*, 2007).

Tot i que no s'ha establert el mecanisme exacte mitjançant el qual el DSS promou el dany en la mucosa, se sap que l'agent químic és directament tòxic per a les cèl·lules epitelials del còlon, causant defectes en la integritat de la barrera epitelial; una sola dosi de DSS permet l'entrada massiva d'antígens a la *lamina propria*, activant la resposta cel·lular innata, amb el consegüent reclutament i activació de neutròfils i macròfags des de sang perifèrica. És per això que, aquest model emfatitza la importància d'una barrera epitelial intacta per tal de mantenir l'homeòstasi immunològica front a antígens continguts normalment a la llum intestinal (Jurjus *et al.*, 2004). Si l'administració de DSS es manté, la resposta adaptativa del sistema immune pot ficar-se en marxa i donar com a resultat una inflamació crònica de la mucosa intestinal. De fet, l'administració cíclica repetida de DSS (4 a 7 cicles) s'empra com a model d'inflamació intestinal crònica, el que permet importants observacions

sobre la resposta immune, així com l'estudi de mediadors i el flux cel·lular involucrat en la cronificació de la MII (Bento *et al.*, 2012).

El primer dia després el tractament amb DSS s'observa un augment en les concentracions de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 i IL-17, així com d'IL-6 i IL-10, que s'incrementen al continuar amb el tractament. A partir d'ací, es genera un distint perfil de mediadors en funció de la fase de colitis; la inflamació aguda es converteix en una resposta crònica controlada principalment per Th2 (menors concentracions de TNF- $\alpha$ , IL-17 i quimiocina derivada de queratinòcits [KC] i augment d'IL-5, IL-13, IL-10, IL-6 i IL-4) (Dothel *et al.*, 2013), encara que s'ha observat un perfil distint entre diferents llinatges de ratolins en aquesta fase de la malaltia (Melgar *et al.*, 2005). Aquests mediadors inflamatoris no sols juguen un paper clau en la patogènesi de la colitis induïda per DSS, sinó que són importants dianes d'actuació front a la malaltia (Kawada *et al.*, 2007).

#### **II.1.4.1.2. Fàrmacs emprats en el tractament de la MII per DSS**

En paral·lel al desenvolupament de nous models animals ha existit sempre un debat respecte a la predictibilitat d'aquests per a les malalties humanes. El model de colitis induïda per DSS en ratolins ha demostrat reproduir algunes de les característiques inflamatòries clíniques i histològiques trobades en humans amb CU, i s'empra sovint per assajar tractaments per a la malaltia i elucidar els mecanismes implicats (Sann *et al.*, 2013).

El tractament convencional de la CU humana busca induir i mantenir un estat de remissió clínica, així com prevenir i/o reduir el nombre i la duració de les recaigudes. Amb aquesta finalitat, s'utilitzen els salicilats

(mesalazina), els corticosteroides (prednisolona i prednisona), tiopurines (azatioprina, 6-mercaptopurina), metotrexat, ciclosporina i infliximab. En la taula II.1 es resumeixen les indicacions establertes en el control de la malaltia:

**Taula II.1.** Resum de les indicacions basades en l'evidència per al tractament de pacients amb CU (Baumgart i SandBorn, 2007).

Tractament	Dosi	LLEU A MODERADAMENT ACTIVA				MANTENIMENT DE LA REMISSIÓ	
		Distal	Extensa	Refractària	Severament activa	Distal	Extensa
Sulfasalazina	Inducció (2-6 g/d) Manteniment (2-4 g/d)	SI	SI	SI*	NO†	SI	SI
Supositoris mesalamina	Inducció (0,5-1,5 g/d) Manteniment (0,5-1 g/d)	SI	NO	SI*	NO†	SI	NO
Ènemes mesalazina	Inducció (1-4 g/d) Manteniment (1-4 g/d)	SI	SI (teràpia adjuvant)	SI*	NO†	SI	NO
Mesalamina oral	Inducció (1,6-4,8 g per d) Manteniment (0,75-4 g/d)	SI	SI	SI*	NO†	SI	SI
Olsalazina	Manteniment (1-2 g/d)	NO‡	NO‡	NO‡	NO‡	SI	SI
Balsalazida	Inducció (6,75 g/d = equivalent a 2,4 g mesalamina/ d) Manteniment (2-4 g/d = equivalent a 1,4 g mesalamina /d)	SI	SI	SI*	NO†	SI	SI
Ènemes hidrocortisona	Inducció (100 mg/d)	SI	NO	SI*	SI§	NO	NO
Ènemes budesonida	Inducció (2-8 mg/d)	SI	NO	SI*	SI§	NO	NO
Corticoides orals (hidrocortisona)	Inducció (100 mg/d)	SI	SI	SI*	NO	NO	NO
Corticoides orals (prednisona)	Inducció (40-60 mg/d)	SI	SI	SI*	NO	NO	NO
Corticoides intravenosos (prednisolona)	Inducció (60 mg/d)	NO	NO	SI**	SI	NO	NO
Azatioprina oral	Manteniment (2-2,5 mg/kg/d)	NO	NO	SI	NO	SI	SI

Ciclosporina intravenosa	Inducció (2-4 mg/kg/d)	NO	NO	NO	SI	NO	NO
Tacrolimus oral	Inducció (concentració sèrica proposta 5-15 ng/mL)	NO	NO	NO	SI	NO	NO
Infliximab intravenós	Inducció (5 o 10 mg/kg, setmanes 0, 2 i 6) Manteniment (5 o 10 mg/kg, cada 8 setmanes)	SI	SI	SI	SI	SI	SI

\*Normalment continuat com a manteniment del tractament per a la malaltia de lleu a moderadament activa quan s'afegeixen agents addicionals.

†Normalment interromput degut a la possibilitat d'intolerància a la sulfasalazina, mesalamina o balsalazida.

‡La diarrea es produeix amb freqüència en dosis més altes en els pacients amb colitis ulcerosa activa.

§Tractament complementari als corticosteroides intravenosos.

\*\*Els pacients que no responen amb corticosteroides orals, respondran a l'hospitalització amb l'administració de corticosteroides intravenosos.

### – Àcid 5-aminosalicílic (5-ASA)

Els salicilats contenen en la seua estructura la molècula del 5-ASA (mesalazina o mesalamina), la qual exerceix un efecte antiinflamatori tòpic sobre la mucosa intestinal actuant a través de la cascada de l'àcid araquidònic (AA). El primer salicilat emprat va ser la sulfasalazina, en què el 5-ASA es troba unit a la sulfapiridina. Posteriorment es va demostrar que el component actiu era la fracció 5-ASA, i la sulfapiridina era la responsable dels efectes adversos, limitant el seu ús en la pràctica clínica.

En general, els preparats de mesalazina són la primera línia de tractament en les formes lleus a moderades de la CU activa, especialment en la inducció i el manteniment de la remissió de la malaltia. No obstant això, els salicilats han demostrat algunes limitacions després de ser emprats en el model de colitis induïda per DSS. D'una banda, la mesalazina pura per via oral s'absorbeix majoritàriament a l'intestí prim proximal, el que impedeix que arribe a concentracions terapèutiques en el còlon (Gomollón i Garcia López, 2007), de fet es prefereix la formulació

rectal en la malaltia humana (Hanauer, 2008). D'altra banda, l'efecte protector de la sulfasalazina ha estat limitat, en molt casos, a la duració del protocol experimental, i demostra un major efecte a major extensió de l'estudi. Aquest fet es correlaciona amb el seu ús en la pràctica clínica, on es mostra efectiva com a teràpia de manteniment en la malaltia crònica humana, més que en el tractament d'un atac agut sever (Axelsson *et al.*, 1998).

#### – Corticoides

Els corticoides, per les seues accions antiinflamatòries i immunomoduladores, són fàrmacs essencials en el control dels brots moderats o greus de CU. No obstant això, el seu ús prolongat s'acompanya, inevitablement, d'efectes secundaris greus i, en ocasions, poden produir casos de dependència i resistència. Entre altres, la budesonida presenta un perfil d'efectes adversos millorat respecte als esteroides convencionals, fet pel qual és un fàrmac de primera elecció en la inducció de la remissió de la malaltia. El seu ús en el model de DSS ha demostrat un efecte beneficiós quan s'administra en els brots aguts de la malaltia (Beloqui *et al.*, 2013), encara que acompanyat d'efectes adversos greus ocasionats als animals (Sann *et al.*, 2013).

#### – Immunosupressors

Els fàrmacs immunomoduladors, azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina i tacrolimus, han demostrat ser efectius en situacions concretes de la pràctica clínica. D'una banda, la 6-mercaptopurina i el seu profàrmac azatioprina, s'utilitzen en la CU per al manteniment de la remissió, mentre que la seua utilitat al brot agut és menor. Per tal



d'exercir la seua activitat, ambdós requereixen un extens metabolisme abans de generar els corresponents metabòlits actius, els 6-tioguanin-nucleòtids. Aquest fet genera una elevada variabilitat interindividual entre pacients amb la MII, el que es reflexa amb l'ús d'aquests fàrmacs en el model animal (Kverka *et al.*, 2011).

D'altra banda, la ciclosporina s'empra en la inducció de la remissió en els pacients amb CU severa refractària a corticoides. Actua inhibint l'activitat fosfatasa de la calcineurina, la qual cosa implica, en última instància, la supressió de la resposta immunològica de tipus cel·lular. En el model de CU induïda per DSS, la ciclosporina per via oral exerceix un efecte tant local com sistèmic (Sann *et al.*, 2013). A més, el seu ús crònic limitat a la malaltia humana es reflecteix amb els problemes ocasionats en el model animal quan s'augmenta la dosi o es modifica l'esquema de tractament (Banić *et al.*, 2002).

El tacrolimus o FK506 és un fàrmac immunosupressor amb un mecanisme semblant a la ciclosporina però amb una potencia superior. És efectiu per al tractament de pacients amb CU que són refractaris a la teràpia convencional. Per la seua activitat immunosupressora de cèl·lules T i macròfags, el tacrolimus exerceix un efecte terapèutic en pacients amb CU, de la mateixa manera que en el model agut de DSS, per mitjà de la supressió de la producció de les citocines inflamatores IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$  (Okada *et al.*, 2011).

#### – Teràpia Biològica

El terme teràpia biològica engloba una sèrie d'agents terapèutics amb acció antiinflamatòria selectiva, la finalitat dels quals és restablir una

acció immunològica normal. En concret, l'infliximab, és un anticòs monoclonal dirigit front a TNF- $\alpha$ , indicat en la CU moderada a severa en els casos refractaris al tractament convencional i, en ocasions, com últim recurs abans de recórrer al tractament quirúrgic. Al igual que en la malaltia humana, la colitis induïda per DSS és altament dependent de la molècula de TNF- $\alpha$ , el que explica l'efecte beneficiós de l'infliximab en el model animal (Lopetuso *et al.*, 2013). En l'actualitat es tracta de l'agent biològic més emprat a la pràctica clínica diària, encara que es poden emprar també l'adalimumab i el certolizumab (Hinojosa del Val, 2007).

### II.1.5. NOVES PERSPECTIVES TERAPÈUTIQUES

La gran varietat de factors desencadenants de la MII, junt amb la complexa resposta immune resultant, ofereix moltes dianes terapèutiques, el que es reflexa en l'ampli ventall de fàrmacs desenvolupats, alguns actualment en estudi mentre que altres han resultat ineficaços. En l'actualitat, el tractament més innovador de la malaltia es dirigeix a controlar l'excessiva resposta immune adaptativa amb l'ús d'agents biològics com els anticòs monoclonals front a TNF- $\alpha$ . Encara que aquests agents són eficaços en molts pacients, tan sols en un terç o menys s'aconsegueix la remissió i molts dels que ho aconsegueixen amb el temps perden la resposta. A més, la majoria de malalts tractats amb teràpia biològica necessiten teràpia d'inducció i manteniment, i les despeses són molt elevades (D'haens, 2007; Danese, 2012). És per això, que en aquests pacients sorgeix la necessitat d'emprar altres pràctiques mèdiques que aconseguisquen optimitzar el tractament amb la finalitat de millorar la seua qualitat de vida.

Estudis epidemiològics demostren que l'ús d'alguna forma de CAM és comuna entre pacients amb alguna manifestació de MII, amb una prevalença entre un 31-51% (Hilsden *et al.*, 2003), i entre elles destaca l'ús de la teràpia amb productes naturals (Ganguli *et al.*, 2004; Langhorst *et al.*, 2005). Diversos estudis en humans han demostrat bons resultats en el tractament de la malaltia amb la teràpia natural. La curcumina ha demostrat ser més efectiva que el placebo en el manteniment de la remissió en pacients amb CU quiescent (Devlin, 2007). El tractament amb un gel d'*Aloe vera* (L.) Burm. f. (Aloaceae) en pacients amb CU va induir la remissió clínica junt amb una reducció dels índexs d'activitat i dels marcadors histològics de la malaltia. L'administració de càpsules d'*Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) a pacients amb MC va permetre una completa remissió dels símptomes en un alt percentatge de subjectes. El suc obtingut de *Triticum aestivum* L. (Poaceae) va reduir completament l'índex d'activitat de la malaltia (IAM) i la severitat del sagnat rectal en pacients amb CU. A més, un extracte etanòlic aquós estandarditzat obtingut a partir d'*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees (Acanthaceae) (HMPL-004) va demostrar una eficàcia similar a la de l'alliberació retardada de mesalazina, sent a més ben tolerat en pacients amb CU lleu o moderadament activa. La resina de *Boswellia serrata* (Burseraceae) va resultar en una taxa de remissió en pacients amb CU similar a l'obtinguda per a sulfasalazina (82% i 75%, respectivament) (Recio *et al.*, 2012). No obstant això, és important destacar que aquest tipus de teràpies no estan exemptes d'efectes adversos, toxicitats i interaccions. A més, la regulació de la puresa i la dosificació segueixen sent problemàtiques (Tillish, 2007).

En els últims anys, molts constituents bioactius dels aliments es comercialitzen en forma de productes farmacèutics. Es tracta d'un tipus de principis que es designen amb el nom de nutracèutics i que defineix un suplement dietètic que ofereix una forma concentrada d'un presumpte agent bioactiu d'un aliment, administrat amb el propòsit de millorar la salut en dosis que excedeixen a les que es podrien obtenir als aliments normals. Al mercat existeixen actualment una nombrosa llista de nutracèutics: el carotenoide licopè, compostos ensofrats d'espècies d'al·liàcies (cebes, alls, porros, etc.), extractes de glucosinolats i fitosterols, i diversos grups de compostos fenòlics (antocianines, proantocianidines, estilbens, hidroxicinamats, cumarines, àcid el·làgic i el·lagitanins [ETs], etc.). No obstant això, l'evidència científica que dona suport als seus efectes beneficiosos en la salut és encara insuficient i es basa majoritàriament en estudis *in vitro* o models animals (Espín *et al.*, 2007a).

En aquest sentit, i tenint en compte la insistent demanda de la teràpia natural, en especial per al tractament de les malalties cròniques com la MII, l'Organització Mundial de la Salut s'ha centrat en preparar informació fiable i adaptable a contextos específics relativa a l'ús d'aquesta forma d'atenció sanitària, la qual cosa fomenta el desenvolupament de les investigacions clíniques amb eficàcia i seguretat de les medicines tradicionals i defèn el seu ús racional (56<sup>a</sup> Assemblea Mundial de la Salut, 2003).

#### **II.1.5.1. Antiinflamatoris d'origen vegetal. Compostos fenòlics**

Entre els nombrosos agents d'origen natural reconeguts per la seua activitat antiinflamatòria, els compostos d'estructura fenòlica constitueixen un dels majors i més extensos grups, i són considerats

importants candidats amb un potencial per a desenvolupar teràpies medicinals alternatives.

En general, els termes fenol i polifenol denoten una gran quantitat de substàncies contenint un o més anells aromàtics amb un o més restes hidroxil. Així, l'estructura química dels compostos fenòlics varia des de molècules simples, com els àcids i els alcohols fenòlics, fins a compostos altament polimeritzats com els tanins (Manach *et al.*, 2004). A més, molts d'ells estan normalment glicosilats amb sucres com la glucosa, la ramnosa, la galactosa o la arabinosa. No obstant això, malgrat l'àmplia variabilitat estructural, la majoria tenen un intermediari comú, la L-fenilalanina, o el seu precursor immediat, l'àcid shikímic (Yang *et al.*, 2001).

Durant molts anys s'ha plantejat la idea de què la capacitat antioxidant dels compostos fenòlics proporciona protecció cel·lular front al dany oxidatiu a través de la captació de radicals lliures (Azzi *et al.*, 2004). No obstant això, aquest concepte sembla ser una visió simplificada del seu mode d'acció. Actualment se sap que els compostos fenòlics, reconeguts per constituir les substàncies actives presents en moltes plantes medicinals, modulen l'activitat d'un ampli rang d'enzims i receptors cel·lulars involucrats en la transducció de senyals (Manach *et al.*, 2004). Així, a més de tenir propietats antioxidants, aquests compostos presenten altres accions biològiques específiques encara en constant descobriment.

En aquest sentit, quan més s'investiga en ells, més es coneix sobre les seues activitats específiques, entre les quals s'inclouen la prevenció o reducció de l'oxidació de molècules diana com les lipoproteïnes de baixa i

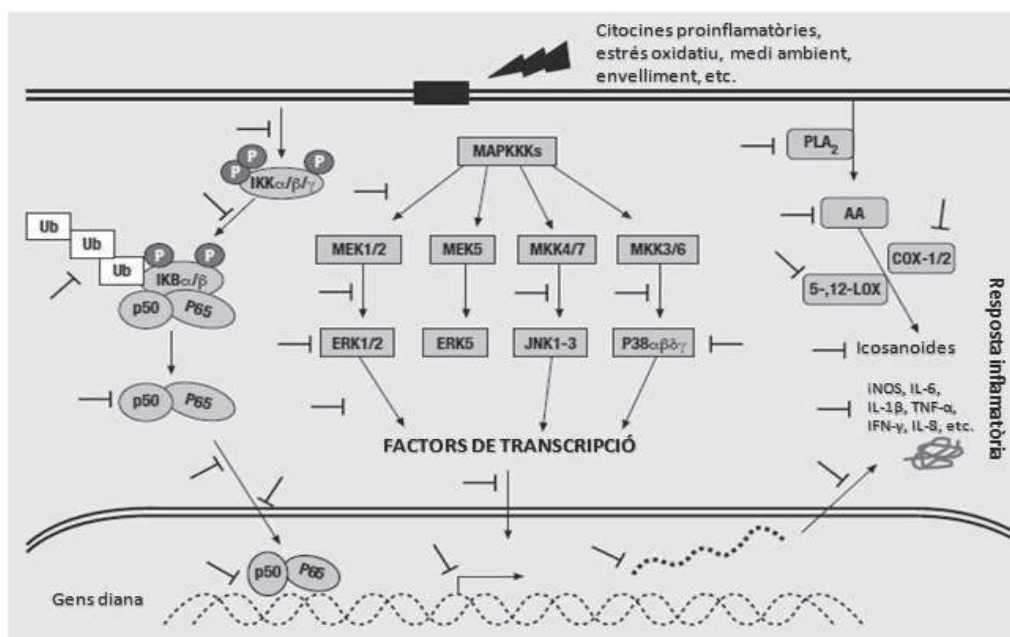
molt baixa densitat (LDL i VLDL) (mecanisme clau en la formació de lesions ateroscleròtiques) i l'ADN (rellevant per a la inducció del procés cancerigen). Les isoflavones, estilbens i lignans són compostos fenòlics estructuralment similars a l'estradiol-17 $\beta$ , l'hormona estrogènica més potent dels mamífers, i tenen la capacitat d'interactuar amb els receptors estrogènics alterant així els processos cancerígens dependents d'hormones. A més, nombrosos estudis han demostrat que polifenols com el gal·lat d'epigal·locatequina (EGCG), la curcumina, el resveratrol i l'àcid el·làgic, entre d'altres, indueixen apoptosi en diverses línies cel·lulars cancerígenes (Ahmad *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2005). D'altra banda, alguns fenols són capaços d'inhibir la xantina oxidasa i altres enzims implicats en la producció de les danyoses EROs; també enzims implicats en el procés inflamatori, com la 5-lipoxigenasa (LOX), la inhibició de la qual per l'àcid cafeic, silibina, curcumina i diversos flavonoides podria justificar les seues accions antiinflamatòries (Lattanzio *et al.*, 2008). Park (1999) va demostrar que alguns flavonoides bloquegen el consum de glucosa *in vitro*. A més, la seua activitat terapèutica *in vivo* en el control de la diabetis de tipus 2 pot explicar-se per la inhibició de l'absorció de glucosa a l'intestí, la modulació dels enzims involucrats en el seu metabolisme, la millora del funcionament de cèl·lules  $\beta$  i l'estimulació de la secreció i/o l'acció de la insulina (Arion *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000; Waltner-Law *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2006).

#### **II.1.5.1.1. Interès com agents antiinflamatoris**

Una de les principals dianes de l'acció *in vivo* dels fenols en la cascada inflamatòria és el complex sistema NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B (Bremner i Heinrich, 2002). Polifenols com resveratrol, curcumina, EGCG i quercetina atenuen

l'activació del factor de transcripció, bé inhibint la fosforilació, bé prevenint la degradació proteasòmica del seu inhibidor (IκB) (Bravo 1998; Scalbert *et al.*, 2005). Curiosament, les propietats antiinflamatòries dels fàrmacs antiinflamatoris no esteroides (AINEs) són també, en part, atribuïbles a la inhibició de les cinases IKK. Per tant, ja que els compostos fenòlics no semblen prevenir la síntesi de prostaglandines (PGs) constitutives/protectores per la COX-1 com en el cas dels AINE, es suggereix que aquests compostos podrien ser agents antiinflamatoris més segurs.

La figura II.5 mostra alguns dels mecanismes involucrats en la seua activitat antiinflamatòria:



Adaptat de Santangelo *et al.* (2007).

**Figura II.5.** Principals punts d'acció dels compostos fenòlics (⊥) en la cascada inflammatòria.

### II.1.5.1.2. Principals compostos fenòlics en el tractament de la MII

L'administració de polifenols com la quercetina i els seus glicòsids, resveratrol, EGCG i curcumina ha demostrat ser efectiva en la prevenció i el tractament de la inflamació i el dany intestinal en diferents models animals de MII. En humans, els estudis clínics es limiten a extractes de *Boswellia serrata* i curcumina i derivats (Romier *et al.*, 2009).

En diferents models d'inflamació intestinal *in vitro*, molts estàndards de polifenols purs interfereixen en la inducció de les vies de senyalització del NF- $\kappa$ B i les MAPKs, així com en la producció final de mediadors proinflamatoris, tant en la seua expressió proteica com d'ARN missatger (ARNm). En la majoria d'estudis *in vivo*, el tractament per via oral, rectal o subcutània amb polifenols abans, durant i/o després de la inducció de la colitis experimental mitjançant DSS, àcid trinitrobenzenisulfònic (TNBS), àcid acètic o per injecció intraperitoneal de LPS, demostra que aquests compostos milloren els paràmetres de severitat de la malaltia, amb unes dosis efectives que varien des de 0,5 a 1500 mg de producte pur per kg de pes i per dia (Taula II.2). En molts d'ells, l'efecte és comparable als fàrmacs de referència (per exemple sulfasalazina). A més, com ja s'ha esmentat, cal destacar que els efectes beneficiosos de curcumina en animals han estat confirmats a l'estudi en humans. En canvi, tan sols pocs estudis han examinat l'efecte d'extractes de polifenols naturals en models *in vitro* o *in vivo*. Alguns dels més importants per la seua efectivitat en reduir la severitat de diferents models de colitis, inclouen els extractes de te verd, la magrana, el canyamel, el vi negre o el roure (Romier *et al.*, 2009).



**Taula. II.2.** Efecte de compostos fenòlics en models *in vivo* d'inflamació intestinal induïda experimentalment (Actualitzada de Romier *et al.*, 2009).

Compost fenòlic	Efectes antiinflamatoris	Animal	Agent inductor (AI)
<b>Flavonols</b>			
Morina	↓ Severitat colitis, activitat MPO i producció IL-1β, LTB <sub>4</sub> i MDA. Inhibeix activitat iNOS.	Rata	TNBS (30 mg)
Miricetina Schwanke <i>et al.</i> , (2013)	↓ Severitat colitis. Prevé l'activació de PI3K/Akt, NF-κB i MAPKs.	Ratolí	DSS (3%, 5d)
Quercetina	↓ Severitat colitis i activitat MPO. Efectes dosi-dependents.	Rata	TNBS rectal (p.r.) (15 mg)
	Cap efecte en severitat colitis, expressió d'ARNm d'IL-1β i IL-6.	Ratolí	DSS (5%, 7 d)
	Cap efecte en severitat ileïtis.	Ratolí	
	↓ Expressió d'ARNm IP-10 i MIP-2. Inhibeix activació NF-κB, ↓ producció citocines i activitat iNOS.	TNFΔARE/WT Rata	DSS (5%, 5d i 2%, 10d)
Quercitrina	↓ Severitat colitis i activitat MPO i AP.	Rata	TNBS
	↑ Glutatió.		
	Cap efecte en severitat colitis i activitat MPO.	Rata	TNBS (30 mg)
	↓ MDA i activitat iNOS i AP al còlon.	Rata	DSS (2-5%, 8 o 15d)
	↓ Severitat colitis. Inhibeix activitat MPO, AP i iNOS. Inhibeix activació NF-κB. ↑ Glutatió.	Rata	DSS (2-5%, 15d)
Rutina	↓ Severitat colitis i activitat MPO. Efectivitat similar a sulfasalazina.	Rata	TNBS (15 mg)
	↓ Severitat colitis i expressió d'ARNm IL-1β i IL-6. Efectes dosi-dependents.	Ratolí	DSS (5%, 7d)
	↓ Severitat colitis i activitat AP. Cap efecte en MPO i LTB <sub>4</sub> . ↑ Glutatió	Rata	Àcid acètic (rectal)
	↓ Severitat colitis i activitats MPO i AP. Cap efecte en LTB <sub>4</sub> . ↑ Glutatió.	Rata	TNBS (10 mg)
<b>Flavones</b>			
Baicaleïna	↓ Severitat colitis.	Ratolí	DSS
Carboximetiloxil-3',4',5-trimetoxi-flavona	↓ Severitat colitis en 3 models de MII	Rata-TNBS (30 mg) Rata- Àcid acètic (4%) Rata transgènica HLA-B27	
Dosmalfat	↓ Severitat colitis, activitat MPO i producció IL-1β. Normalitza producció PGs.	Ratolí	DSS (5%, 7d)
	↓ Severitat colitis, activitat MPO i producció TNF-α. Expressió receptor EGF. Efectes dosi-dependents.	Rata	TNBS (10 o 30 mg)
Wogonina	↑ IgA fecal i secreció IFN-γ i IL-2.	Ratolí	DSS (5%, 7d)
	↓ Secreció IgE, IL-4, IL-5 i IL-10 als limfòcits de MLN		
<b>Isoflavones</b>			
Mescla: daidzeïna, genisteïna i altres	↓ Expressió d'ARNm de metalotioneïnes i SOD de manganès.	Ratolí	LPS (i.p. 6 μg)
Glabridina	↓ Severitat colitis, activitat MPO i producció NO, PGE <sub>2</sub> , IL-6 i TNF-α.	Ratolí	DSS (5%, 7d)
<b>Flavanones</b>			
Naringenina Azuma <i>et al.</i> , (2013)	↓ Severitat colitis i producció de IFN-γ, IL-6 i IL-17A. Evita dany en la integritat de la barrera epitelial.	Ratolí	DSS (2%, 7d)
<b>Flavan-3-ols</b>			
Catequina	↓ Severitat colitis i activitat MPO. Manté normal activitat l'AP plasmàtica.	Rata	TNBS
EGCG Mochizuki i Hasegawa (2010)	↓ Severitat colitis i activitat MPO.	Rata	TNBS (24 mg)
	↑ Activitat SOD.		
Teaflavina-3,3'-dial-lat	↓ Severitat colitis, activitat MPO, secreció IL-12, IFN-γ i expressió proteïca i d'ARNm d'iNOS. Inhibeix activació NF-κB i activitat citosòlica IKK i IκB. Efectes dosi-dependents.	Ratolí	TNBS (6 mg)
Tearubigina	↓ Severitat colitis, activitat MPO, secreció MDA, IL-12, IFN-γ, IL-4 i expressió d'ARNm d'iNOS. Inhibeix activació NF-κB. Efectes dosi-dependents.	Ratolí	TNBS (6 mg)

<b>Proantocianidines</b>				
Picnogenol	↓ Severitat colitis i activitat MPO. Efectes dosis dependents.	Rata		TNBS (24 mg)
<b>Àcids fenòlics</b>				
Curcumina	↓ Severitat colitis, infiltració de cèl·lules T CD4+, activació NF-κB i expressió d'ARNm d'IL-6, IL-12, IFN-γ i TNF-α.	Ratolí		TNBS (2-2,5 mg)
	↓ Severitat colitis, activitat MPO, producció MDA i NO, activació NF-κB i expressió d'ARNm d'IL-12, iNOS i IFN-γ.	Ratolí		TNBS (6 mg)
	↓ Severitat colitis, activitat MPO, producció IL-β, activació NF-κB i p38 MPAK.	Ratolí		DNBS (6 mg)
	↓ Severitat colitis, expressió d'ARNm d'IL-β, activació NF-κB i degradació de IκB.	Rata		TNBS (50 mg)
	↓ Severitat colitis, activitat MPO, producció TNF-α i NO, expressió d'iNOS i COX-2 i activació p38 MPAK. Producció IL-10.	Rata		TNBS (30 mg)
	↓ Severitat colitis, activitat MPO, infiltració de cèl·lules T CD4 i CD8 i tinció nuclear de NF-κB i tinció òptica d'IκB.	Ratolí		DSS (3,5%)
Liu <i>et al.</i> , (2013)	↓ Severitat colitis, activitat MPO, expressió d'IL-1β i TNF-α. Inhibeix activitat p-STAT3 i unió a l'ADN dels dímers de STAT3.	Ratolí		DSS (5%)
Àcid cafeic Ye <i>et al.</i> , (2009)	↓ Severitat colitis, expressió d'ARNm d'IL-17 i iNOS. Normalitza l'expressió de CYP4B1.	Ratolí		DSS (1,25%)
Àcid el·làgic	↓ Severitat colitis i activitat MPO. Major efecte amb àcid el·làgic contingut en microesferes.	Rata		DSS (3%, 7d)
Rosillo <i>et al.</i> , (2011)	↓ Severitat colitis, activitat MPO, producció TNF-α, sobreexpressió de COX-2 i iNOS, fosforilació MAPKs i translocació nuclear p65 NF-κB. ↑ Producció de muc a les cèl·lules goblet.	Rata		TNBS (10 mg)
Rosillo <i>et al.</i> , (2012)	↓ Severitat colitis, activitat MPO, producció TNF-α, sobreexpressió de COX-2 i iNOS, fosforilació MAPKs i translocació nuclear p65 NF-κB.	Rata		TNBS
Paenol	↓ Severitat colitis, activitat MPO i expressió d'iNOS.	Ratolí		TNBS (1 mg)
<b>Estilbens</b>				
Resveratrol	↓ Severitat colitis, activitat MPO, producció IL-1β i PGD <sub>2</sub> , expressió de COX-2 (pero no de PGE <sub>2</sub> ). ↑ Apoptosi de colonòcits.	Rata		TNBS (10 mg)
	↓ Severitat colitis, activitat MPO, producció TNF-α i expressió de COX-2 i NF-κB. Reestableix PGE <sub>2</sub> . ↑ Apoptosi de colonòcits.	Rata		TNBS (30 mg)
Singh <i>et al.</i> , (2010)	↓ Severitat colitis, producció local i sistèmica de SAA, IL-6, IL-1β, IFN-γ, i TNF-α, expressió de p-IκB i COX-2 i activitat de NF-κB. Expressió gènica de SIRT1.	Ratolí		DSS (3%, 7d)
Sánchez-Fidalgo <i>et al.</i> , (2010)	↓ Severitat colitis, producció TNF-α i IL-1β, expressió de COX-2, iNOS i PGES-1 i activitat de p38 MAPK. ↑ Producció IL-10	Ratolí		DSS (3%, 5d)
Piceatanol	↓ Severitat colitis, activitat MPO, producció NO i PGE <sub>2</sub> , expressió d'ARNm iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6, MCP-1 i KC-1 i translocació nuclear de p-STAT3 i NF-κB	Ratolí		DSS (5%, 7d)
<b>Altres</b>				
Cumarina i hidroxycumarina	4- ↓ Severitat colitis, activitat MPO i AP (a les dosis de 5 i 25 mg/kg/d, respectivament per ambdues)	Rata		TNBS (10 mg)
2',4',6'-Tris-(metoximetoxi) calcona	↓ Severitat colitis i secreció ICAM-1, IL-1β i TNF-α.	Ratolí		TNBS (2 mg)

Abreviatures: AP: fosfatasa alcalina, EGF: factor de creixement epidèrmic, HLA: antígen de leucòcits humà; IP: proteïna induïble d'interferò; MCP: proteïna quimioattractant de monòcits; MDA: malondialdehid; MIP: proteïna inflammatòria de macròfags; MNL: nòduls limfàtics mesentèrics; MPO: mieloperoxidasa.

### II.1.5.1.3. Consum en la dieta

Una important proporció de compostos fenòlics està present en les plantes comestibles, entre les que s'inclouen els cereals, el cacau, els llegums, les fruites, les verdures, el te, el vi, etc. La recerca biomèdica ha revelat que la seua presència en la dieta exerceix un paper fonamental en la prevenció de moltes de les principals malalties cròniques, on s'inclouen malalties cardiovasculars i neurodegeneratives, càncer, diabetis i osteoporosi (Scalbert *et al.*, 2005).

Encara que és difícil establir una estimació exacta del consum de fenols en la dieta, es creu que el consum mitjà en humans amb una dieta saludable està al voltant d'1 g al dia, un valor aproximadament 10 vegades superior al de la vitamina C i 100 al de la vitamina E o el  $\beta$ -carotè (Scalbert i Williamson, 2000). A més, els compostos actius poden no ser els compostos fenòlics trobats als aliments en la seua forma original, ja que la majoria es presenten en forma d'èsters, glicòsids (principalment glucòsids), o polímers, associant-se amb carbohidrats i àcids orgànics. Aquestes diferències en l'estructura química fan que no tots els fenols siguin absorbits amb la mateixa eficàcia (Manach *et al.*, 2004). Per aquesta raó, l'avaluació dels efectes beneficiosos dels aliments i els seus ingredients per a la salut humana no és tasca fàcil. No obstant això, l'elucidació dels mecanismes pels quals aquests compostos prevenen les malalties degeneratives facilitaria el desenvolupament de nous productes nutracèutics amb propietats preventives i/o terapèutiques.

## II.1.5.2. Compostos objecte d'estudi

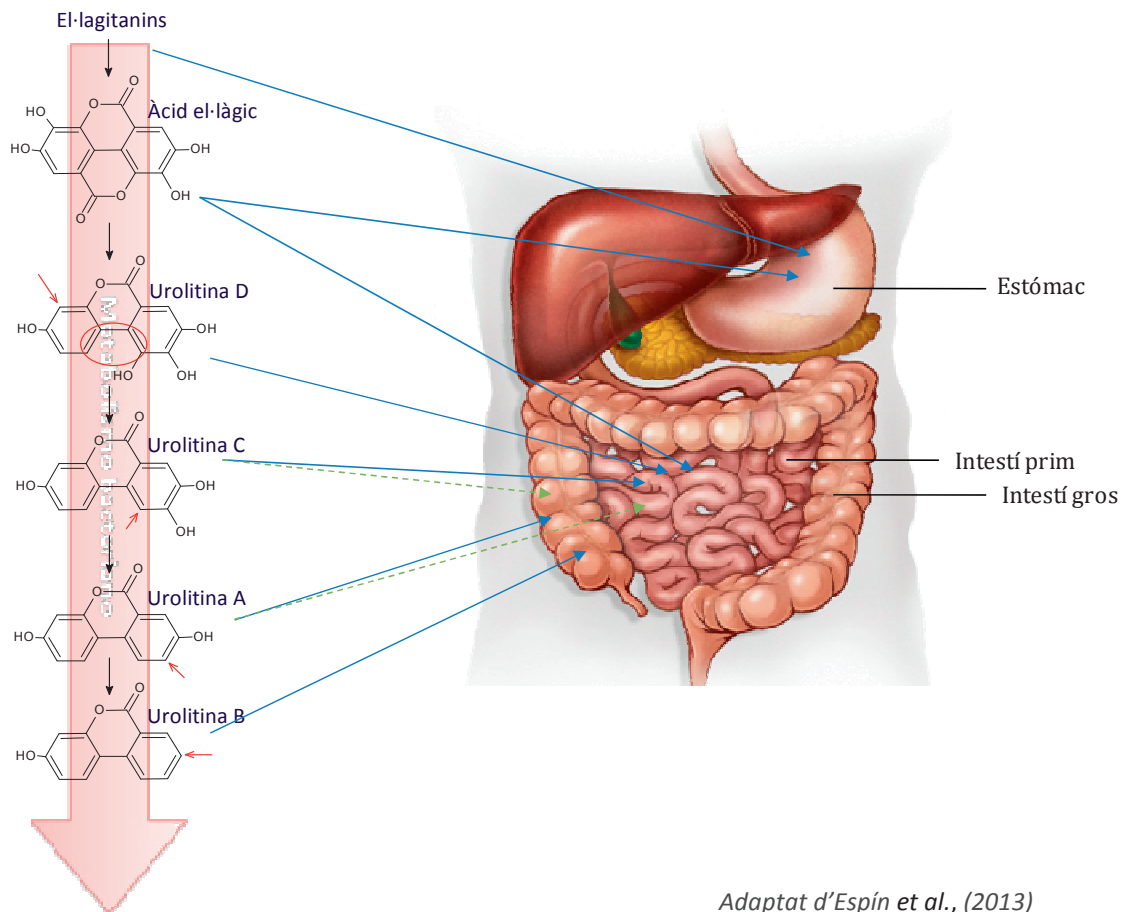
### II.1.5.2.1. Àcid el·làgic

Estructuralment, l'àcid el·làgic (2,3,7,8-tetrahidroxi [1]-benzopirà [5,4,3,-cde][1]benzopirà-5,10-diona) (Figura II.6) és una dilactona fenòlica formada per la lactonització espontània de l'àcid hexahidroxidifènic, constituït al seu torn per l'acoblament oxidatiu de dues molècules d'àcid gàl·lic. Els quatre anells de la molècula, representant el domini lipòfil, li confereixen una elevada estabilitat tèrmica, però també una baixa solubilitat en aigua, encara que elevada en metanol acidificat, etanol i dimetilsulfòxid (DMSO) (Aguilera-Carbo *et al.*, 2008).

L'àcid el·làgic és un dels molts compostos fenòlics consumits diàriament com a part d'una dieta normal. Està present en moltes fruites vermelles i fruites del bosc com maduixes, gerds, nabius, raïm, magranes i groselles negres, així com a les nous (Colaric *et al.*, 2005) i les begudes destil·lades (Goldberg *et al.*, 1999). En tots aquests aliments, rarament es troba lliure, sinó en forma glicosilada (glucosa, arabinosa, xilosa, etc.), o formant part dels ETs, polímers de l'àcid hexahidroxidifènic esterificat amb la glucosa (Larrosa *et al.*, 2006).

Després de la hidròlisi àcida dels ETs en les condicions fisiològiques del tracte gastrointestinal s'allibera àcid el·làgic, el qual és àmpliament metabolitzat per la flora intestinal proporcionant els seus productes de degradació de tipus hidroxidibenzopiranona (urolitines). Mentre que al jejú els principals metabòlits són l'àcid el·làgic i els derivats tri- i tetrahidroxidibenzopiranones (urolitina C i D, respectivament), al còlon es troben principalment l'urolitina A (3,8-dihidroxidibenzo [b,d]pirà-6-

ona; Figura II.6) (Cerdá *et al.*, 2005a) i l'urolitina B (3-hidroxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona; Figura II.6) (Cerdá *et al.*, 2005b), el que demostra que el metabolisme d'aquests compostos progressa a mesura que avancen a través de l'intestí (Espín *et al.*, 2007b).



**Figura II.6.** Producció seqüencial d'urolitines al tracte gastrointestinal.

Alguns estudis de biodisponibilitat i metabolisme indiquen que l'àcid el·làgic i els ETs presents als aliments poden ser responsables d'importants efectes biològics localment al tracte gastrointestinal, mentre que el seu efecte sistèmic pot ser atribuït als metabòlits produïts per la microflora. Així mateix, és clar que són un grup de compostos que han despertat una especial atenció pels seus efectes beneficiosos.

El suc i els extractes de magrana (*Punica granatum* L., Lythraceae) s'han convertit en els últims anys en un popular suplement dietètic, obrint-se camí dins del mercat dels nutraceutics. Al seu alt contingut en ETs, en especial punicalagina, se li atribueixen importants beneficis nutricionals en la dieta humana relacionats, en part, amb la seua potent activitat antioxidant (Gil *et al.*, 2000), fins i tot major que altres suc de fruita, el vi negre i el te verd. El seu consum ha estat promocionat per al tractament del càncer de pròstata, per les seues propietats antimutagèniques (Bell i Hawthorne, 2008), així com pel seu efecte protector front a malalties cardiovasculars (Aviram i Rosenblat 2012) i preventiu de la disfunció erèctil (Forest *et al.*, 2007).

L'objectiu de la majoria d'estudis és identificar els constituents terapèutics de la magrana. Entre ells, un especial interès es centra amb els ETs, que alliberen àcid el·làgic, del que es coneix que el seu efecte biològic resulta de múltiples accions, entre les que s'inclouen la seua activitat antioxidant, antiinflamatòria (Hassoun *et al.*, 2004; Rogerio *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2010) i anticarcinògena (Falsaperla *et al.*, 2005; Bell i Hawthorne, 2008; Glauert *et al.*, 2010), aquesta última es suggereix per mitjà de la modulació d'enzims implicats en el cicle cel·lular i en la proliferació del càncer (Losso *et al.*, 2004; Espín *et al.*, 2007a; Seeram *et al.*, 2007; Edderkaoui *et al.*, 2008). Alguns autors atribueixen aquestes propietats beneficioses a la seua capacitat d'unir-se irreversiblement a macromolècules (proteïnes i ADN), resultant en una acumulació d'àcid el·làgic en cèl·lules epitelials i altres tipus cel·lulars (Whitley *et al.*, 2003). Aquest concert d'activitats que ofereix l'àcid el·làgic, de forma semblant a altres polifenols ingerits a la

dieta, juga un paper beneficiós en el desenvolupament de malalties amb un component inflamatori i/o oxidant.

– **Activitat antioxidant**

És ben conegut que polifenols de la dieta com curcumina, àcid lipoic o resveratrol posseeixen un efecte antioxidant bifuncional directe/indirecte, es a dir, poden sofrir reaccions redox i atrapar espècies reactives o poden actuar com precursors d'enzims antioxidants o proteïnes citoprotectores que són bé, redox actives o inactives (Dinkova-Kostova i Talalay, 2008). Pel que fa a l'àcid el·làgic, les seues propietats antioxidants li permeten tant neutralitzar radicals lliures i quelar cations metàl·lics de transició que poden induir dany oxidatiu, com inhibir enzims prooxidants i activar enzims antioxidants (Djurić *et al.*, 2014).

*In vitro*, la seua activitat com captador directe d'espècies reactives ha estat demostrada i justificada en termes de la seua unitat estable digal·lat i els grups hidroxil fenòlics presents a la molècula (Reddy *et al.*, 2007). El polifenol és capaç de captar tant EROs com ERNs en un rang comparable al de les vitamines E i C (Priyadarsini *et al.*, 2002), i ha manifestat una afinitat especial per l'anió superòxid i el radical hidroxil, sent aquest efecte més fort fins i tot comparat amb el de la vitamina E o l' $\alpha$ -tocoferol (Iino *et al.*, 2001).

Estudis *in vivo*, han demostrat que l'àcid el·làgic és capaç d'inhibir la peroxidació lipídica i la formació de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, un subproducte de l'oxidació de l'ADN (Takagi *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2005), la qual cosa li va conferir un paper quimioprotector en un model de càncer colorectal en ratolins (Kumar *et al.*, 2012). La seua activitat com quelant

de metalls i en conseqüència protector front a la peroxidació lipídica li confereix, a més, una important activitat antiateromatosa (Yüce *et al.*, 2008), justificada a més per la inhibició de la generació d'EROs induïda per la LDL oxidada en cèl·lules endotelials (Ou *et al.*, 2010). D'altra banda, es suggereix que el seu efecte antiateromatós pot ser degut a la modulació de la via del receptor lectina tip 1 de lipoproteïnes oxidades de baixa densitat (LOX-1), el que resulta en una important reducció de la generació de superòxid com a conseqüència del seu efecte sobre el complex enzimàtic fosfat dinucleòtid de nicotinamida i adenina (NADPH oxidasa, NOX) (Lee *et al.*, 2010).

Com una primera línia de defensa front al desequilibri oxidatiu cel·lular, el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) regula un procés de destoxicació enzimàtic que modula l'expressió gènica d'enzims antioxidants de fase II com la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) i la glutatió peroxidasa (GPx). Polifenols com el resveratrol (Chen *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2011), el ferulat d'etil (Scapagnini *et al.*, 2011) o l'EGCG (Shah *et al.*, 2010) poden induir l'activació d'aquests enzims. Pel que fa a l'àcid el·làgic, també s'ha demostrat que és capaç d'induir la seua expressió en queratinòcits humans, el que li confereix un efecte protector front a l'estrès oxidatiu (Hseu *et al.*, 2012). Alguns estudis atribueixen aquest efecte a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada present a l'estructura química d'aquests compostos. S'ha vist que aquest agrupament actua com un potent acceptor en la reacció de Michael i modifica els grups cisteïna i tiol en la proteïna Keap 1, que reté al factor inactiu, la qual cosa dóna lloc a l'escissió de les interaccions entre ambdós, i en conseqüència, activa la cascada de senyalització corresponent (Surh, 2003; Egger *et al.*, 2005).



### – Activitat antiinflamatòria

En general, les malalties inflamatòries estan controlades per factors de transcripció proinflamatoris com el NF- $\kappa$ B i AP-1 (Handel, 1997), l'activació i activitat sinèrgica dels quals comporta la sobreexpressió dels enzims inflamatoris COX-2 i iNOS (O'Connor *et al.*, 2010). L'àcid el·làgic és capaç de controlar el procés inflamatori reduint el reclutament d'eosinòfils i la producció de citocines, possiblement per mitjà de la seua interacció amb els anomenats factors de transcripció (Masamune *et al.*, 2005; Afaq *et al.*, 2005). En monòcits humans, el polifenol inhibeix l'alliberació de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) per la seua influència sobre els enzims fosfolipasa A2 citosòlica del grup IVA (cPLA2 $\alpha$ ), COX-2 i la prostaglandina sintasa microsomal-1 (mPGEs-1), implicats en la seua síntesi (Karlsson *et al.*, 2010); un efecte que alguns autors suggereixen que té lloc mitjançant l'acció sobre el NF- $\kappa$ B (Yu *et al.*, 2007; Edderkaoui *et al.*, 2008; Romier *et al.*, 2008) i les MAPKs.

No obstant això, el seu paper en la inflamació no està exempt de controvèrsia. Recentment, s'ha demostrat que l'àcid el·làgic és capaç de controlar el procés inflamatori a través de una via independent a la immunosupressió dels factors de transcripció NF- $\kappa$ B i AP-1, en un model de dany pulmonar agut. A l'estudi, el polifenol va aconseguir reduir l'edema i la concentració de neutròfils al pulmó, i va modular l'alliberació de citocines. En general, va accelerar la resolució de la inflamació promovent la recuperació del dany pulmonar i va reduir l'exacerbació del procés inflamatori mitjançant la inhibició de la COX-2, actuant de forma similar a la dexametasona (Cornélio Favarin *et al.*, 2013).

### – Activitat anticancerígena

L'àcid el·làgic comparteix el potencial general dels fenilpropanoides d'interactuar amb molts aspectes del metabolisme dels mamífers corresponents amb l'inici i el desenvolupament del càncer. La seua activitat anticancerígena, per mitjà de la influència sobre el cicle cel·lular i/o l'apoptosi, ha estat estudiada en diverses línies cel·lulars (Li *et al.*, 2005; Larrosa *et al.*, 2006; Edderkaoui *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2013). En general es considera al polifenol com un inhibidor selectiu del creixement de cèl·lules cancerígenes.

D'una banda, al igual que curcumina, resveratrol, flavopiridol i els polifenols del te verd, l'àcid el·làgic ha demostrat induir l'apoptosi per la via intrínseca o mitocondrial (Larrosa *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2013). Aquesta via s'activa per senyals d'estrès intracel·lular que indueixen la translocació mitocondrial de proteïnes proapoptòtiques, activant en última instància les caspases i iniciant la cascada de mort cel·lular. En particular, com en el cas de curcumina (Anto *et al.*, 2002), es suggereix que les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> són reguladors negatius claus de l'apoptosi induïda per l'àcid el·làgic (Malik *et al.*, 2011).

*In vitro*, el polifenol modula el cicle cel·lular induint l'expressió gènica de p21 i el seu regulador p53, el que inhibeix l'expressió de la cinasa dependent de ciclina 2, un dels punts clau de control del cicle cel·lular i, per tant, un dels mecanismes per tal d'induir la seua detenció (Li *et al.*, 2005). Estudis recents confirmen aquest efecte antiproliferatiu de l'àcid el·làgic per la detenció del cicle en la fase G1 en cèl·lules de càncer ovàric, com a conseqüència d'una alteració de les concentracions de p53,

Cip1/p21 i les ciclines D1 i E, així com de proteïnes proapoptòtiques de la família Bcl-2 i la caspasa 3 (Chung *et al.*, 2013).

*In vivo*, la seua interacció amb la via de la PI3K/Akt, clau per a la normal transició G<sub>2</sub>/M (Foiyer *et al.*, 2008), s'ha establert com responsable d'induir la maquinaria apoptòtica en un model de càncer de còlon en rates (Umesalma i Sudhandiran, 2011) i càncer pancreàtic humà (Zhao *et al.*, 2013). En general, l'activació d'Akt promou la tumorigènesi, el que incrementa la resistència a l'apoptosi i la progressió del cicle cel·lular, (Chae *et al.*, 2009) i pot induir la maquinaria de dany/reparació de l'ADN (Kao *et al.*, 2007). Un dels mecanismes d'acció d'Akt és per mitjà de la fosforilació i activació d'IKK, activant la transcripció de molts dels gens diana que exerceixen un paper clau en l'establiment d'etapes primerenques i tardanes dels càncers més agressius, com són la ciclina D1, les proteïnes Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>, i aquelles requerides per a la metàstasi i l'angiogènesi, com les metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular (MMPs) i el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) (Romashkova i Makarov, 1999). En aquest sentit, encara que el manteniment de l'activitat del factor de transcripció NF-κB és crucial per a la proliferació cel·lular normal, una activació addicional estaria involucrada en l'increment de diversos tipus de càncer (Bharti i Aggarwal, 2002).

D'altra banda, l'activació d'Akt comporta una activació massiva de la COX-2, involucrada en la síntesi de PGs i tromboxans, el que implica la patogènesi de diversos tipus de càncer com el de fetge, pulmó, mama i especialment de còlon (Turini i DuBois, 2002). Com s'ha demostrat recentment, una inhibició selectiva de les concentracions de COX-2 per l'àcid el·làgic en un model de càncer pancreàtic, possiblement per la

inhibició de la via PI3K/Akt, redueix la síntesi de PGs, atenuant així la inflamació i la progressió del procés cancerigen (Zhao *et al.*, 2013).

Per tal que els tumors infiltrin als teixits veïns es requereix que les cèl·lules tumorals secreten enzims proteolítics com les MMPs, amb un paper clau en la invasió del tumor. En molts tipus de càncer existeix una relació directa entre la senyalització TGF- $\beta$ /NF- $\kappa$ B i la sobreexpressió de MMPs (Huber *et al.*, 2004; Fujiwara *et al.*, 2011; Binker *et al.*, 2011; Elahi *et al.*, 2012). Estudis recents han demostrat l'efectivitat de l'àcid el·làgic en inhibir l'expressió de MMPs, en concret la MMP-2 i -9, amb la conseqüent supressió del desenvolupament dels tumors induïts (Vidya Priyadarsini *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013).

En consonància amb la seua activitat proapoptòtica, l'àcid el·làgic també ha demostrat exercir una activitat antitumoral pel seu efecte antiangiogènic. En condicions d'hipòxia, les cèl·lules tumorals desenvolupen un conjunt coordinat de respostes per tal d'incrementar el seu suplement sanguini per mitjà del factor VEGF. Així, la teràpia antiangiogènica s'ha inclòs en el tractament de molts tumors sòlids (Terme *et al.*, 2012). Estudis recents demostren l'efecte de l'àcid el·làgic sobre el factor VEGF inhibint, bé l'activitat del seu receptor (Wang *et al.*, 2012a), bé l'expressió d'ambdós tant al teixit tumoral com a les cèl·lules endotelials circulants (Zhao *et al.*, 2013). Prèviament, ha estat demostrada la seua activitat antitumoral per la seua influència sobre els receptors dels factors VEGF i de creixement derivat de plaquetes (PDGF) (Labrecque *et al.*, 2005).

Per tant, pot establir-se que l'àcid el·làgic és capaç d'inhibir la proliferació de les cèl·lules tumorals, d'induir apoptosi al teixit tumoral i d'inhibir la producció de marcadors d'angiogènesi i apoptosi.

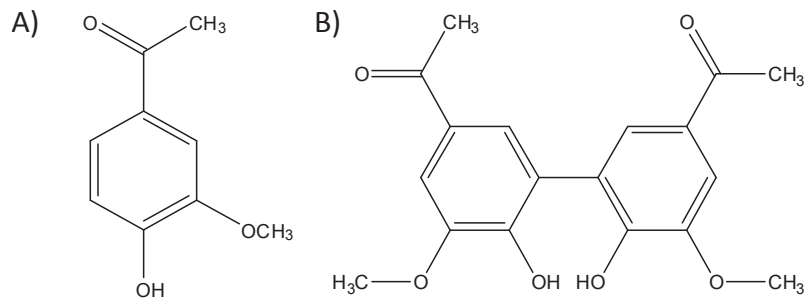
#### – Paper en la inflamació intestinal

Un dels principals factors implicats en la resposta inflamatòria intestinal són les MAPKs, capaces de regular l'activació de NF- $\kappa$ B mitjançant múltiples mecanismes. En un model *in vivo* de MC, l'àcid el·làgic va reduir la infiltració de neutròfils i la sobreexpressió dels enzims COX2 i iNOS, el que va disminuir la severitat i l'extensió del dany intestinal. A més, el polifenol també va prevenir l'activació de NF- $\kappa$ B per inhibir la degradació del seu inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ , el que va impedir l'activació de les MAPKs p38, ERK1/2 i JNK (Rosillo *et al.*, 2011). En un estudi posterior al mateix model d'inflamació intestinal, es va demostrar que l'àcid el·làgic era el principal responsable de l'activitat antiinflamatòria d'un extracte de magrana (Rosillo *et al.*, 2012).

#### II.1.5.2.2. Apocinina

L'apocinina (4-hidroxi-3-metoxi-acetofenona) o acetovanillona (Figura II.7A) és un catecol metoxi-substituït, originalment aïllat i identificat de les arrels de *Picrorhiza kurroa* Royle (Scrophulariaceae), una planta procedent de les muntanyes de l'Himàlaia molt coneguda en la medicina tradicional India (Ayurvèdica) pel seu ús en un gran nombre de malalties. Com un eficient inhibidor de l'acoblament del complex enzimàtic NADPH oxidasa, una de les fonts endògenes més importants d'EROs a l'organisme, l'acetofenona ha estat àmpliament emprada en farmacologia experimental per al tractament de malalties en les que la

participació de les EROs està ben establerta, com són les patologies vasculars, inflamatòries i neurodegeneratives (Lafeber *et al.*, 1999; Chian *et al.*, 2012; Kinkade *et al.*, 2013). En la actualitat, s'accepta que el seu mecanisme intracel·lular d'inhibició de la NADPH oxidasa està relacionat amb l'acoblament de l'enzim per mitjà del bloqueig de la translocació de les subunitats citosòliques p47- i p67-phox a la seua subunitat homòloga gp91-phox en la membrana cel·lular de cèl·lules fagocítiques (Van den Worm, 2001a; Barbieri *et al.*, 2004). A més, l'apocinina també ha demostrat inhibir l'expressió dels components p47-, p67- i gp91-phox (Hur *et al.*, 2010).



**Figura II.7.** A) Apocinina i B) diapocinina.

Una important troballa sobre el seu mecanisme d'acció és que actua com un profàrmac que és convertit a un dímer denominat diapocinina (Figura II.7B) per mitjà de l'oxidació per la MPO, el que s'ha establert que és més eficient que l'apocinina (Ximenes *et al.*, 2007), i el que es suggereix que és el responsable del bloqueig de l'activitat de l'oxidasa (Van den Worm *et al.*, 2001b). Si bé es creu que la capacitat antioxidant de l'acetofenona o de la diapocinina és clau per a algun dels seus efectes biològics, actualment es planteja que aquestes activitats beneficioses puguen ser independents del seu efecte sobre l'oxidasa. En qualsevol cas, encara que el seu mecanisme d'acció no està completament elucidat, l'apocinina és l'inhibidor de NOX més emprat i és considerada una

candidata apropiada per a una supressió efectiva de l'estrès oxidatiu i la inflamació. A més, per la seua baixa toxicitat (LD<sub>50</sub>: 9 g/kg), l'apocinina presenta un alt perfil de seguretat i pot ser perfectament administrada per via oral, sent ben tolerada pels rosegadors sense afectar negativament la seua immunitat cel·lular o humoral (Van den Worm, 2001a).

– **Activitat antioxidant**

L'apocinina ha demostrat un efecte beneficiós front al desenvolupament de malalties en les que està implicat l'estrès oxidatiu. El treball de Connell *et al.* (2011) dóna suport a investigacions prèvies que suggereixen un important efecte neuroprotector de l'apocinina al reduir la producció d'espècies reactives, no obstant això, el mecanisme pel qual exerceix aquest efecte és controvertit. D'una banda, es suggereix que apocinina és més un antioxidant directe que un inhibidor específic de la NADPH oxidasa, almenys en cèl·lules vasculares o del múscul esquelètic lliures de MPO (Heumüller *et al.*, 2008). De fet, la seua estructura molecular conté un grup fenol amb potent capacitat captadora de radicals lliures (Steffen *et al.*, 2008). En canvi, altres autors suggereixen que l'activitat d'apocinina com inhibidor de l'acoblament del sistema enzimàtic es limita als leucòcits que expressen la peroxidasa, necessària per tal d'induir la formació del dímer (Dodd-O i Pearse, 2000). Petrônio *et al.* (2013) han manifestat que l'apocinina té una activitat relativament dèbil com captadora de radicals lliures i una elevada capacitat per a captar espècies oxidants no radicalàries, com són l'àcid hipoclorós (HOCl) i el peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Per tant, aquest fet planteja que la seua activitat antiradicalària directa pot no ser la responsable dels seus múltiples efectes farmacològics.

### – Activitat antiinflamatòria

Les dades disponibles fins al moment donen suport al concepte de què la NADPH oxidasa regula la inflamació per mitjà de la modulació de proteïnes redox sensibles com el NF- $\kappa$ B. En concret, s'ha demostrat que la subunitat p47-phox participa en l'activació del factor de transcripció per l'associació del seu domini DH3 amb la subunitat RelA del factor en cèl·lules endotelials (Gu *et al.*, 2003). A més, diverses cinases proteiques com la PKC o les MAPKs també estan implicades en la fosforilació i activació de l'oxidasa (El-Benna *et al.*, 2009).

*In vitro*, els efectes antiinflamatoris d'apocinina inclouen la reducció de l'esclat oxidatiu per neutròfils, de l'adhesió dependent de VCAM-1 de cèl·lules monocítiques a cèl·lules endotelials humanes de vena umbilical estimulades per TNF- $\alpha$  i de la quimiotaxi de granulòcits polimorfonuclears (PMNs) (Stefanska i Pawliczak, 2008). A més, és capaç d'inhibir l'activitat i la síntesi proteica de COX-2 en monòcits humans, per mitjà de la inhibició de la producció intracel·lular d'EROs i el quocient glutatió reduït/oxidat (GSH/GSSG), així com per la prevenció de l'activació del NF- $\kappa$ B (Barbieri *et al.*, 2004). Tanmateix, l'apocinina modula la resposta inflamatòria per la reducció cel·lular de la concentració de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el que inhibeix la fosforilació i degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$  i IKK $\alpha\beta$ , així com l'activació de la cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK) i la via PI3K/Akt (Kim *et al.*, 2008). La seua activitat antiinflamatòria també afecta a l'expressió d'iNOS, el que redueix la concentració de NO i en conseqüència la producció de peroxinitrit, la qual cosa li confereix una important activitat tipus AINE (Hougee *et al.*, 2006).



*In vivo*, l'apocinina inhibeix la translocació nuclear del factor NF- $\kappa$ B i modula el sistema immune a través de la inhibició de l'expressió de citocines com TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$ , reduint així la migració de leucòcits cap a l'exsudat inflamatori en animals artrítics, el que es correlaciona amb una significativa reducció de la síntesi de PGE<sub>2</sub> al lloc de la inflamació (Pandey *et al.*, 2009). A més, ha demostrat ser capaç d'atenuar el dany pulmonar sèptic per mitjà de la reducció de l'expressió de la molècula d'adhesió de neutròfils CD31 al líquid de perfusió circulat, i de reduir la concentració de MPO, mesurada com un índex de migració de leucòcits al teixit pulmonar (Chian *et al.*, 2012). En aquest sentit, es suggereix que la inhibició de la NADPH oxidasa per l'apocinina pot interceptar en una fase primerenca el desenvolupament del procés inflamatori (Impellizzeri *et al.*, 2011)

#### – Paper en la inflamació intestinal

Fins ara, el paper d'apocinina en el tractament de la MII ha estat estudiat en models experimentals de MC. En un model de TNBS en rates, l'administració intravenosa d'apocinina va reduir la concentració d'EROs i el conseqüent dany tissular, possiblement per la prevenció del flux de cèl·lules inflamatòries a la zona del còlon afectada (Van den Worm, 2001a). En un altre estudi d'inflamació a l'intestí prim induït en rates per administració de la iodocetamida –un agent bloquejant de grups sulfidril– l'addició d'apocinina en l'aigua de beguda va reduir l'extensió i la severitat del dany a la mucosa del jejú i va donar un resultat histològic pròxim a la normalitat al final del tractament (Rachmilewitz *et al.*, 1997).

### II.1.5.2.3. Rutina

Dins la família Rutaceae, àmpliament emprada en la medicina tradicional, la planta medicinal més comuna és la *Ruta graveolens* L., coneguda com ruda (Middleton *et al.*, 2000). Entre els seus flavonoides més actius destaca la rutina (2-[3,4-dihidroxifenil]-5,7-dihidroxiquinon-3-(6-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil]- $\beta$ -D-glucopiranosid)) o quercetin 3 $\beta$ -D-rutinòsid; Figura II.8), present en moltes espècies vegetals com el blat negre, el te, l'herba de Sant Joan (*Hypericum perforatum*, Hypericaceae) i fruits i derivats com cebes, pomes i vi (Known *et al.*, 2005). La seua potent activitat antioxidant (La Casa *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2000) li confereix una àmplia varietat d'activitats com antiinflamatòria, anticancerígena, citoprotectora, antiplaquetària, antitrombòtica, vasoprotectora i cardioprotectora (Chua, 2013).

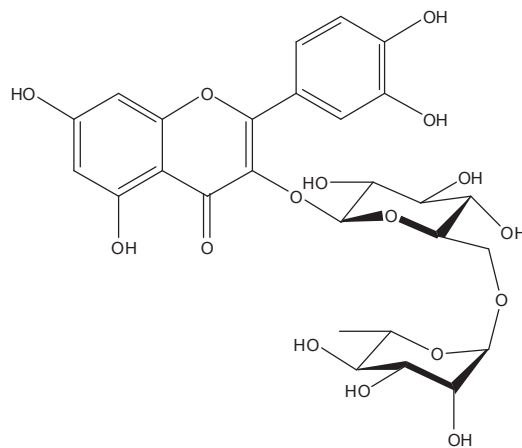


Figura II.8. Rutina

Diversos estudis han demostrat que la rutina no és absorbida després de l'administració oral en humans o en rates, sinó que és hidrolitzada per la flora intestinal per donar lloc a nombrosos metabòlits (quercetina, isoramnetina, tamarixetina i àcids fenòlics), els quals es creu

que són els responsables de la seua activitat (Manach *et al.*, 1995; Choudhury *et al.*, 1999; Erlund *et al.*, 2000).

– **Activitat antiinflamatòria**

S'ha demostrat que la rutina inhibeix *in vitro* l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular i suprimeix l'adhesió i migració de monòcits. A més, es suggereix que és capaç de modular l'activitat del factor NF- $\kappa$ B per la supressió de la fosforilació d'I $\kappa$ B $\alpha$  i de la producció de mediadors inflamatoris com TNF- $\alpha$  (Lee *et al.*, 2012). Així, la seua activitat antiinflamatòria *in vivo* podria ser explicada, almenys en part, per la inhibició de la producció de mediadors inflamatoris clau en la migració i activació de leucòcits i macròfags, el que bloqueja el desenvolupament de la inflamació crònica (Gao *et al.*, 2013).

– **Activitat antioxidant**

Els flavonoides amb estructura 3',4'-catecol i/o 4-oxo junt a 5-OH promouen una forta inhibició de l'oxidació induïda per la reacció de Fenton, per mitjà de la formació dels complexos de quelació amb els cations divalents entre els grups 5-OH i 4-oxo, o bé entre els grups hidroxil de les posicions 3', 4' (Wang *et al.*, 2006). La rutina i la seua aglicona quercetina, són agents quelants molt potents dels metalls de transició, el que els confereix una important protecció front a la peroxidació lipídica. A més, la rutina ha demostrat una important activitat com captadora directa d'EROs, concretament de superòxid, hipoclorit i d'ERN com peroxinitrit (Russo *et al.*, 2000; Moridani *et al.*, 2003).

*In vitro*, la rutina ha demostrat una activitat antioxidant al augmentar els enzims SOD, GPx i CAT, o la relació GSH/GSSG, així com la inhibició de la peroxidació lipídica i la producció de NO, al disminuir l'expressió d'iNOS (Wang *et al.*, 2012b; Magalingam *et al.*, 2013). Una important troballa respecte a la seua activitat antioxidant és la seua capacitat per a inhibir la xantina oxidasa, un dels principals enzims productors d'EROs implicats en el dany oxidatiu tissular (Wang *et al.*, 2012b).

#### – Paper en la inflamació intestinal

Al contrari que ocorre amb la quercetina, l'absorció de rutina està limitada al tracte gastrointestinal superior com a conseqüència de la seua porció glicosilada altament hidròfila. Així doncs, el seu ús es suposa més eficaç, ja que aconsegueix arribar a l'intestí gros sense cap pèrdua química o bioquímica significativa. Allí, la rutina perd ràpidament la part glicosilada per acció de la microflora del còlon i allibera la seua aglicona quercetina, la qual és absorbida ràpidament per les cèl·lules epitelials (Kim *et al.*, 2005; Rabišková *et al.*, 2012).

En aquest context, alguns estudis han demostrat l'efecte beneficiós de rutina en el tractament de la MII. D'una banda, Cruz *et al.* (1998) suggereixen que l'activitat antioxidant de la rutina és la responsable dels seus efectes antiinflamatoris en el model de colitis induïda per TNBS. Kim *et al.* (2005) suporten estudis previs sobre el paper protector del flavonoide al mateix model, fins i tot amb una activitat similar al profàrmac 5-ASA. Els autors suggereixen que la responsable de l'efecte és la quercetina, que actua en la part de l'intestí gros afectada per mitjà de la seua acció sobre el factor NF- $\kappa$ B induït per TNF- $\alpha$ . No obstant això, Kwon

*et al.* (2005) van demostrar que és la rutina i no la seua aglicona la responsable del paper beneficiós en el model de DSS, per mitjà de la modulació de l'expressió gènica proinflamatòria d'IL-1 $\beta$  i IL-6. Els autors van atribuir a aquesta activitat un efecte antioxidant, atès que la producció d'IL-1 $\beta$  és induïda en resposta a un estímul oxidant. A més, van demostrar que la rutina és efectiva en el tractament profilàctic i terapèutic de CU.

### III. MATERIAL I MÈTODES

---



### III.1. MATERIAL I REACTIUS

#### III.1.1. APARELLS I MATERIAL DE LABORATORI

Taula III. 1. Aparells i material de laboratori emprat a l'estudi.

<b>Agitador de vòrtex</b>	IKA® Vortex Genius 3
<b>Agitador magnètic</b>	IKA® RCT Basic
<b>Balança de precisió (0,0001 g)</b>	Sartorius Stedim Biotech
<b>Bany termostàtic amb agitació</b>	Julabo, SW 20
<b>Bany ultrasònic</b>	Branson 5210
<b>Cabina de flux laminar (SCSIE)</b>	Telstar Bio-II-A V6.03
<b>Centrífugues</b>	Eppendorf 5810 R Mikro 200, Hettich
<b>Comptador de cèl·lules i partícules</b>	Z2™ Series COULTER COUNTER®
<b>Cubetes d'electroforesi i electrotransferència</b>	Mini PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad
<b>Espectrofotòmetre</b>	Victor™ X3 2030 Multilable Reader Perkin-Elmer
<b>Espectròmetre de Masses (SCSIE)</b>	VG Auto Spec Fisons
<b>Espectròmetre de Ressonància Magnètica Nuclear (SCSIE)</b>	Bruker AC 300 MHz
<b>Estufa termostàtica</b>	Selecta
<b>Font d'alimentació per a electroforesi</b>	EPS-301, Amersham Biosciences
<b>Homogeneïtzador</b>	Polytron®, Kinematica
<b>Homogeneïtzador ultrasònic</b>	Sonifier™, BRANSON®
<b>Incubador</b>	Hepa Class 00, Termo Electron Corp.
<b>Material fungible de cultius cel·lulars</b>	Nunc, Sarstedt, BD Discardit® II
<b>Material quirúrgic (pinces, estisores)</b>	Fine Science Tools
<b>Micròmetre digital</b>	Series 293, Mitutoyo
<b>Microscopis (SCSIE)</b>	Nikon Eclipse TE2000-S Nikon Eclipse E800
<b>Pletismòmetre digital</b>	7150, Ugo Basile
<b>pH-metre</b>	Crison micro pH-2001
<b>Pipetes automàtiques de diferents volums</b>	Eppendorf Research Labnet, BioPette Multicanal BioPette Repetidora Bibby Step, Bibby Sterillin Ltd.
<b>Termociclador</b>	Mastercycler® Personal, Eppendorf



### III.1.2. REACTIUS

Tots els reactius emprats a l'estudi es van adquirir de Sigma-Aldrich a excepció dels esmentats a continuació:

**Taula III.2.** Reactius emprats a l'estudi adquirits en altres cases comercials diferents a Sigma-Aldrich.

CELL SIGNALING TECHNOLOGY	
Anticòs anti-AKT (#9272)	Anticòs anti-p-IK $\beta$ (Ser32/Ser36) (#9246)
Anticòs anti-p-AKT (#9171)	Anticòs anti-p-STAT3 (Tyr705) (#9145)
Anticòs anti-IK $\beta$ (#4814)	
INVITROGEN/GIBCO	
Encebadors (excepte $\beta$ -actina)	Tampó fosfat salí (PBS) estèril
Medi Eagle modificat per Dulbecco's (DMEM)	Penicil·lina/Estreptomicina
Medi Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640	
MERCK MILLIPORE	
Anticòs anti-COX2 (ABS5118)	Anticòs anti-p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (MABS64)
Anticòs anti-iNOS (06-573)	Reactiu de quimioluminiscència
Anticòs anti-p38 MAPK (506123)	
SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC.	
Anticòs anti-PARP-1 (SC-1562)	Anticòs anti-STAT3 (SC-482)
ALTRES	
Reactius	Casa comercial
Encebador aleatori <i>Roth Hexanucleotide Random-Primer Mix</i>	Carl Roth GmbH
Encebador Oligo(dT)15	Promega
Encebador $\beta$ -actina (ratolí)	R&D Systems
Còctel d'inhibidors de proteases	Roche
Dextranosulfat sòdic (DSS) (36-50 kDa)	MP Biomedical
Etanol	Scharlau
Hidròxid d'amoni (NaOH)	Scharlau
<i>Kit d'EIA per a la determinació de PGE<sub>2</sub></i>	Cayman Chemicals
<i>Kit d'ELISA per a la determinació d'IFN-<math>\gamma</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6 i TNF-<math>\alpha</math> de ratolí</i>	eBioscience
<i>Kit d'extracció de proteïna citoplasmàtica i nuclear ProteoJect<sup>TM</sup></i>	Fermentas
<i>Kit de transcripció inversa AffinityScript MultiTemp</i>	Agilent
<i>Kit RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit</i>	Qiagen
Llet en pols desnatada	Central Lechera Asturiana

Medi de muntatge aquós Glycergel®	Dako
Membrana de PVDF Hybond™-P	GE Healthcare
Mescla de desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTP)	PeqLab
Patró de proteïna de pes molecular	Bio-Rad
Tampó de càrrega desnaturalitzant reductor	Thermo Scientific

## III.2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIINFLAMATÒRIA *IN VIVO*

### III.2.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

S'han fet servir per a l'estudi ratolins femelles de les espècies descrites a continuació, adquirides de la companyia Harlam Interfauna Ibérica S.L. (Barcelona, España) de dos mesos d'edat i un pes comprés entre 18-20 g.



**Ratolins Balb/C:** Es tracta d'una línia de ratolí comunament emprada en determinats protocols d'inflamació i especialment dirigida per a la producció d'anticossos monoclonals. La lletra "c" inclosa en el nom indica albinisme. Es van utilitzar a l'estudi per als assajos de colitis aguda.



**Ratolins C57BL/6 o black 6:** Amb pelatge fosc i temperament fàcilment irritable, és actualment la línia més utilitzada per a ser manipulada genèticament en l'estudi de les malalties humanes, atès que és la primera que té el genoma seqüenciat. Es van utilitzar a l'estudi per als assajos de colitis crònica.



**Ratolins CD-1:** Són ratolins albins caracteritzats per un ràpid creixement, una elevada taxa de reproducció i un comportament bastant dòcil, el que fa que siguin de fàcil manipulació per a un ús general, tant en farmacologia, toxicologia, teratologia com en fisiologia. Es van utilitzar a l'estudi per a l'avaluació de l'activitat antiinflamatòria dels compostos en estudi en els models d'inflamació induïda pels agents 13-acetat de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) i carragenina.

– **Manteniment dels animals d'experimentació**

Després del transport dels animals, un període mínim de dos dies d'adaptació és necessari per a l'estabilització de la funció immunitària, els nivells de corticosterona, així com d'altres paràmetres biològics (Small, 1984; Toth i January, 1990). Els animals van ser convenientment allotjats en gàbies de plàstic amb un llit adsorbent i atòxic i en un nombre adequat.

Fins a l'inici dels experiments i durant el seu transcurs, els ratolins van rebre pinso i aigua *ad libitum*, i es van mantenir en condicions estandarditzades de temperatura/humitat ( $22 \pm 3$  °C/60% HR constant) i cicles de 12 h de llum/obscuritat. El disseny de l'estudi experimental planteja la distribució dels animals en gàbies a raó de 5 ó 6 ratolins per grup d'estudi, sempre tenint en compte el nombre mínim requerit per a obtenir resultats estadísticament vàlids.

Tots els protocols van ser aprovats pel Comitè Ètic de Benestar Animal (CEBA) de la Universitat de València (UV) (Annex III) (Nº 108 A1233134999884, 28-01-2009), seguint la normativa del Reial Decret 1201/2005 actualment reemplaçada pel RD53/2013.

## III.2.2. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

### III.2.2.1. Colitis experimental induïda per DSS

Per la seua simplicitat en induir l'aparició, duració i severitat de la inflamació, el model de colitis ulcerosa induïda químicament per DSS és l'opció escollida per a l'estudi de possibles agents antiinflamatoris en el tractament de la MII.

#### III.2.2.1.1. Preparació de les dietes

El disseny experimental de l'estudi té la particularitat de què els ratolins van ser alimentats amb dietes estandaritzades preparades al laboratori segons el protocol establert per Billerey-Larmonier *et al.* (2008) amb algunes modificacions. Aquestes dietes van ser, als grups d'animals on corresponia, suplementades amb els productes en estudi. Així, el pinso polvoritzat es va mesclar manualment amb els productes fins a l'obtenció d'una mescla uniforme. A continuació, es va addicionar una mescla d'aigua i agar al 0,2% (p/v), prèviament escalfada amb microones, a raó de 0,65 mL per cada gram de pinso a preparar. Com es mostra en la Figura III.1, la mescla es va fragmentar i es van amassar xicotetes porcions o galetes, que es van deixar finalment assecar durant un temps mínim de 24 h. Aquestes galetes van ser l'aliment dels animals durant la duració dels diferents experiments.



**Figura III.1.** Procés d'elaboració del pinso estàndard suplementat amb els productes.

#### **III.2.2.1.2. Model agut de colitis**

L'administració d'una solució de DSS (36-50 kDa) al 5% (p/v) a ratolins Balb/C durant 7 dies va reproduir els paràmetres principals d'inflamació intestinal corresponent a la CU humana. L'elecció del DSS dins d'aquest rang de pes molecular ha estat motivada arran d'estudis histoquímics previs que demostren que el DSS de 40 kDa penetra la membrana de la mucosa intestinal i indueix una colitis severa distribuïda principalment pel terci medi i distal de l'intestí gros (Kitajima *et al.*, 2000).

Els ratolins Balb/C (18-20 g) van ser aleatòriament distribuïts en gàbies (n = 5-6). Tots els grups van ser alimentats amb el pinso manipulats segons s'explica a l'apartat corresponent, la qual cosa va garantir una dieta equilibrada dels animals, encara que després es suplementaria en cada cas amb els productes en estudi. Els animals del grup *blanc* o *sa* van rebre la dieta estàndard i aigua potable/corrent, ambdues sense suplementar. Els animals del grup *control* o *malalt* van rebre la dieta estàndard i aigua suplementada amb DSS al 5% (p/v). Els que van ser inclosos als diferents grups *problema* van rebre la dieta estàndard suplementada amb el producte en estudi corresponent en cada cas i aigua amb DSS al 5%.

Tot i això, dos grups més d'animals es van disposar, d'una banda, amb els productes en estudi en absència de DSS per tal d'estudiar el seu efecte sobre els animals i a l'intestí. D'altra banda, un tractament de referència amb sulfasalazina, la qual es va administrar diàriament per via oral amb ajuda d'una cànula a una dosi de 50 mg/kg dissolta en aigua a raó de 10 mL/kg.

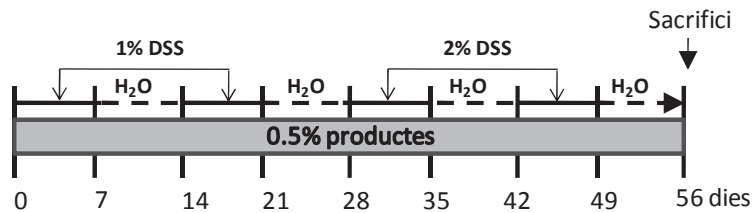
L'àcid el·làgic, apocinina i rutina van ser suplementats a la dieta (2%, p/p), la qual va ser preparada diàriament durant l'experiència per a cadascun dels productes. Després de 7 dies d'ingesta de pinso i beguda *ad libitum*, es va substituir el DSS dels biberons per aigua i es van mantenir els animals fins a l'octau dia. Durant els huit dies, es valorava a cada grup, la ingestió de pinso i beguda, assegurant-se que no existien diferències en quant a les quantitats ingerides, així com, en dies alterns, el pes dels animals. La dosi total de producte ingerida amb el pinso va ser referida a una dosi equivalent en humans (DEH) segons la fórmula basada en el pes corporal:

$$\text{DEH} = \text{dosi animal (mg/kg)} \times \left[ \frac{\text{pes de l'animal (kg)}}{\text{pes d'un humà (kg)}} \right]^{1/3}$$

### III.2.2.1.3. Model crònic de colitis

El model crònic es va portar a terme en ratolins C57BL/6 per l'administració cíclica –7 dies cada cicle– i alterna de DSS a diferents concentracions. Els ratolins es van distribuir aleatòriament i van ser tractats com s'indicava. La dieta va ser suplementada amb els productes en estudi (àcid el·làgic, apocinina i rutina al 0,5%, p/v) en cadascun dels grups d'animals corresponent, deixant lliure accés de pinso i beguda durant els 56 dies de l'experiència.

El model experimental (Figura III.2) es va iniciar amb dos cicles de DSS a l'1% (p/v) en l'aigua de beguda, i es va prolongar amb dos cicles més de DSS al 2% (p/v). Entre ells, es van intercalar cicles d'aigua amb la pretensió de simular les fases de remissió pròpies de la cronicitat del curs clínic de la malaltia.



**Figura III.2.** Esquema d'inducció i tractament de la colitis ulcerosa crònica per administració cíclica de DSS.

La dosi final consumida es va referir a humans al igual que en el model agut (DEH). Els ratolins van ser sacrificats per dislocació cervical el dia 57, es va extraure el còlon i es va procedir a l'avaluació del dany macroscòpic, així com dels diferents mediadors implicats en el curs de la malaltia.

#### III.2.2.1.4. Anàlisi macro, micromorfològica i bioquímica del còlon

##### – Anàlisi de dany macroscòpic

L'avaluació del dany macroscòpic es va realitzar segons els criteris proposats per Cooper *et al.* (1993) i resumits a la Taula III.3:

**Taula III.3.** Sistema de puntuació per al càlcul de l'índex d'activitat de la malaltia (IAM), corresponent a la mitjana de les puntuacions obtingudes en cada apartat.

Puntuació de l'IAM	Pèrdua de pes (%)	Consistència de les femtes	Sang fecal visible
0	Res	Normal	Normal
1	1 - 5		
2	5 - 10	Soltes	Lleuger sagnat
3	10 - 20		
4	> 20	Diarrea	Sang

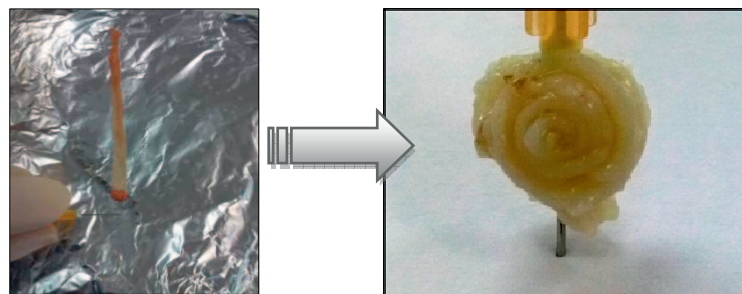
Una vegada extret el còlon, es va rentar amb PBS fred i es va retirar qualsevol resta d'excrements i greix que poguera quedar adherida a la superfície. A continuació, es va estendre sobre paper absorbent i es va mesurar la longitud des de la zona distal (recte) a la proximal (cec) de cadascun d'ells. El grau d'edema tissular es va determinar pel quocient entre la longitud i el pes de l'intestí; aquest últim va ser mesurat després d'eliminar el cec de cada mostra. Finalment, les mostres van ser processades en funció de l'anàlisi posterior a què foren destinades.

#### – Anàlisi histològica

Les mostres de còlon aleatòriament seleccionades (n=3), es van obrir longitudinalment de distal a proximal i es van enrotllar en aquest sentit formant un rotlle amb l'intestí (Figura III.3), el qual incloïa en la part interna la zona distal, d'especial interès per a l'avaluació del dany. El rotlle es va embeure en una solució tamponada de formaldehid al 4% (v/v) i es va mantenir un temps mínim de 24 h per tal de permetre la completa fixació del teixit. Aquestes mostres es van remetre a la secció de microscòpia electrònica del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la UV, on es van fer els talls histològics i la tinció amb eosina i hematoxilina.



L'hematoxilina és un colorant bàsic que tenyeix de color blau-violet les estructures àcides (nucli, ribosomes, reticle endoplasmàtic). L'eosina, en canvi, és un colorant àcid que tenyeix de color rosa-roig les estructures bàsiques (la majoria de les proteïnes citoplasmàtiques i mitocondries). En general, amb aquesta tinció es veuen els nuclis de les cèl·lules en blau i el citoplasma en rosa.



**Figura III.3.** Còlon processat en forma de rotlle per a l'anàlisi histològica.

Totes les imatges es van observar amb un microscopi Eclipse E800 acoblat a una font de llum ultraviolada i a una càmera fotogràfica que treballa amb el software ACT-1, disponible al servei de cultius cel·lulars del SCSIE.

#### – Anàlisi immunohistoquímica (IHQ)

La tècnica IHQ ha estat emprada durant dècades en patologia diagnòstica permetent la localització i identificació immunològica de proteïnes al seu medi natural, tant en cèl·lules com en teixits. Dita tècnica està basada en la reacció antígen-anticòs, la qual pot ser localitzada per l'ús d'un marcador (fluorocroms, enzims, ions metàl·lics en forma col·loïdal o isòtops radioactius). El marcatge pot ser directe o indirecte, en funció de la necessitat d'emprar un únic anticòs marcat (tècniques

directes) o un segon anticòs capaç de reconèixer aquest últim (tècniques indirectes).

A l'estudi es va emprar la tècnica IHQ enzimàtica amb l'ús d'anticossos primaris policlonals i secundaris lligats a l'enzim peroxidasa de rave (HRP). Per reacció de l'enzim amb un substrat cromogen específic, es va visualitzar la reacció antígen-anticòs per la formació d'un precipitat marró al lloc de la reacció. Les mostres de còlon destinades a l'anàlisi IHQ van ser seccionades i preparades pel servei de microscòpia electrònica (SCSIE). Cada portaobjectes contenia 6 seccions de teixit (5 µm) corresponents a cadascuna de les mostres. Es va seguir el següent esquema de treball:

1. Desparafinització i rehidratació:

- Les preparacions es van mantenir 15 min a 56-60 °C i van ser desparafinades per successius rentats en xilè (3 vegades × 15 min) i rehidratades amb solucions d'alcohol de gradació progressivament decreixent (alcohol absolut – alcohol 90% – 70%).
- Els portaobjectes es van aclarir amb aigua destil·lada i es van mantenir embeguts en una solució salina tamponada amb Tris 0,05 M (TBS).

Cal tenir en compte que la prèvia fixació del teixit modifica l'estructura terciària de les proteïnes (antígens), fent-los quasi sempre difícilment detectables per anticossos específics, ja que la reacció antígen-anticòs depèn de la conformació del primer. Així, la majoria dels teixits fixats amb formaldehid requereixen un pas previ a la tinció IHQ:

## 2. Desemmascarament de l'antigen (AR) induït per calor:

- Les mostres es van embeure en una solució 0,01 M de tampó de citrat sòdic (pH 6), prèviament escalfada fins a ebullició, i es van incubar durant 20 min a la màxima potencia en el microones.
- Es van rentar amb TBS contenint 0,025% de detergent Tween®-20 (TBS-T) (3 vegades × 2 min).

La necessitat d'aquest pas també depèn de l'anticòs que vaja a ser emprat; els anticossos policlonals són més propensos per a detectar antígens que els monoclonals en absència d'AR, atès que els primers són capaços d'identificar múltiples isoformes (epítops) de la proteïna diana (Ramos-Vara, 2005).

Malgrat ser un excel·lent agent permeabilitzant, en aquest cas el detergent emprat per als rentats no actua com a tal, ja que una vegada els teixits o cèl·lules han estat fixats (formaldehid, acetona, etanol, congelació, etc.) ja no poden seleccionar el tràfic de molècules intracel·lular i els anticossos poden fàcilment travessar les membranes (Buchwalow i Böcker, 2010). La presència d'una xicoteta quantitat de detergent a la solució de rentat únicament redueix la tensió superficial i permet als reactius cobrir completament la secció de teixit per mantenir la mostra humida durant més temps. És important evitar que les seccions arriben a assecar-se, ja que això podria ser causa d'unió inespecífica de l'anticòs.

## 3. Bloqueig:

- Les mostres es van embeure en una solució d'albúmina sèrica bovina (BSA) al 2% (p/v) dissolta en TBS-T durant 30 min.

El bloqueig de les seccions evita possibles unions inespecífiques que poden estar causades per les interaccions iòniques i hidrofòbiques al teixit.

4. Anticòs primari:

- Les seccions van ser incubades amb l'anticòs primari, dissolt en TBS-T a la concentració recomanada pel fabricant, en una càmera humida, i es van mantenir tota la nit a 4 °C. En cadascun dels portaobjectes es va processar una de les seccions com a control negatiu amb l'omissió de l'anticòs primari.

5. Bloqueig de l'activitat peroxidasa endògena:

- Es van addicionar a les mostres unes gotes d'una solució de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (v/v) en aigua destil·lada durant 10 min.

Aquest bloqueig es fa indispensable degut a l'ús posterior del mètode de detecció amb un anticòs secundari conjugat amb la HRP, per tal d'evitar l'aparició de falsos positius al resultat final.

6. Anticòs secundari:

- Es van incubar les preparacions amb l'anticòs secundari diluït 1:200 en TBS-T durant 30 min a 37 °C.

7. Reacció cromogènica:

- Es van addicionar unes gotes de la solució del cromogen 3,3'-diaminobencidina (DAB), preparada prèviament segons les instruccions del fabricant, i es van mantenir durant 10 min o fins que s'observava el color desitjat.
- Finalment es va rentar amb abundant aigua corrent.

La DAB actua com un dador d'electrons en la reacció entre la peroxidasa i  $H_2O_2$ . Les molècules de DAB oxidades reaccionen entre sí formant polímers insolubles de color marró obscur que precipiten (Figura III.4).

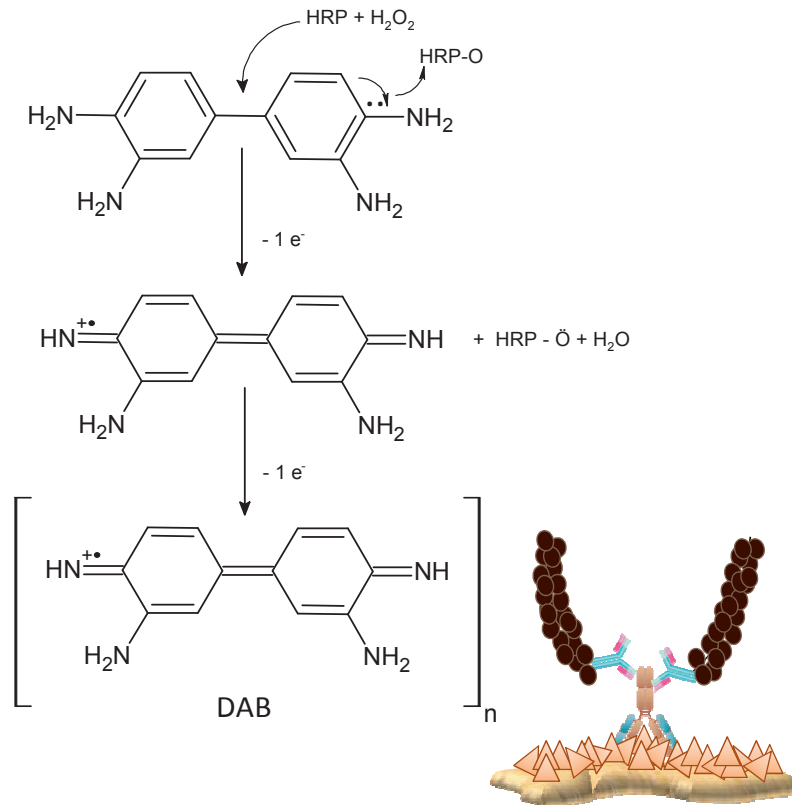


Figura III.4. Reacció colorimètrica entre HRP i DAB.

#### 8. Contrast amb hematoxilina i muntatge:

- Les preparacions van ser contratenyides amb hematoxilina de Meyer diluïda 1:10 en aigua durant 5 min i es va muntar el cobreobjectes amb unes gotes de medi de muntatge aquós que es va deixar assecar a temperatura ambient.

### – **Cultiu *ex vivo* dels explants de còlon**

De cada grup d'animals, tres mostres de còlon van ser destinades al cultiu *ex vivo* segons Giner *et al.* (2011b). Després de retirar el còlon es va rentar amb medi RPMI-1640 contenint sèrum fetal boví (SFB) al 2%, i els antibiòtics penicil·lina a l'1% (100 U/mL) i estreptomicina a l'1% (100 µg/mL). A continuació, el teixit es va tallar en segments entre 1 i 2 cm de llarg i es va incloure cada segment en un pou de la placa de cultiu contenint medi RPMI-1640 suplementat amb SFB al 10% i antibiòtics. Els explants van ser incubats durant 24 h a 37 °C en un ambient controlat de CO<sub>2</sub>.

Transcorregut aquest temps, es va recollir el sobrenedant de cadascun dels pous i es va pesar cada explant de teixit per poder referir les dades obtingudes dels sobrenedants amb el corresponent pes de cada fragment. Les mostres recollides van ser ràpidament congelades a -80 °C fins el seu ús.

#### **III.2.2.2. Inflamació auricular induïda per 13-acetat de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)**

El TPA és la substància més potent continguda a la mescla d'èsters de forbol extreta de l'oli de croton (*Croton tiglium* L., Euphorbiaceae), conegut per les seues propietats proinflamatòries, irritants i promotor de tumors. Mitjançant una prolongada activació del receptor de la PKC, el TPA estimula l'activació d'una àmplia varietat de vies intracel·lulars com les MAPKs i la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), el que condueix a l'alliberació del factor activador de plaquetes (PAF) i l'AA (Chun *et al.*, 2003). Aquesta cascada d'esdeveniments estimula en última instància la síntesi

d'eicosanoides inflamatoris com la PGE<sub>2</sub> i el leucotrié B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), mitjançant els enzims COX i 5-LOX (Gabor, 2000).

El procés inflamatori induït per aplicació tòpica de TPA es desencadena inicialment generant vasodilatació i eritema (1-2 h) i, posteriorment, extravasació i edema (3-4 h), assolint el màxim a les 6-8 h. Entre les 2 i 6 h s'observa, histològicament, agregació plaquetària, i agregació i adherència de neutròfils i eosinòfils. A partir de les 6 h s'observa migració a la dermis i desgranulació de mastòcits. Encara que l'edema s'ha resolt a les 24 h, la vasodilatació i l'eritema poden persistir fins a les 48 h (Young *et al.* 1983).

#### **III.2.2.2.1. Inflamació auricular aguda**

Els ratolins CD-1 es van distribuir aleatòriament en diferents grups, a raó de 5 i 6 animals per grup. Seguint la tècnica descrita per Hernández *et al.* (2005), l'edema es va induir en l'orella dreta del ratolí per aplicació tòpica de 2,5 µg de TPA dissolt en 20 µL d'acetona, a raó de 10 µL a cada costat de l'orella. Apocinina i diapocinina es van dissoldre a una concentració de 100 mg/kg en NaOH 0,1 N, i es va administrar una dosi única via oral 1 h abans de l'aplicació de TPA amb l'ajuda d'una cànula. Com a fàrmac de referència es va emprar indometacina, administrat per via oral a una concentració de 10 mg/kg i dissolt en el vehicle indicat. El grup control rebia al mateix temps per via oral el vehicle emprat.

Previ a l'aplicació tòpica de TPA (0 h) i 4 h després, es va mesurar l'espessor de cada orella amb ajuda d'un micròmetre digital. La diferència d'espessor entre les 0 i les 4 h va proporcionar la magnitud de l'edema

ocasionat, permetent així avaluar l'activitat antiinflamatòria per mitjà del càlcul del percentatge d'inhibició segons la fórmula següent:

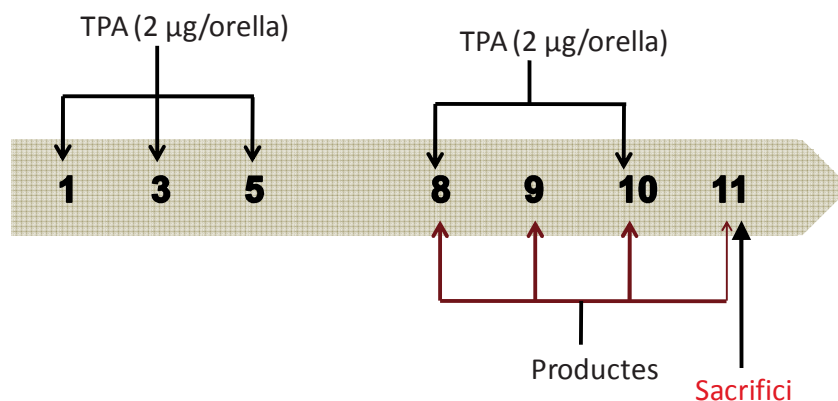
$$\% \text{ Inhibició} = \frac{\Delta E_c - \Delta E_p}{\Delta E_c} \times 100$$

Sent,  $\Delta E_c$  la mitjana aritmètica de l'increment d'espessor de les orelles en el grup control, i  $\Delta E_p$  la mitjana aritmètica de l'increment d'espessor en el grup problema.

### III.2.2.2.2. Inflamació auricular crònica

El tractament a llarg termini amb TPA en l'orella del ratolí, indueix una prolongada resposta inflamatòria caracteritzada per un increment del pes de l'orella amb hiperplàsia epidèrmica, junt amb una elevada infiltració dèrmica de cèl·lules immunes i angiogènesi.

Per a l'estudi es van utilitzar ratolins femella CD-1 i es va seguir el protocol descrit per Recio *et al.* (2000). Els animals van ser aleatòriament dividits en grups, a raó de 6 animals per grup, i van ser sotmesos a l'aplicació tòpica de 5 dosis de TPA (2 µg/orella en 20 µL d'acetona) repartides segons representa el següent esquema:



**Figura III.5.** Esquema d'inducció i tractament de la inflamació crònica per aplicació repetida de TPA.



Durant la primera setmana es va induir el procés inflamatori amb l'aplicació tòpica de TPA en dies alterns; la segona setmana es va avaluar l'efecte antiinflamatori dels productes en estudi i es va perpetuar la lesió per la continua aplicació de l'agent irritant.

Apocinina i diapocinina es van dissoldre en una solució de NaOH 0,1 N a una concentració de 100 mg/kg. En el mateix vehicle es va dissoldre dexametasona (5 mg/kg), emprada com a fàrmac de referència. Els productes es van administrar via oral amb ajuda d'una cànula, en una única administració diària durant els quatre primers dies de la segona setmana del tractament. Després de 6 h de l'última administració, els animals es van sacrificar per dislocació cervical i, amb l'ajuda d'un llevabocins, es van extraure seccions circulars de les orelles de cada animal i es van pesar per determinar l'edema per diferència de pes respecte al grup control. Els resultats van ser expressats com el percentatge d'inhibició de l'edema, segons l'expressió:

$$\% \text{ Inhibició} = \frac{\Delta P_c - \Delta P_p}{\Delta P_c} \times 100$$

Sent:

- $\Delta P_c$  l'increment de pes de les orelles obtingut a partir de la diferència entre la mitjana aritmètica dels pesos de les orelles del grup control (tractades amb TPA) i la mitjana aritmètica dels pesos de les orelles del grup blanc (tractades amb acetona);
- $\Delta P_p$  l'increment de pes de les orelles obtingut a partir de la diferència entre la mitjana aritmètica dels pesos de les orelles del grup problema (tractades amb TPA i productes en estudi) i la

mitjana aritmètica dels pesos de les orelles del grup blanc (tractades amb acetona).

Finalment, totes les mostres recollides van ser processades segons l'anàlisi posterior a què es destinaren.

#### **III.2.2.2.3. Anàlisi histològica**

De cada grup d'animals, les orelles de tres ratolins van ser tractades per a l'anàlisi histològica. Aquestes mostres van ser obtingudes després del sacrifici de l'animal mitjançant un tall longitudinal a partir de la base de l'orella. A continuació, es van embeure en una solució tamponada de formaldehid al 4% i van ser mantingudes a 4 °C almenys durant 24 h. Una vegada assegurada la fixació del teixit, les mostres es van remetre a la secció de microscòpia electrònica del SCSIE, on es van realitzar els talls i la posterior tinció amb eosina i hematoxilina.

Una mostra representativa de les seccions transversals de les orelles tenyides van ser avaluades segons els paràmetres generals d'inflamació cutània mitjançant el microscopi Eclipse E800, acoblat a una font de llum ultraviolada i a una càmera fotogràfica que treballa amb el software ACT-1, disponible al servei de cultius cel·lulars del SCSIE.

#### **III.2.2.3. Edema plantar induït per carragenina**

Estructuralment, els carragenans són un grup complex de polisacàrids constituïts per unitats repetides de galactosa i/o anhidrogalactosa, sulfatades o no, sent els més importants els designats amb les lletres gregues  $\kappa$  (kappa),  $\lambda$  (lambda) i  $\iota$  (iota). En concret, la  $\lambda$ -carragenina és un mucopolisacàrid sulfatat extret de l'alga marina

*Chondrus crispus* Stackh. (Gigartinaceae), àmpliament emprada per injecció per tal d'induir una resposta inflamatòria, degut a la seua baixa consistència de gel a temperatura ambient.

La inflamació induïda per  $\lambda$ - carraguenina, originalment descrita per Winter *et al.* (1962), s'inicia amb la inducció i alliberació d'histamina, serotonina i cinines de fase primerenca (0-1 h), així com PGs i proteases en fases tardanes (1-5 h), els quals donen lloc a l'alliberació de radicals lliures, encarregats de perpetuar la resposta inflamatòria. El màxim s'estableix aproximadament a les 5 h, sent adequades la lectura de la resposta inflamatòria o edema a tres temps diferents, 1, 3 i 5 h des de la injecció de l'agent irritant.

A l'estudi es va seguir el model descrit per Recio *et al.* (2000) per a l'avaluació de l'activitat antiinflamatòria d'apocinina i diapocinina als diferents temps establerts després de la injecció. Així, els productes (100 mg/kg) dissolts en una solució de NaOH 0,1 N van ser administrats per via oral amb ajuda d'una cànula 1 h abans de la injecció de carraguenina. Com a fàrmac de referència es va emprar indometacina (10 mg/kg) dissolta en el mateix vehicle. Després d'1 h es van injectar 25  $\mu$ L de carraguenina al 3% dissolta en sèrum fisiològic (p/v) en l'aponeurosi plantar dreta. Als temps d'1, 3 i 5 h després de la inducció del procés inflamatori, es va mesurar l'increment de volum dels peus de l'animal, amb ajuda d'un pletismòmetre (veure Figura III.6), i l'edema va ser expressat com la diferència entre el volum del peu tractat respecte al no tractat.

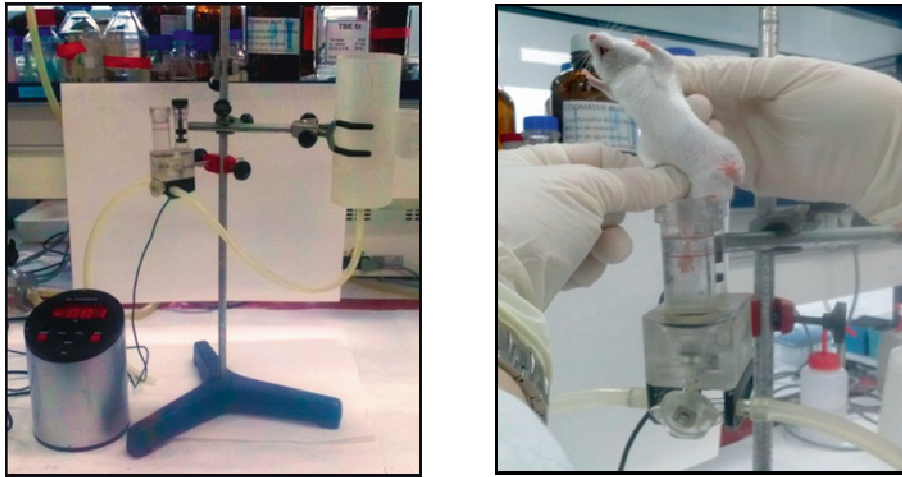


Figura III.6. Imatge del pletismòmetre i mesura del volum plantar.

L'activitat antiinflamatòria va ser avaluada pel càlcul del percentatge d'inhibició de l'edema induït, segons l'expressió matemàtica descrita a l'apartat III.2.2.2.1.

### III.3. DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES

Després de l'anàlisi macroscòpica, histològica i immunohistoquímica, les mostres de teixit obtingudes dels diferents assajos *in vivo* van ser destinades al posterior estudi de mediadors implicats en la malaltia i, per a això, van ser sotmeses a diferents processos de preparació en funció de l'assaig posterior a realitzar.

#### III.3.1. EN L'HOMOGENEÏZAT DE TEIXIT

##### III.3.1.1. Preparació de les mostres

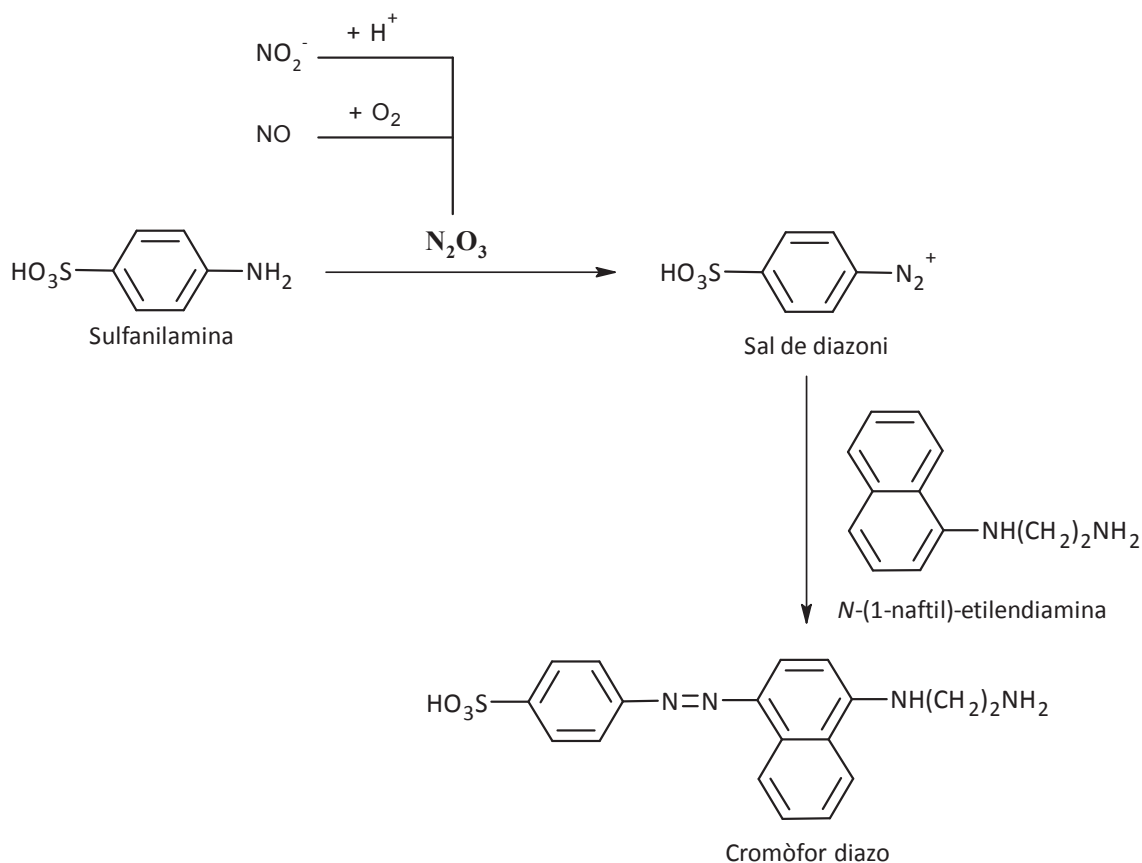
Les mostres de còlon prèviament congelades de les zones mitja i distal van ser posteriorment polvoritzades en un morter refrigerat. Aquesta tècnica disgrega els teixits i facilita el posterior homogeneïzat de les mostres als diferents tampons. Amb aquesta finalitat, es va incloure la mostra dins d'un tub Eppendorf en nitrogen líquid per assegurar-se que

arribava a la temperatura idònia de congelació per poder mantenir-la congelada durant el temps del triturat. La mostra es va triturar al morter amb intensitat i es va arreplegar ràpidament per tal de congelar-la de nou.

### III.3.1.2. Producció d'òxid nítric (NO)

El NO i els òxids de nitrogen relacionats són coneguts reguladors endògens cel·lulars i de la funció tissular. El NO és un radical lliure amb una semivida molt curta dins del rang establert entre menys d'1 s en presència d'hemoglobina i fins a 30 s. A l'organisme, la major part de NO és ràpidament oxidat a nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) i/o nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) per l'oxigen, així, una estimació indirecta de l'índex de producció del gas pot fer-se per la determinació de les concentracions dels anions (Viinikka, 1996).

En 1879, Peter Griess va desenvolupar un reactiu format per *N*-1-naftil-etilendiamina i sulfanilamida en àcid fosfòric. Quan aquest reactiu de Griess reacciona amb l'òxid nítric ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), generat a partir del nitrit acidificat (o de l'autooxidació del NO) (Figura III.7), es forma un cromòfor de grups *azo* de color púrpura que pot ser mesurat espectrofotomètricament a 540 nm; aquesta mesura es una estimació quantitativa i segura del NO produït *in vivo*.



**Figura III.7.** Reacció de Griess

El sobrenedant obtingut del cultiu *ex vivo* dels explants de còlon (veure apartat III.2.2.1.4.), va ser destinat a la posterior determinació de la secreció de NO al teixit. Per això, es van fer reaccionar 100  $\mu\text{L}$  del reactiu de Griess amb una quantitat equivalent de sobrenedant recollit i es va incubar uns 20 min a 37  $^\circ\text{C}$ . A continuació, es va observar un canvi de color progressiu, l'absorbància del qual es va llegir a 540 nm. La concentració de NO es va calcular a partir d'una corba patró d'un estàndard de nitrit sòdic ( $\text{NaNO}_2$ ).

### III.3.1.3. Infiltració leucocitària

L'enzim MPO és la proteïna més abundant localitzada als lisosomes, en els grànuls atzuròfils dels neutròfils. És l'única peroxidasa existent encarregada de catalitzar la conversió de  $\text{H}_2\text{O}_2$  i clorur a HOCl. Així, com

un mecanisme de defensa, s'ha demostrat un increment significatiu de l'activitat de l'enzim en processos patològics i malalties caracteritzades per un elevat estrès oxidatiu (Baldus *et al.*, 2003; Stamp *et al.*, 2012).

Per la seua localització cel·lular, existeix una relació directa entre la seua activitat i el nombre de neutròfils infiltrats al teixit inflammat, cosa per la qual la seua activitat es pot emprar com un índex de migració leucocitària i per tant, d'estrès oxidatiu. Així doncs, l'activitat MPO es determina en les mostres de còlon i orelles dels animals després de la inducció dels processos inflamatoris aguts, segons el protocol basat en el mètode establert per Suzuki *et al.* (1983), i modificat per De Young *et al.* (1989).

Una mostra del teixit polvoritzat del còlon (15-20 mg) o una mostra d'orella completa, van ser homogeneïtzades amb l'ajuda d'un homogeneïtzador Polytron® en tampó fosfat sòdic 0,08 M (pH 5,4) suplementat amb bromur d'hexadeciltetrametilamoni al 0,5%. A continuació, es van centrifugar a 11.300×g durant 20 min a 4 °C i el sobrenedant es va recollir i es va conservar a -80 °C fins al seu ús.

#### – Assaig

Inicialment, 30 µL del sobrenedant van ser adicionats a cada pou en la microplaca. Junt a la mostra es van adicionar successivament 100 µL de PBS, 85 µL de tampó fosfat sòdic 0,22 M (pH 5,4) i 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,017%. A continuació es van afegir 20 µL de clorhidrat de tetrametilbencidina (TMB) 1,84 mM en solució aquosa de dimetilformamida al 8%, com un substrat colorimètric de l'enzim MPO. Es va deixar reaccionar a 37 °C durant 3 min i es va detenir la reacció per

l'addició de 30 µL de tampó acetat sòdic (pH 3) en un bany de gel. L'activitat enzimàtica va ser determinada colorimètricament mesurant l'absorbància a 630 nm.

El percentatge d'inhibició de l'activitat MPO dels productes en estudi es va calcular segons l'expressió:

$$\% \text{ Inhibició} = \frac{\bar{A}_c - \bar{A}_p}{\bar{A}_c}$$

Sent,  $\bar{A}_c$  la mitjana aritmètica dels valors d'absorbància del grup control i  $\bar{A}_p$  la mitjana aritmètica dels valors d'absorbància del grup problema.

#### III.3.1.4. Producció de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

En resposta a un estímul inflamatori, la PGE<sub>2</sub> es sintetitza *de novo* a partir del metabolisme de l'AA i per acció de les ciclooxigenases. La quantitat de PGE<sub>2</sub> present en l'homogeneïtzat de la mucosa del còlon dels ratolins es va mesurar amb un *kit* comercial (*Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA kit-Monoclonal*) basat en la conversió dels metabòlits derivats de la PGE<sub>2</sub> en derivats estables que poden ser fàcilment detectables i quantificables per enzimoinmunoassaig (EIA).

Prèviament, es va purificar la PGE<sub>2</sub> a partir del teixit animal per extracció en fase sòlida seguint el següent esquema:

- Es va homogeneïtzar una mostra del teixit polvoritzat (15-20 mg) en 1 mL de tampó fosfat 0,1 M (pH 7,4), contenint àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) 1 mM i indometacina 10 µM amb ajuda del sonicador. La mescla es va mantenir durant 5 min a temperatura ambient.



- Després d'afegir un volum igual d'acetona a cada mostra es van centrifugar a  $1.500\times g$  durant 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuació, l'acetona es va evaporar emprant nitrogen gasós.
- Es van acidificar les mostres fins un pH de 3,5 afegint un volum suficient d'acetat sòdic 50 mM (pH 3,6).
- Es van activar les columnes C18 Sep Pak *cartridge* eluint 5 mL de metanol i, a continuació, aigua ultrapura per evitar que els cartutxos s'assecaren.
- Es van fer passar les mostres a través de columnes i, després de rentar amb aigua i 5 mL d'hexà, l'eluat es va arreplegar amb acetat d'etil contenint un 1% de metanol (v/v), el qual es va evaporar posteriorment amb nitrogen gasós.
- El residu sec es va arreplegar amb 500  $\mu\text{L}$  del tampó d'assaig proporcionat pel *kit*.
- **Assaig**

Una dilució 1:100 de cada mostra va ser incubada en una placa de 96 pous. Durant aquest temps es produeix una competició entre la  $\text{PGE}_2$  continguda en les mostres problema i la  $\text{PGE}_2$ -acetilcolinesterasa ( $\text{PGE}_2$  marcada) –proporcionada pel *kit*– per una quantitat limitada de l'anticòs monoclonal anti- $\text{PGE}_2$ . Després de l'addició del substrat de l'acetilcolinesterasa (reactiu d'Ellman), s'origina una coloració groguenca com a resultat de la reacció enzimàtica, l'absorbància de la qual es va mesurar a 412 nm. La intensitat d'aquesta coloració és inversament proporcional a la quantitat de  $\text{PGE}_2$  lliure present a la mostra problema. Els valors d'absorbància van ser extrapolats a una recta patró realitzada a

partir de concentracions conegudes de PGE<sub>2</sub> i la quantitat de PGE<sub>2</sub> calculada es va referir al pes de teixit inicial emprat per a l'assaig.

### III.3.1.5. Producció de citocines

Les citocines són proteïnes secretades per les cèl·lules i, tant com proinflamatòries com antiinflamatòries, són les principals reguladores de la resposta immune local del teixit. Així doncs, la quantificació de citocines als teixits permet, d'una banda, avaluar el seu paper local en la salut i, d'altra banda, avaluar l'eficàcia terapèutica local de fàrmacs immunomoduladors.

#### – Extracció

Sovint, en mostres tissulars d'animals, es requereix l'ús d'un procés mecànic per a la disrupció de la complexa matriu extracel·lular. Una disrupció que sol anar precedida d'un procés químic de lisi cel·lular emprant una solució tamponada suplementada amb detergents i dirigida a enriquir la proteïna d'interès en l'extracte final. L'estructura química dels detergents permet trencar les membranes cel·lulars i solubilitzar les proteïnes.

Les mostres de còlon ja han patit prèviament un procés de disrupció mecànica amb la polvorització. A continuació, aquest es complementa amb l'homogeneïtzació de la mostra en una solució tamponada contenint diferents detergents en funció de l'origen de la proteïna buscada.

Per a l'extracció de citocines es segueix el model establert per Matalka *et al.* (2005). Inicialment, una mostra del teixit de còlon polvoritzat (15-20 mg) es va homogeneïtzar en PBS (dilució 1:5) contenint el detergent no iònic Igepal CA-630 al 0,1%. Per cada 10 mL de la solució

d'extracció es va addicionar un comprimit del còctel comercial d'inhibidors de proteases (Complete<sup>®</sup>).

Després de l'homogeneïtzació de les mostres amb un sonicador, es van mantenir en agitació a 4 °C durant un període mínim de 45 min i es van centrifugar a màxima velocitat durant 10 min. Al sobrenedant obtingut es va determinar el rendiment del procés extractiu per mitjà de la tècnica colorimètrica de Bradford (1976), emprant un patró de BSA. El colorant Blau Brillant de Coomassie G-250, contingut al reactiu de Bradford, reacciona amb les proteïnes presents en la mostra i genera canvis d'intensitat de coloració que poden ser mesurats entre 495 i 595 nm. Després d'afegir el reactiu a cada mostra (dilució 1:25, v/v), es va deixar un període d'incubació i es va determinar l'absorbància a 595 nm, que va ser interpolada en la recta estàndard de BSA per tal de determinar la concentració de proteïnes presents en cada mostra.

#### – Assaig

La tècnica d'ELISA o assaig per immunoabsorció lligat a enzim es fonamenta en la detecció d'un antigen immobilitzat sobre una fase sòlida per mitjà d'anticossos que, directa o indirectament, generen una reacció i al seu torn un producte, que pot ser mesurat espectrofotomètricament. Entre les diferents variants de la tècnica s'inclouen els mètodes *directes* o assajos simples de dos cares, els *indirectes* i els de tipus *sandwich* o de captura d'antigen i detecció per immunocomplexos.

A l'estudi, es van quantificar citocines presents a les mostres de teixit de còlon per la tècnica d'ELISA de tipus *sandwich* amb *kits* específics Ready-Set-Go!<sup>®</sup>, segons el següent esquema de treball:

1. Adsorció de l'anticòs de captura

- Es va incubar la placa de 96 pous (Corning® Costar® 9018) amb l'anticòs de captura durant tota la nit a 4 °C i es va rentar amb PBS contenint Tween®-20 al 0,05%.

2. Bloqueig

- La placa es va incubar 1 h en una solució d'assaig subministrada pel fabricant, constituïda per sèrum boví dissolt en PBS.

3. Preparació i incubació de les mostres

- El sobrenedant obtingut a partir de l'homogeneïtzat del teixit en tampó d'extracció es va diluir en funció de la citocina a estudiar.
- Després de rentar els pous es van afegir 50 µL de mostra diluïda per triplicat i es va incubar la placa amb una recta patró a partir d'un estàndard subministrat pel *kit*. El temps d'incubació de les mostres va estar influenciat per la citocina a avaluar.

4. Detecció

- Es va afegir l'anticòs de detecció conjugat amb biotina durant 1 h a temperatura ambient.
- Després d'un rentat es va afegir la solució d'HRP-avidina durant 30 min.
- Després d'un rentat més intens es va afegir TMB, el substrat cromogènic de la peroxidasa, que s'oxida durant un període màxim de 15 min i origina un producte blau que torna el medi del mateix color.

- A continuació, la detenció de la reacció amb àcid sulfúric ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2 N induïa un canvi en la coloració cap a groc, que va ser quantificat a 450 nm. A aquests valors d'absorbàncies se'ls van restar els valors de la lectura a 570 nm, amb la finalitat d'evitar possibles interferències al medi.

### **III.3.1.6. Quantificació de l'expressió proteica per electroforesi i Western Blot**

La tècnica de Western blot, descrita per primera vegada per Towbin *et al.* en 1979, és àmpliament emprada per a la detecció i identificació de proteïnes específiques en una mostra biològica. Aquesta especificitat s'aconsegueix amb l'ús d'un anticòs que reconeix i s'uneix a un epítop específic de la proteïna d'interès. Aquesta tècnica consta de les següents fases:

#### **– Extracció i solubilització de les proteïnes**

Una mostra del teixit del còlon polvoritzat es va dissoldre en un tampó de lisi A (dilució 1:15, p/v) (àcid 4-[2-hidroxietil]-1-piperazinetanosulfònic [HEPES] 10 mM pH 7,8, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, ditiotretol [DTT] 0,5 mM, EDTA 0,1 mM pH 8, fluorur de metilsulfoni [PMSF] 0,5 mM, NaF 20 mM,  $\text{Na}_2\text{VO}_4$  1 mM, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'aprotinina, leupeptina i pepstatina A) i va ser suplementat amb una mescla comercial d'inhibidors de proteases a raó d'un comprimit cada 10 mL de solució tampó. Les mostres d'orelles, per la seua mida, es van emprar senceres per a l'extracció proteica, únicament realitzant un pas previ de disrupció mecànica del teixit amb un Polytron®.

Les mostres es van homogeneïtzar per ultrasons mantenint-les en gel en tot moment. A continuació, es va addicionar el detergent no iònic Igepal CA-630 (0,5%, v/v) i es va incubar en gel durant 45 min amb agitació suau. Després d'aquest temps es van centrifugar (10 min/4 °C/2.700×g) i el sobrenedant amb la fracció citosòlica es va conservar a -80 °C.

El precipitat resultant es va processar per a l'obtenció de la fracció nuclear. Es va suspendre en 250 µL de tampó de lisi B (HEPES 50 mM, KCl 50 mM, NaCl 300 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) i es va incubar en gel 1 h amb agitació suau. Finalment es va centrifugar (15 min/ 4 °C/ 20.800×g) i el sobrenedant amb la fracció proteica nuclear es va conservar a -80 °C fins al seu ús.

La proteïna purificada al sobrenedant d'ambdues fraccions es va quantificar per la tècnica de Bradford (veure apartat III.3.1.5), i es va referir la quantitat de proteïna al pes de teixit emprat.

#### – **Electroforesi**

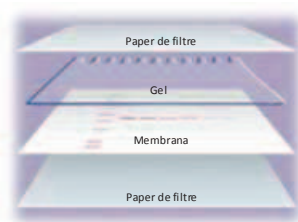
L'electroforesi és una tècnica que implica la separació de partícules carregades per migració en un camp elèctric. Un dels mètodes d'electroforesi més emprat per a proteïnes és el que utilitza gels de poliacrilamida. Aquests gels són el resultat de la polimerització química d'una mescla d'acrilamida i bisacrilamida. Controlant la concentració de la mescla s'obtenen gels de diferent grau de porositat i, per tant, diferents intervals de separació de proteïnes. Així, la tècnica d'electroforesi vertical en gel de poliacrilamida (PAGE) permet sotmetre les proteïnes a condicions desnaturalitzats per mitjà d'un agent reductor com DTT o β-mercaptoetanol, el qual trenca els enllaços intra- i intermoleculars de la

proteïna fent-la perdre la seua estructura secundària i terciària. Com a conseqüència, el dodecilsulfat sòdic (SDS) pot cobrir les proteïnes en proporció constant i fer que quede la càrrega emmascarada per les múltiples molècules de SDS, fet que torna la seua càrrega neta negativa i afavoreix la seua migració cap a l'elèctrode positiu, la qual cosa determina la taxa de migració en funció del pes molecular.

A l'estudi es va emprar la tècnica SDS-PAGE en condicions desnaturalitzats i de reducció. Inicialment es va preparar la mostra en un tampó de càrrega contenint SDS en presència de l'agent reductor DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### – Immunotransferència

La immunotransferència (*immunoblotting* o *western blot*) es la transferència de les proteïnes a una membrana o suport sòlid que les immobilitza per tal de facilitar la unió de l'anticòs. Es van utilitzar membranes de poli(fluorur de vinilidè) (PVDF) amb una gran capacitat d'unir biomolècules. Al ser membranes de caràcter hidròfug requereixen un pas previ "d'activació" per incubació d'uns pocs segons en metanol. Es van transferir les proteïnes a la membrana per electrotransferència humida, emprant un tampó amb Tris, glicina i metanol al 20% i on s'embeuen el gel i la membrana muntats com es mostra a continuació:



**Figura III.8.** Esquema de muntatge del gel i la membrana

La membrana té una gran afinitat per les proteïnes, el que ofereix un important avantatge alhora de realitzar la transferència. No obstant això, cal tenir en compte, que els processos posteriors impliquen la incubació amb anticossos (que també són proteïnes). Per tal d'evitar possibles unions inespecífiques de l'anticòs i impedir el risc associat de tenir un elevat *background* o falsos positius, es bloqueja la membrana incubant-la en solucions de proteïnes, com la llet descremada en pols o la BSA. L'ús de la llet descremada és més rendible que el de BSA, en canvi, degut a la presència de biotina en les fosfoproteïnes de la llet, l'ús de BSA és fa necessària per a anticossos fosfoespecífics o mètodes de detecció de biotina.

#### – Immunodetecció

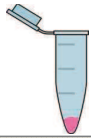
A continuació, el sistema de revelat que detecta de forma específica les proteïnes sobre la membrana, és el sistema d'immunodetecció indirecta. Un anticòs primari reconeix una xicoteta seqüència d'aminoàcids (epítop) de la proteïna d'interès, la qual ha quedat exposada després d'eliminar l'estructura tridimensional en les condicions anteriorment descrites, i el següent anticòs (secundari) s'uneix al primari. L'anticòs secundari està normalment conjugat amb l'enzim HRP, que catalitza l'oxidació de luminol en presència de  $H_2O_2$  i dona 3-aminoftalat en estat excitat, el qual al passar a un estat de energia menor, emet fotons que són captats pel sistema de captura digital d'imatges LAS 3000 mini (Fujifilm), i posteriorment quantificats per anàlisi densitomètrica. La densitat òptica calculada per a cada proteïna es va comparar amb la corresponent al control de càrrega emprat, bé  $\beta$ -actina, bé poli (ADP-



ribosa) polimerasa (PARP-1), bé gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH).

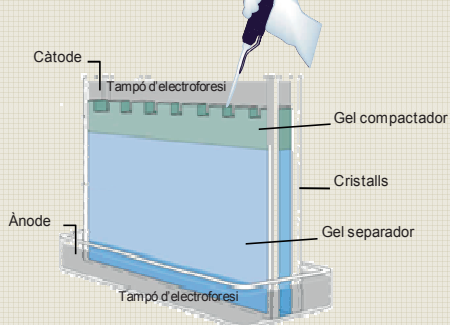
– Assaig

Preparació de la mostra:



20-40 µg proteïna + tampó de càrrega (Thermo Scientist) (1:5)  
**Condicions:** 99 °C/ 5 min

**Electroforesi:**



**COMPOSICIÓ GELS**

	Gel compactador (5% acrilamida)	Gel separador (10% acrilamida)
<b>Solució acrilamida/bis-acrilamida</b>	330 µL	3,3 mL
<b>1 M Tris Base pH 6,8</b>	250 µL	2,5 mL
<b>SDS al 10%</b>	20 µL	100 µL
<b>Persulfat amònic al 10%</b>	20 µL	100 µL
<b>TEMED (Tetrametilendiamina)</b>	2 µL	4 µL
<b>Aigua (c.s.p.)</b>	2 mL	10 mL

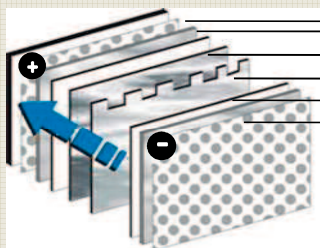


**Condicions electroforesi:**  
 200 V  
 400 mA  
 40 min

**Tampó d'electroforesi vertical 10x**

Tris base	30,3 g
Glicina	144,0 g
SDS	10,0g
Aigua (c.s.p.)	1 L

**Immunotransferència:**



Esponja  
 Paper de filtre  
 Membrana PVDF  
 Gel  
 Paper de filtre  
 Esponja



**Condicions Immunotransferència:**  
 4 °C  
 100 V  
 350 mA  
 120 min

**Activació de la membrana:**

Metanol (10")



Aigua (5')



Tampó de transferència 4 °C

**Tampó de transferència 10x**

Tris base	30,3 g
Glicina	144,0 g
Aigua (c.s.p.)	1 L
<i>Per a preparar tampó de transferència 1x afegir metanol al 20%.</i>	

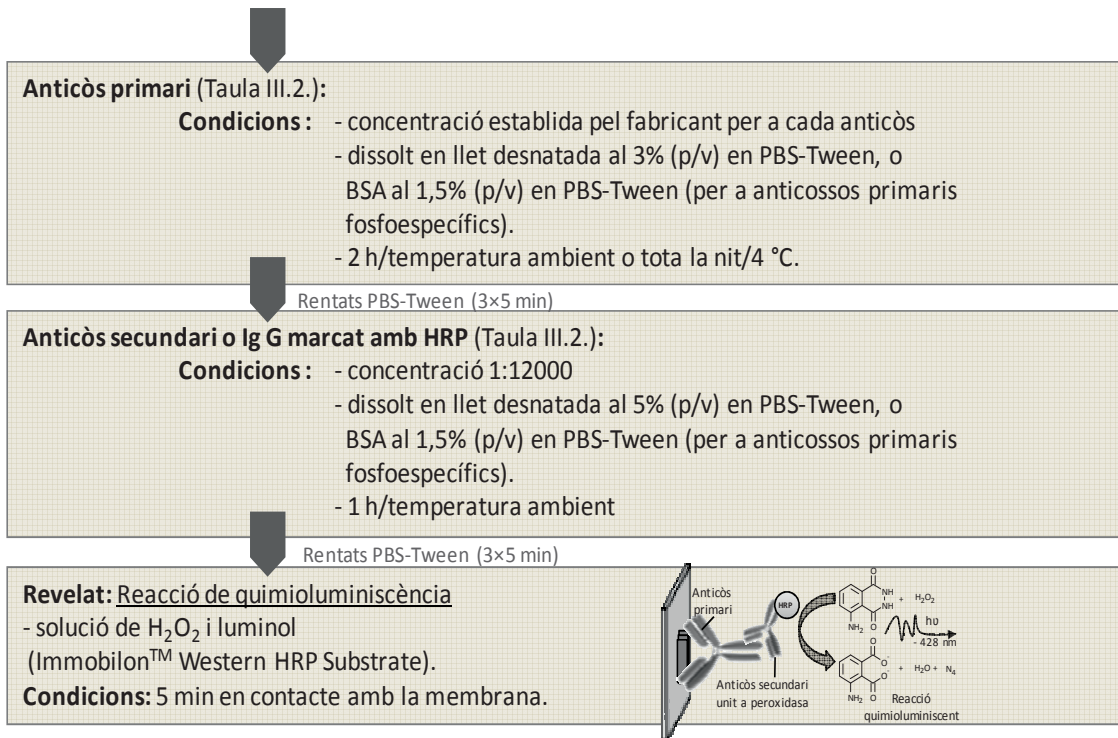
**Bloqueig:**

**Condicions:** 2 h/temperatura ambient

**Solucions de bloqueig:**

- Llet desnatada al 6% (p/v) diluïda en tampó PBS-Tween al 0,1% (v/v), o
- BSA al 3% (p/v) diluïda en PBS-Tween (per a anticossos primaris fosfoespecífics).

Rentats PBS-Tween (3x5 min)



**Figura III.9.** Esquema del protocol de detecció de proteïnes per Western blot

### III.3.1.7. Quantificació de l'expressió gènica per retrotranscripció i reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR), concebuda per primera vegada per Kary Mullis (1986), és àmpliament emprada en l'actualitat per a sintetitzar i amplificar, *in vitro*, seqüències específiques de nucleòtids dels quals, sols un xicotet nombre de còpies, estan presents en una mostra biològica determinada. Emprant aquesta tècnica junt amb l'assaig de transcripció inversa o retrotranscripció (RT) –aquesta última permet la conversió d'una seqüència d'ARN determinada en el seu ADN complementari (ADNc)– es pot detectar la presència d'un transcrit particular en una mostra d'ARN prèviament processada.

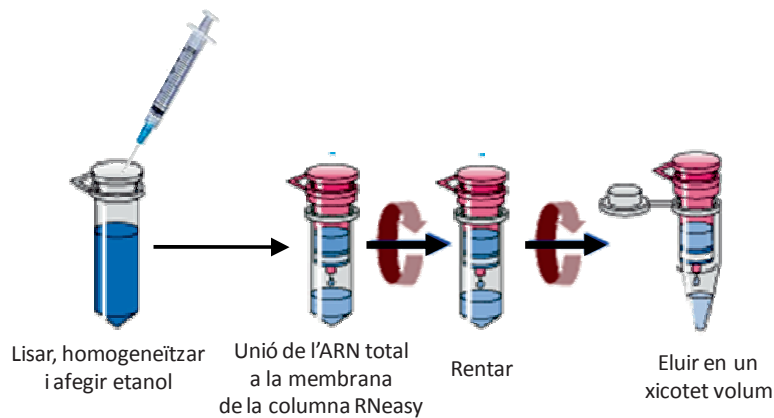
A l'estudi, es va emprar la tècnica citada per a la determinació de l'expressió gènica de citocines proinflamatòries a la mucosa del còlon dels animals inclosos en l'estudi de CU.

### – Extracció d'ARN total

Les mostres de còlon destinades a l'extracció d'ARN van ser prèviament polvoritzades en un morter, sempre intentant mantenir la temperatura de congelació per tal d'assegurar la completa integritat de l'ARN al teixit. A continuació, es va homogeneïtzar la mostra (20-30 mg) en tampó RLT (*RNeasy® Mini kit*) contenint 10 µL/mL de β-mercaptoetanol, fent passar la mescla a través d'agulles de diferents calibres per tal de reduir la viscositat dels lisats. Una incompleta homogeneïtzació dona lloc a una ineficient extracció de l'ARN a la membrana de la columna *RNeasy spin* (subministrada pel fabricant) el que resulta en un reduït rendiment de la tècnica. Per tant, una lisi i homogeneïtzació eficient del material d'inici és un requisit absolut per tal de continuar amb el procés de purificació de l'ARN total.

A continuació, es va procedir segons les indicacions del fabricant, afegint etanol, necessari per a la selectiva unió de l'ARN a la membrana, i realitzant successius passos de rentat i centrifugació, fent passar la mostra a través de la columna per tal d'eliminar possibles contaminants que pogueren interferir al procés. L'eluat final es va recollir en aigua lliure d'ARNases i en una dilució 1:250 es va determinar la concentració d'ARN mesurant l'absorbància a 260 nm en un espectrofotòmetre *Biophotometer®*, tenint en compte que 1 unitat d'absorbància a esta longitud d'ona correspon a 40 µg d'ARN per mL. Es pot conèixer, a més, la puresa de l'ARN obtingut estimant el quocient entre els valors d'absorbància a 260 i 280 nm; un valor pròxim a 1,6-2 és indicatiu de la tinença d'un ARN d'una puresa acceptable. En tot moment, els

experiments es van realitzar en condicions lliures d'ARNases i l'ARN purificat es va congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins el seu ús.



**Figura III.10.** Esquema representatiu del procés d'obtenció d'ARN total a partir d'una mostra de teixit (Quiagen®).

### – Transcripció inversa o retrotranscripció (RT)

L'ARN extret de les mostres de teixit va ser transformat en ADNc per RT. Es va mesurar un volum de mostra que contenia entre 0,5 i 1  $\mu\text{g}$  d'ARN i es va iniciar la síntesi d'ADN afegint una mescla dels següents encebadors:

- 500 ng d'encebador Oligo(dT)<sub>15</sub>: conté nucleòtids dT i hibrida amb la cadena complementària de nucleòtids dA presents a l'extrem de les molècules d'ARNm (cola poli A).
- 125 ng d'encebador hexamèric aleatori (Roth Hexanucleotide Random Primer Mix): conté totes les possibles combinacions de nucleòtids dA, dG, dC i dT, i s'hibrida a la seqüència complementària corresponent en l'ARN cel·lular.

Per tal que els encebadors s'hibriden amb la cadena d'ARNm i engeguen la transcripció, es requereix un increment de la temperatura

fins a 65 °C durant 5 min. A continuació, es van addicionar els components del sistema *AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase* fins un volum final de 6 µL per mostra:

- Tampó *Affinity Script RT* contenint Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM i MgCl<sub>2</sub> 3 mM.
- DTT 10 mM.
- 300 U de Transcriptasa inversa del virus de la leucèmia murina de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus reverse Transcriptase*, M-MLV RT).
- 1 mM de cada deoxinucleòsid trifosfat (dNTP) continguts al preparat dNTP mix.

El manteniment d'una temperatura de 42 °C durant 1 h va permetre iniciar la síntesi d'ADNc després de l'activació de la transcriptasa inversa. A continuació, l'augment de la temperatura fins a 73 °C durant 15 min va interrompre l'acció de l'enzim per desnaturalització.

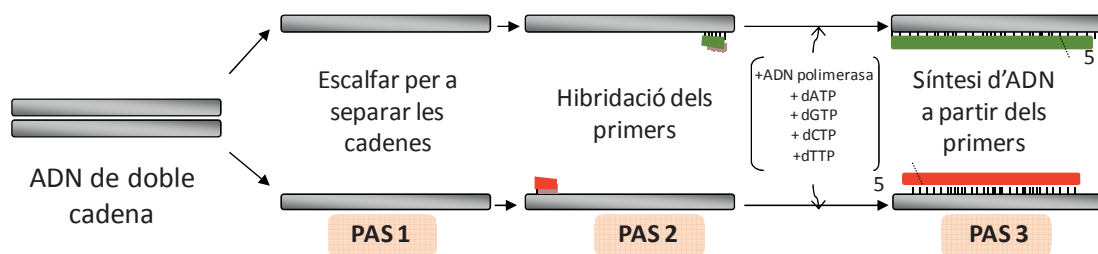
#### – **Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

Per a la determinació de l'expressió gènica per PCR es van seguir les instruccions del sistema *RedTaq®ReadyMix™ PCR Reaction Mix*, consistent en una sèrie de cicles de tres reaccions successives cada cicle (Figura III.11):

1. Desnaturalització: L'ADN diana s'incuba a temperatura elevada (94 °C), el que permet la separació de les cadenes, que queden accessibles a la hibridació dels encebadors.
2. Etapa d'hibridació o alineament: Amb una menor temperatura (55 – 65 °C) es permet la hibridació

específica de la cadena sencilla amb l'oligonucleòtid encebador.

3. Etapa d'extensió o elongació de l'encebador: A 72 °C es produeix la replicació de la cadena sencilla per una *Taq* ADN polimerasa a partir de l'oligonucleòtid encebador. Es va emprar, a l'estudi, una polimerasa estable al calor, la qual s'estén eficientment amb aquesta temperatura i no es veu afectada per l'elevada temperatura de la desnaturalització.



**Figura III.11.** Reacció en cadena de la polimerasa, evidenciant els tres passos senzills de la metodologia.

Les reaccions es van ajustar a un volum de 25 µL incloent:

- 1 µL d'ADNc
- 12,5 µL de *REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix*: TrisHCl 20 mM (pH 8,3), KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, gelatina al 0,002%, mescla dNTP 0,4 mM, estabilitzadors i 0,06 U/µL de *Taq* ADN polimerasa
- encebadors complementaris (0,5 µM) (Taula III.4)
- aigua

En presència de la polimerasa i dels quatre dNTPs precursors de l'ADN (dATP, dCTP, dGTP i dTTP), els encebadors inicien la síntesi de noves cadenes d'ADNc a la cadena d'ADN individual del segment d'ADN diana.

L'ADNc es va amplificar fent ús del termociclador, programant el temps i la temperatura de cadascuna de les fases:

- activació de la polimerasa (95 °C-10 min)
- desnaturalització de la doble cadena (95 °C-1 min)
- hibridació dels encebadors (55 °C)
- extensió de la cadena (72 °C-1 min).

Per a tots els encebadors emprats, el programa PCR requeria 30 cicles d'amplificació, excepte per a  $\beta$ -actina, que requeria 33.

**Taula III.4.** Descripció dels encebadors assajats.

<b>Nom del gen</b>	<b>Seqüència (5'-3')</b>
<b>IL-6</b>	ATGCTGGTGACAACCACGGCC GGCATAACGCACTAGGTTTGCCGA
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	AGCCACGT CGTAGCAAACCAC TAGACGTGCCCGGACT CCGC
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	GCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGCA AGCGACCTGTCTTGCCGAGG
<b>VCAM-1</b>	TCGCGGTCTTGGGAGCCTCA TGACCGTGACCGGCTTCCCA
<b><math>\beta</math>-actina</b>	GCAGAGCAAGAGAGGCATCC CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG

– **Electroforesi en gel d'agarosa**

Entre 10-20  $\mu$ L dels productes amplificats van ser examinats per electroforesi horitzontal en gel d'agarosa a l'1% contenint bromur d'etidi com a colorant fluorescent (0,1%, v/v) en tampó d'electroforesi TAE 1X (Tris-acetat 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), a 100 V durant 30 min. Les bandes fluorescents van ser visualitzades per transil·luminació (transil·luminador LAS 3000 mini). La imatge del gel va ser obtinguda amb el sistema de càmera digital del transil·luminador i es va analitzar pel programa associat Multi-Gauge v2.0.

### **III.3.2. EN MOSTRES PLASMÀTIQUES**

#### **III.3.2.1. Obtenció de la mostra de sang**

Abans de sacrificar els ratolins procedents de les experiències de CU aguda es va procedir amb l'extracció d'una mostra de sang per punció cardíaca practicada al ratolí anestesià amb isoflurà per via inhalatòria. L'isoflurà és un agent anestèsic que actua en pocs minuts induint una depressió cardiorespiratòria en l'animal.

#### **III.3.2.2. Determinació de la producció de citocines**

Per a la determinació de la producció de la citocina proinflamatòria TNF- $\alpha$  al sèrum aïllat de la sang dels animals, es va emprar la tècnica d'ELISA tipus *sandwich* amb *kits* específics d'ELISA, Ready-Set-Go!<sup>®</sup>.

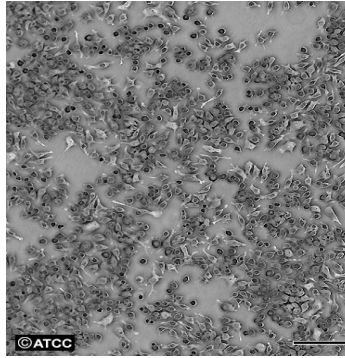
Per a l'aïllament del sèrum, les mostres sanguínies van ser sotmeses a una centrifugació de 1500 $\times$ g durant 5 min a 4 °C. A continuació, es van emprar 100  $\mu$ L de sèrum i es va procedir amb la tècnica d'ELISA segons es descriu a l'apartat III. 3.1.5.

### **III.4. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIINFLAMATÒRIA *IN VITRO***

#### **III.4.1. CULTIU DE MACRÒFAGS RAW 264.7**

Per a l'estudi, es va emprar la línia cel·lular de macròfags RAW 264.7 adquirida de la Col·lecció Europea de Cultius Cel·lulars (*European Collection of Cell Cultures*, ECACC, Salisbury, GB) i proporcionada per la unitat de cultius cel·lulars del SCSIE. Es tracta de cèl·lules derivades d'un tumor desenvolupat en un ratolí Balb/C inoculat amb el virus de la leucèmia Abelson (A-MuLV) (Figura III.12).





**Figura III.12.** Macròfags RAW 264.7 ([www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org)).

Els cultius de macròfags RAW 264.7 es van expandir i es van mantenir en medi DMEM GlutaMAX<sup>TM</sup> (1 g/L glucosa) suplementat amb 10% de SFB i 1% d'antibiòtics (100 U/mL penicil·lina i 100 µg/mL estreptomicina). Les cèl·lules van ser sempre incubades sota condicions controlades a l'incubador cel·lular a una temperatura de 37 °C i una atmosfera d'aire humidificat amb un contingut del 5% en CO<sub>2</sub>. Cada 2-3 dies, o quan s'observava una subconfluència cel·lular del 70-80% al flascó de cultiu, se'ls canviava el medi de forma mecànica amb l'ajuda d'un raspador; en aquest punt, les cèl·lules seguien cultivant-se, per successius subcultius en proporció 1:3 o 1:6, o es recol·lectaven i es sembraven en una placa de 24 o 96 pous a raó de  $7 \times 10^5$  i  $3 \times 10^5$  cèl·lules/mL, respectivament, en funció dels següents experiments a realitzar.

#### **III.4.1.1. Tractaments**

En funció de la solubilitat del compost a assajar (apocinina, diapocinina i rutina), es van preparar dissolucions mare en DMSO o una mescla DMSO/PBS a concentracions entre 50 i 100 mM. Sempre tenint en compte que la concentració final de DMSO mai superara el 0,4% al medi de cultiu. Les concentracions finals assajades van ser de 100 i 400 µM. Amb la finalitat d'avaluar l'efecte antioxidant i/o antiinflamatori dels compostos en estudi, es va emprar com estímul cel·lular LPS, una

endotoxina que, per mitjà d'una potent activació dels macròfags, indueix la producció de mediadors implicats en la cascada inflamatòria, com són els productes intermedis de l'oxigen i del nitrogen, les PGs i les citocines.

El pla de treball va seguir sempre un mateix esquema:

- Es van sembrar les cèl·lules en medi DMEM suplementat amb SFB al 10% i antibiòtics.
- Després de 24 h d'incubació (37 °C i 5% atmosfera de CO<sub>2</sub>), es va substituir el medi per medi DMEM suplement amb SFB al 0,5% i antibiòtics, i es van afegir els compostos en estudi a la concentració desitjada.
- Després d'1 h es van estimular les cèl·lules amb LPS (1 µg/mL), a excepció dels pous considerats com el *grup blanc*.
- Es van incubar en atmosfera controlada.

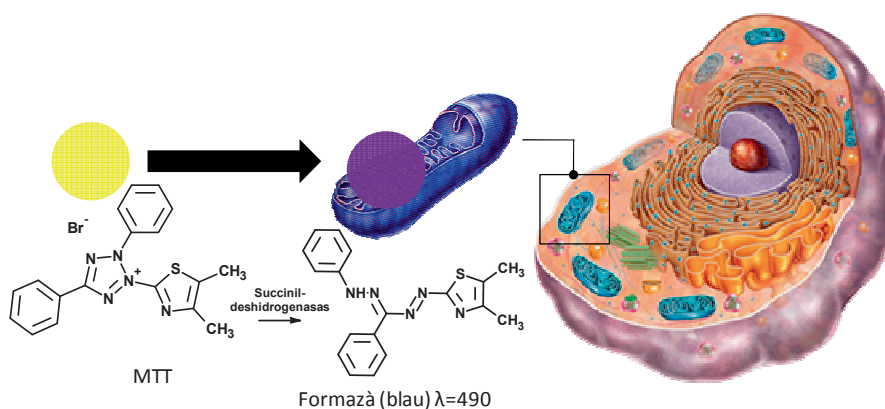
Tots els experiments portats a terme van estar constituïts pels següents grups cel·lulars:

- *grup blanc*: no rebia cap estímul ni tractament
- *grup control*: tan sols rebia l'estímul LPS
- *grup vehicle*: rebia l'estímul LPS junt amb la concentració màxima de vehicle emprat a l'estudi.
- *grups problema*: rebia el tractament amb els productes en estudi i l'estímul LPS.

#### **III.4.1.2. Assaig de proliferació i citotoxicitat**

Per tal d'avaluar el possible efecte citotòxic dels compostos en estudi sobre la línia cel·lular emprada, es va fer ús del mètode colorimètric desenvolupat per Mosmann (1983) i fonamentat en la determinació de la funcionalitat mitocondrial de les cèl·lules tractades.

En presència de l'enzim mitocondrial succinat-deshidrogenasa es produeix la reducció metabòlica del bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazoli (MTT) produint-se el corresponent formazà, un compost insoluble en aigua i de color blau, la concentració del qual pot ser quantificada espectrofotomètricament, sent aquesta directament proporcional al nombre de cèl·lules metabòlicament actives (Figura III.13).



**Figura III.13.** Imatge representativa de l'assaig de proliferació i citotoxicitat per MTT.

Les cèl·lules van ser sembrades en plaques de 96 pous a raó de  $3 \times 10^5$  cèl·lules/mL i tractades amb apocinina, diapocinina i rutina a diferents concentracions. Després de 24 h, es va substituir el medi per 100  $\mu$ L d'una solució de MTT (0,5 mg/mL PBS) i es va incubar la placa a 37 °C fins que s'observaren els cristalls blaus del formazà. A continuació, es va substituir el sobrenedant per 100  $\mu$ L de DMSO, per a dissoldre els cristalls, i es va mesurar l'absorbància a 490 nm.

El percentatge de viabilitat cel·lular es va determinar utilitzant la següent fórmula:

$$\% \text{ Viabilitat cel·lular} = \frac{\bar{A}_p}{\bar{A}_c} \times 100$$

Sent,  $\bar{A}_p$  la mitjana aritmètica dels valors d'absorbància corresponents al problema, i  $\bar{A}_c$  la mitjana aritmètica dels valors d'absorbància del grup control.

### **III.4.1.3. Determinacions bioquímiques**

#### **III.4.1.3.1. Producció de NO**

D'acord amb l'esquema descrit a l'apartat III.4.1.1., els macròfags van ser tractats amb apocinina, diapocinina i rutina en un rang de concentracions i, 1 h després, van ser estimulats amb LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Després de 24 h d'incubació es van fer reaccionar 100  $\mu\text{L}$  del medi de cultiu amb un mateix volum de reactiu de Griess. Després de 10 min es va determinar espectrofotomètricament l'absorbància a 540 nm, que va ser interpolada en la recta estàndard de nitrit sòdic.

#### **III.4.1.3.2. Producció de PGE<sub>2</sub>**

La quantitat de PGE<sub>2</sub> produïda pels macròfags en presència o absència de diapocinina va ser mesurada fent ús del *kit* comercial *Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA kit-Monoclonal*.

El medi de cultiu procedent dels macròfags tractats segons l'esquema de l'apartat III.4.1.1. amb diapocinina a diferents concentracions (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) va ser recollit després de 24 h d'estimulació amb LPS. A continuació, una dilució 1:10 de cada mostra en tampó d'assaig proporcionat pel *kit* va ser emprat per a portar a terme la tècnica (veure apartat III.3.1.4.).

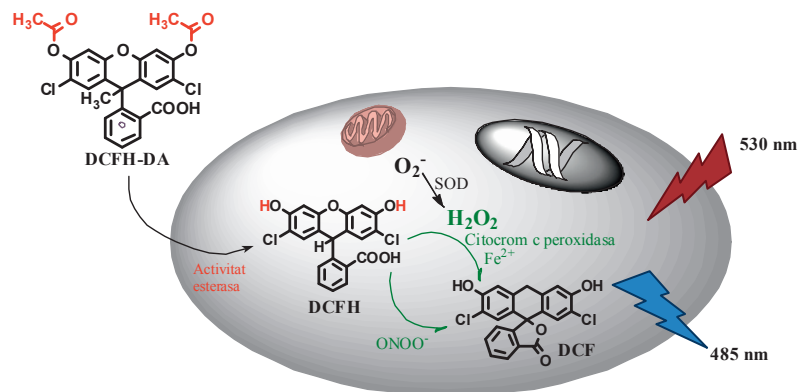
### III.4.1.3.3. Formació intracel·lular d'EROs

Les EROs són generades a l'organisme de forma controlada, exercint un paper crític en l'eliminació de microorganismes i en les funcions de senyalització com a reguladors de cèl·lules immunes reactives i moduladores de processos d'apoptosi. No obstant això, una sobreproducció d'EROs o una insuficient activitat de les defenses antioxidants poden tenir efectes perjudicials causant dany de molècules essencials com lípids, proteïnes o ADN.

Per tal d'avaluar l'activitat antioxidant dels productes en estudi, es va valorar l'efecte sobre la producció intracel·lular d'EROs en macròfags, segons descriuen Burk *et al.*(2009) amb algunes modificacions, per mitjà del marcador diacetat de 2',7'-diclorofluoresceïna (DCFH-DA). Aquest colorant és un compost no polar estable que difon ràpidament a l'interior cel·lular (Figura III.14), on els grups acetat són eliminats per acció de les esterases i donen lloc al compost polar i sense fluorescència la 2',7'-diclorodihidrofluoresceïna (DCFH), la qual és retinguda a l'interior cel·lular. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracel·lular i altres peròxids de baix pes molecular, en presència de peroxidases, oxiden la DCFH a un compost de major fluorescència, la 2',7'-diclorofluoresceïna (DCF). D'aquesta manera, la intensitat de la fluorescència és proporcional a la quantitat de peròxids produïts per les cèl·lules.

Les cèl·lules van ser sembrades en plaques de 24 pous a raó de  $7 \times 10^5$  cèl·lules/mL i es va procedir segons l'esquema descrit (veure apartat III.4.1.1.). Després de tractar-les amb els compostos a diferents concentracions (100 i 400  $\mu$ M) i estimular amb LPS (1  $\mu$ g/mL), es van incubar durant 24 h a 37 °C. Després de rentar amb medi DMEM al 0,5%

SFB i es van afegir 500  $\mu\text{L}$  de DCFH-DA 20  $\mu\text{M}$  dissolt al mateix medi i preparat a partir d'una dilució mare de DCFH-DA 5 mM en DMSO. Després de 25 min d'incubació es va realitzar un rentat amb PBS i es va mesurar la intensitat de fluorescència al medi a les longituds d'ona de 530 nm ( $\lambda_{\text{emissió}}$ ) i 485 nm ( $\lambda_{\text{excitació}}$ ).



**Figura III.14.** Mecanisme d'acció de DCFH-DA

#### III.4.1.3.4. Producció de citocines

El sobrenedant del cultiu de macròfags tractats amb apocinina, diapocinina i rutina a diferents concentracions (100 i 400  $\mu\text{M}$ ), segons s'indica prèviament (veure apartat III.4.1.1), es va emprar per a la determinació de citocines inflamatòries.

Després de 24 h d'incubació amb LPS, el sobrenedant es va diluir en funció de la citocina a determinar i es va emprar la tècnica d'ELISA per quantificar les diverses citocines al medi cel·lular (apartat III.3.1.5.)

#### III.4.1.3.5. Quantificació de l'expressió proteica per Western blot

L'anàlisi de l'expressió proteica en macròfags RAW 264.7 es va realitzar per Western blot emprant la tècnica SDS-PAGE descrita a l'apartat III.3.1.6. Prèviament, es van sembrar les cèl·lules a raó d' $1 \times 10^6$  cèl·lules/mL en plaques de 6 pous (1,5 mL per pou) i es van tractar amb els

productes en estudi (apocinina, diapocinina i rutina) a les concentracions de 100 i 400  $\mu$ M segons s'explica a l'apartat III.4.1.1.

Després de diferents temps d'incubació amb l'estímul, en funció de la proteïna que es volgués determinar (Taula III.5), les cèl·lules es van recollir en 1,5 mL de PBS amb l'ajuda d'un raspador, es van centrifugar a 250 $\times$ g durant 5 min a 4 °C i es van processar per a l'extracció proteica, segons es tractara de proteïna total o citosòlica i nuclear per separat.

**Taula III.5.** Temps d'estímul cel·lular segons la proteïna a determinar.

Proteïna a determinar	Temps d'estímul
COX-2	24 h
iNOS	24 h
p65	1 h
I $\kappa$ B $\alpha$ / p-I $\kappa$ B $\alpha$	30 min

#### – Extracció proteica

Per a l'obtenció de proteïna total, el *pellet* obtingut de la centrifugació del medi de cultiu es va suspendre en 100  $\mu$ L de tampó Laemmli (Tris 1 M [pH 6.8], SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10%, blau de bromofenol 4%) i es va homogeneïtzar per ultrasons en 5 cicles de 10 s. Finalment, es va portar a ebullició 5 min i es va centrifugar a velocitat màxima durant 15 min a 4 °C.

Per a l'obtenció de les fraccions citosòlica i nuclear es va emprar el *kit ProteoJET™ Cytoplasmic and nuclear Protein Extraction* seguint les instruccions del fabricant. El *pellet* de cèl·lules contingudes en PBS es va suspendre en 80  $\mu$ L de *Cell lysis buffer* proporcionat al *kit*, prèviament suplementat amb DTT 1 mM, un còctel comercial d'inhibidors de proteases (Complete®), NaF 25 mM i Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM. Després de romandre en gel durant 10 min, es van centrifugar les mostres (500 $\times$ g/7 min/4 °C)

per a l'obtenció de la fracció citoplasmàtica continguda al sobrenedant recollit. La fracció nuclear es va obtenir a continuació dissolvent de nou el *pellet* en *Nuclei Washing buffer* (proporcionat en el *kit*) suplementat de la mateixa forma que l'anterior tampó esmentat. El sobrenedant obtingut després de la centrifugació (500×g/7 min/4 °C) es va eliminar i el *pellet* es va suspendre en *Nuclei storage buffer* (proporcionat en el *kit*) suplementat de la mateixa forma. Finalment, es va afegir un volum 1:10 de *Nuclei lysis reagent* i es va mantenir en agitació durant 15 min a 4 °C. El producte resultant es correspon amb la fracció nuclear. Ambdues fraccions es van conservar a -80 °C fins al seu ús.

### III.5. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Per a l'anàlisi estadística es va emprar el paquet estadístic GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc.). Els resultats van ser expressats com la mitjana aritmètica dels valors ± error estàndard (E.E.M.) per a les diferents determinacions obtingudes de les  $n$  mostres. La valoració estadística de l'efecte dels tractaments es va realitzar per l'anàlisi de variància (ANOVA) d'una o dos vies seguit dels tests post hoc de la  $t$  de Dunnett o el test de Bonferroni, respectivament, per a comparacions múltiples.

Un valor de  $p < 0,05$  va permetre rebutjar la hipòtesi nul·la d'igualtat entre els valors comparats, i per tant considerar les diferències obtingudes com a estadísticament significatives. La següent simbologia emprada a l'estudi representa la significació estadística donada per un anàlisi ANOVA seguida del test de la  $t$  de Dunnett o el test de Bonferroni:

- respecte al grup control: \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .





## IV. RESULTATS

---



## IV.1. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIINFLAMATÒRIA *IN VIVO*

Previ a l'inici de les experiències *in vivo* es van plantejar diferents alternatives respecte a la via d'administració dels productes en estudi. Per la seua aproximació al que ocorre amb la ingesta habitual d'aquests tipus de compostos, l'administració per via enteral va ser l'opció escollida, on es produeix l'absorció de substàncies de forma natural a l'intestí. Dins de la via enteral, es va poder comprovar que els animals sofrien una situació estressant amb l'administració forçada per mitjà d'una cànula, la qual cosa podia empitjorar la malaltia. Per contra, es va observar que la suplementació dels productes en estudi en l'aliment no suposava cap inconvenient alhora de la ingesta per part de l'animal.

Així, es va portar a terme una primera experiència on els animals van ser destinats a l'avaluació de l'efecte dels productes sense tractament amb DSS. Després de 7 dies de lliure ingesta d'aliment suplementat amb àcid el·làgic, apocinina o rutina (2%) i aigua, els animals no van mostrar cap signe d'agreujament respecte al grup blanc, alimentat amb el pinso sense suplementar, com es va poder observar amb el control diari del pes dels animals i de la ingesta d'aigua i pinso. A més, l'estudi macroscòpic del còlon va evidenciar que el tractament tampoc suposava cap efecte a nivell intestinal que poguera influenciar en l'evolució de la malaltia (Taula IV.1). Amb açò, es va concloure que els productes en sí no alteraven o induïen cap efecte danyós als animals.

**Taula IV.1. Efecte d'àcid el·làgic, apocinina i rutina suplementats en la dieta (2%) sobre la longitud del còlon en ratolins Balb/C.** *ns*: no significativament diferent del grup blanc (*t* de Dunnett, *n* = 6-8).

Grup	Longitud del còlon ± E.E.M. (cm)
Blanc	9,8 ± 0,8
Àcid el·làgic	9,3 ± 0,3 <sup>ns</sup>
Apocinina	9,4 ± 0,1 <sup>ns</sup>
Rutina	9,4 ± 0,4 <sup>ns</sup>

#### IV.1.1. COLITIS ULCEROSA AGUDA INDUÏDA PER DSS

Durant el transcurs de cadascuna de les experiències de colitis, es va comprovar que la ingesta d'aigua i beguda dels animals inclosos a l'estudi no diferia entre els grups. D'una banda, en el model de CU agut, va resultar un consum mitjà diari d'uns 7 mL d'aigua amb DSS per ratolí, el que es corresponia amb una ingesta diària d'uns 350 mg de DSS per ratolí. D'altra banda, amb la quantitat total de pinso ingerit, va resultar una dosi mitjana consumida dels productes en estudi d'uns 4,24 g/kg/d (4,25, 4,12, 4,34 g/kg/d d'àcid el·làgic, apocinina i rutina, respectivament), la qual equival a una dosi en humans d'uns 300 mg/kg/d aproximadament, segons la fórmula de DEH descrita a l'apartat III.2.2.1.2.

##### IV.1.1.1. Estudi de paràmetres clínics: Índex d'activitat de la malaltia (IAM)

En el model agut de CU, l'exposició dels ratolins a DSS va induir els signes clínics característics de la malaltia. Un prominent signe és una reducció gradual del pes inicial de l'animal. A partir del quart dia d'iniciat el tractament amb DSS, al grup control es feia evident una marcada reducció del pes corporal respecte al grup blanc de l'estudi, aconseguint un 18% de pèrdua després de huit dies de tractament. Comparat amb el grup colític, la suplementació de la dieta amb un 2% d'apocinina va

evidenciar una significativa reducció d'aquesta pèrdua de pes al finalitzar l'estudi (13%), la qual va ser similar a la del grup de referència tractat amb sulfasalazina a la dosi de 50 mg/kg/d (11%). Als grups d'àcid el·làgic i rutina la pèrdua de pes va ser similar a la del grup control, amb un 15% i un 17% de pèrdua, respectivament (Taula IV.2).

**Taula IV.2. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A), i rutina (R) sobre la pèrdua de pes en ratolins amb colitis ulcerosa aguda induïda per DSS. Sulfasalazina (S) com a fàrmac de referència. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , significativament diferent del grup control (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).**

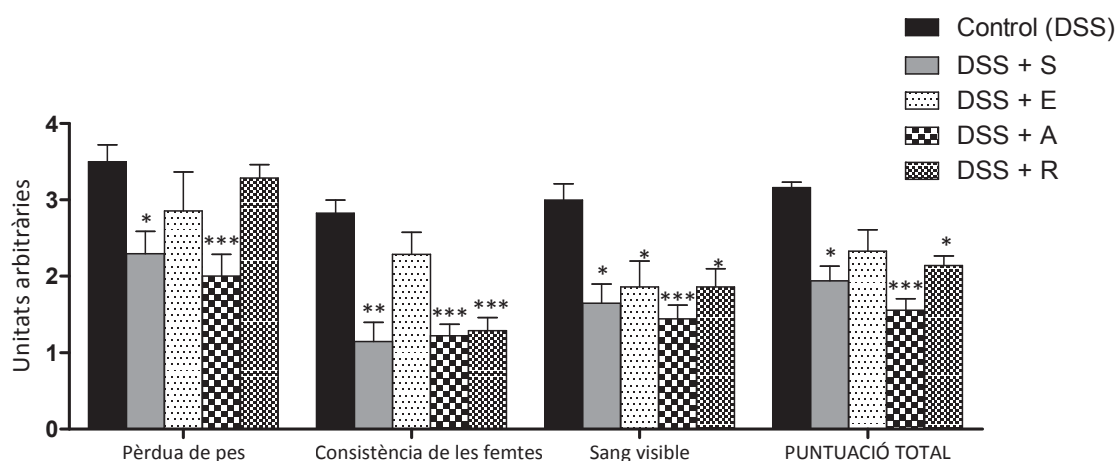
Grup	Evolució del pes dels animals $\pm$ E.E.M. (g)		
	Dia 0	Dia 4	Dia 8
Blanc	18,93 $\pm$ 0,12	19,20 $\pm$ 0,03	18,67 $\pm$ 0,10
Control (DSS)	18,34 $\pm$ 0,09	17,45 $\pm$ 0,17	14,87 $\pm$ 0,16
DSS + S	18,65 $\pm$ 0,22	17,18 $\pm$ 0,38	16,65 $\pm$ 0,57***
DSS + E	18,26 $\pm$ 0,19	18,89 $\pm$ 0,16***	14,93 $\pm$ 0,36
DSS + A	18,22 $\pm$ 0,16	18,04 $\pm$ 0,15	15,76 $\pm$ 0,16**
DSS + R	17,97 $\pm$ 0,25	17,66 $\pm$ 0,16	14,91 $\pm$ 0,14

Un altre signe característic del model experimental, i que es va evidenciar al grup control aproximadament a mitja experiència, va ser l'aparició d'un enrogiment cutani a la zona perianal, el qual s'acompanyava d'unes femtes amb una consistència blana i presència de sang fecal (Taula IV.3). En ocasions, amb l'agreujament de la malaltia, els animals més afectats mostraven signes de prolapse rectal.

En canvi, els grups tractats amb productes van mostrar una millora en la consistència de les femtes i un alleujament de la producció de femtes sagnants respecte al control, el que va resultar en un descens del valor de l'IAM, significatiu tan sols als grups tractats amb apocinina i rutina (Figura IV.1).

**Taula IV.3. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R), sobre l'índex d'activitat de la malaltia (IAM).** Sulfasalazina (S) com a fàrmac de referència. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : significativament diferent del grup control (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).

Grup	Pèrdua de pes ± E.E.M.	Consistència de les femtes ± E.E.M.	Sang visible ± E.E.M.	PUNTUACIÓ TOTAL ± E.E.M.
Control (DSS)	3,50 ± 0,22	2,83 ± 0,17	3,00 ± 0,21	3,16 ± 0,07
DSS + S	2,30 ± 0,29*	1,15 ± 0,25**	1,65 ± 0,25*	1,94 ± 0,19*
DSS + E	2,86 ± 0,51	2,29 ± 0,29	1,86 ± 0,34*	2,33 ± 0,28
DSS + A	2,00 ± 0,29***	1,22 ± 0,15***	1,44 ± 0,18***	1,56 ± 0,15***
DSS + R	3,29 ± 0,17	1,29 ± 0,17***	1,86 ± 0,24*	2,14 ± 0,13*



**Figura IV.1. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R), sobre l'índex d'activitat de la malaltia (IAM).** En acabar l'experiència, es va avaluar l'IAM als diferents grups i es va assignar el valor 0 al grup blanc. Sulfasalazina (S) com a fàrmac de referència. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : vs grup control (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).

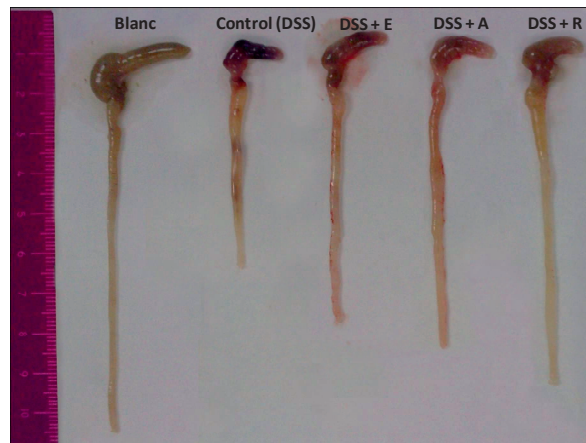
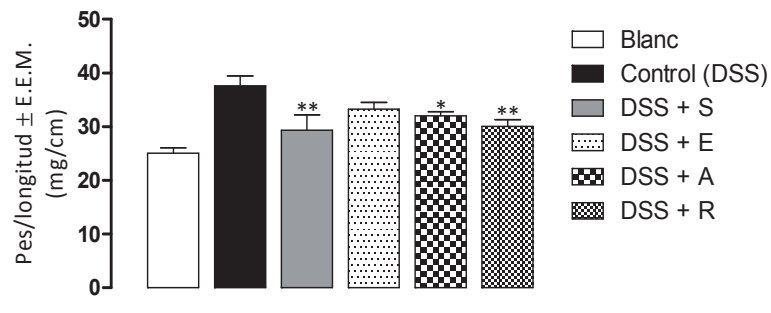
#### IV.1.1.2. Anàlisi de dany macroscòpic

Amb la instauració de la colitis, l'examen macroscòpic de les mostres de còlon del grup control després de set dies d'iniciat el tractament amb DSS va mostrar un engrossiment de la paret intestinal i una reducció de la longitud del còlon. El tractament concomitant amb un 2% d'apocinina o rutina va alleujar de forma significativa aquestes manifestacions, induint una reducció en la relació pes/longitud –que es correlaciona amb el grau d'inflamació intestinal– de l'ordre del tractament de referència amb sulfasalazina (50 mg/kg/d) (Taula IV.4). La

suplementació amb un 2% d'àcid el·làgic en la dieta va induir una reducció d'aquest paràmetre que no va resultar significativa (Figura IV.2).

**Taula IV.4. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la relació pes/longitud del còlon en el model de colitis ulcerosa aguda induïda per DSS. Sulfasalazina (S) com a fàrmac de referència. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ : significativament diferent del grup control (t de Dunnett, n = 6-8).**

Grup	Pes/longitud del còlon $\pm$ E.E.M. (mg/cm)
Blanc	25,09 $\pm$ 1,02
Control (DSS)	37,61 $\pm$ 1,84
DSS + S	29,32 $\pm$ 2,88**
DSS + E	33,28 $\pm$ 1,24
DSS + A	32,02 $\pm$ 0,78*
DSS + R	30,05 $\pm$ 1,25**



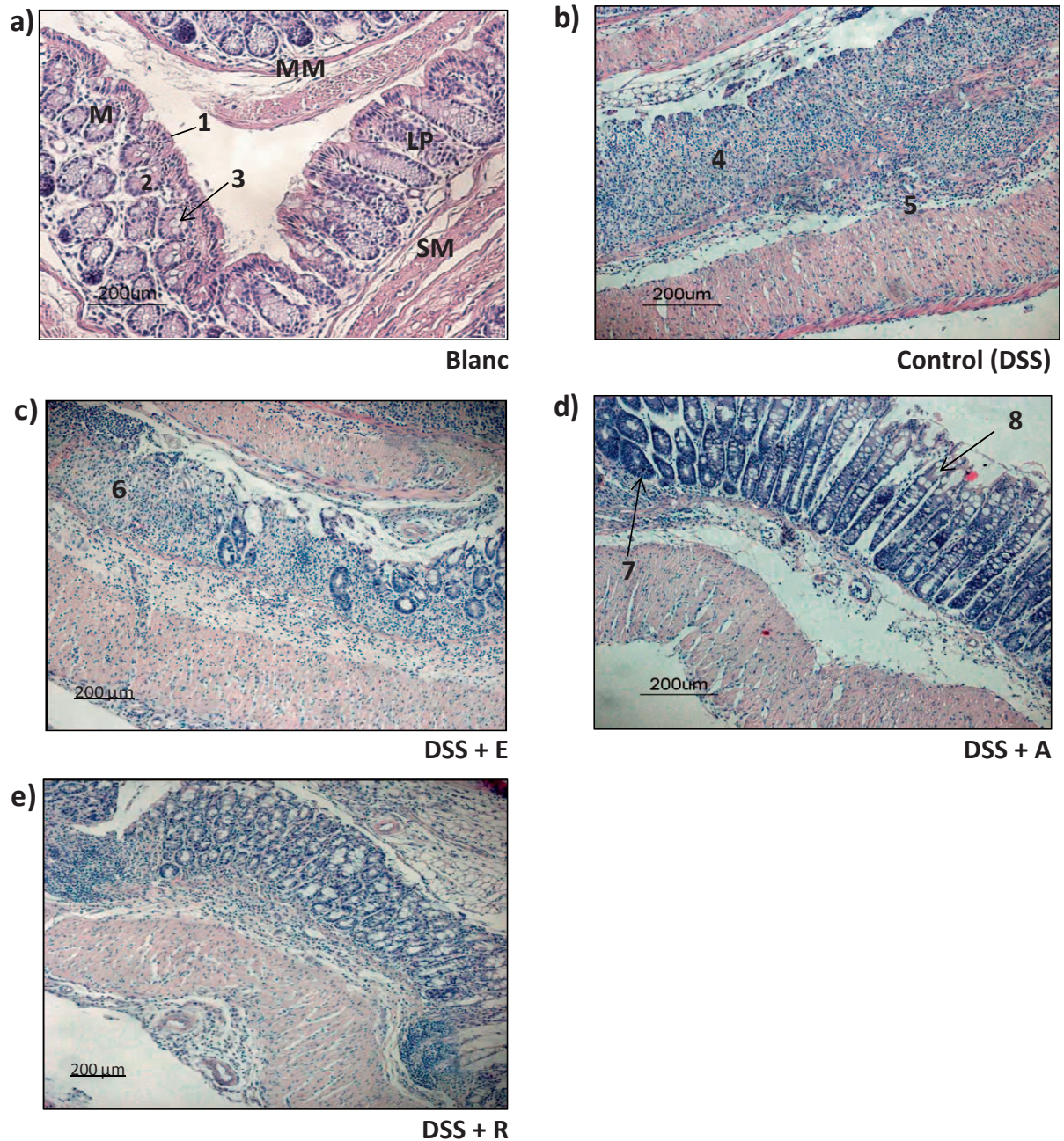
**Figura IV.2. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R), sobre la relació pes/longitud del còlon.** Les dades s'expressen com la mitjana aritmètica de la relació pes /longitud del còlon  $\pm$  E.E.M (mg/cm). Sulfasalazina (S) com a fàrmac de referència. La imatge és representativa de la longitud del còlon d'un animal de cada grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ : vs grup control (t de Dunnett, n = 6-8).



### **IV.1.1.3. Anàlisi histològica**

L'anàlisi al microscopi de les mostres de còlon dels animals del grup control, va revelar profunds canvis histològics respecte al grup blanc. En condicions fisiològiques, la mucosa del còlon està constituïda per un epitel·li i unes criptes amb abundants cèl·lules caliciformes i mucopolisacàrids (Figura IV.3a). Els animals que van rebre DSS experimentaren una pèrdua de les criptes, ulceracions a l'epitel·li de la mucosa i infiltrats inflamatoris que s'estenien cap a la mucosa i les capes musculars (Figura IV.3b).

Amb concordança amb les dades macroscòpiques, a diferència del grup tractat amb àcid el·làgic (Figura IV.3c), on la recuperació no es feia evident, l'anàlisi histològica del teixit del còlon procedent d'animals tractats amb un 2% d'apocinina (Figura IV.3d) o rutina (Figura IV.3e) en la dieta, evidenciava una recuperació del procés inflamatori. En el cas d'apocinina, les seccions van mostrar una important recuperació del dany amb un infiltrat inflamatori de caràcter focal, sense apreciació d'ulceració de l'epitel·li. Les criptes es van observar dilatades i amb hiperplàsia de les cèl·lules basals, aquest últim fet reflectint el marcat procés regeneratiu que afecta a l'epitel·li.



**Figura IV.3. Seccions del còlon tenyides amb hematoxilina-eosina.** a) Grup blanc amb una disposició normal de l'arquitectura del còlon. b) Grup colíctic per DSS i grups colíctics tractats amb c) àcid el·làgic (E), d) apocinina (A) i e) rutina (R). S'assenyalen a les imatges la mucosa (M), la *lamina propria* (LP), la muscular de la mucosa (MM) i la submucosa (SM), així com l'epiteli (1), les criptes (2), les cèl·lules caliciformes (3), l'erosió de la *lamina propria* i desaparició de la membrana mucosa (4), infiltració massiva al llarg de la paret intestinal (5), infiltrat cel·lular greu en la *lamina propria* i submucosa (6), hiperplàsia de les criptes (7) i abundant presència de cèl·lules caliciformes (8). Augment  $\times 200$ .

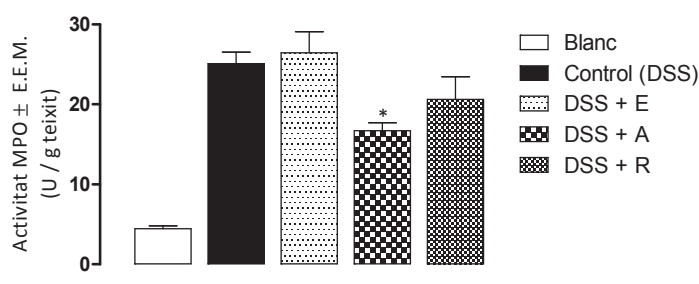
#### IV.1.1.4. Estudi bioquímic

##### IV.1.1.4.1. Activitat MPO

Tant en la MII humana com en els models experimentals de colitis, es produeix un fenomen d'infiltració de neutròfils perifèrics al teixit intestinal. L'activitat MPO intestinal mostra una elevada correlació amb la presència d'infiltrat de granulòcits en les fases més agudes de la colitis experimental induïda per DSS. Així, el desenvolupament de la colitis es va associar amb un marcat augment de l'activitat de l'enzim (Taula IV.5). En canvi, la disminució de la infiltració cel·lular observada a l'estudi histològic dels grups tractats amb un 2% d'apocinina o rutina, es va veure reflectida pel descens de l'activitat MPO, assolint la significació estadística tan sols al grup d'apocinina, amb un 47% de reducció respecte al control. Al grup tractat amb un 2% d'àcid el·làgic, l'activitat MPO es va mantenir incrementada en un nivell semblant al del grup control (Figura IV.4), en concordança amb les imatges histològiques.

**Taula IV.5. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre l'activitat mieloperoxidasa (MPO) en el model de colitis ulcerosa aguda induïda per DSS. \* $p < 0,05$ : significativament diferent del control (*t* de Dunnett,  $n = 6-8$ ).**

Grup	MPO $\pm$ E.E.M. (U/g teixit)
Blanc	4,45 $\pm$ 0,33
Control (DSS)	25,12 $\pm$ 1,43
DSS + E	26,47 $\pm$ 2,64
DSS + A	16,70 $\pm$ 1,01*
DSS + R	20,62 $\pm$ 2,85



**Figura IV.4. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre l'activitat mieloperoxidasa (MPO).** Els valors s'expressen com la mitjana de l'activitat enzimàtica i es normalitzen respecte al pes de teixit  $\pm$  E.E.M. (U/g teixit). \* $p < 0,05$  vs grup control (t de Dunnett, n = 6-8).

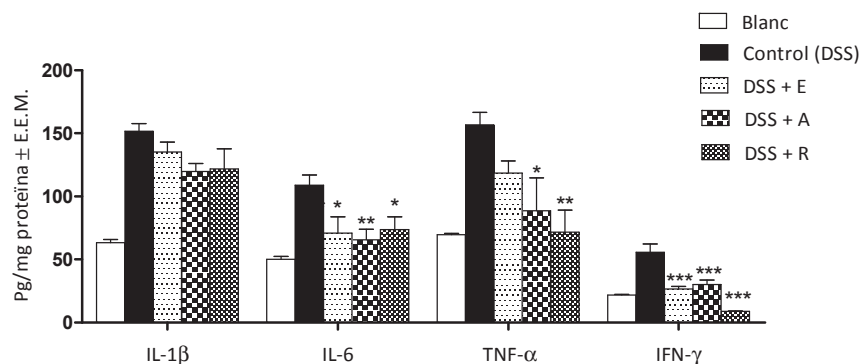
#### IV.1.1.4.2. Producció de mediadors inflamatoris

Per tal de determinar l'efecte dels principis actius en la producció dels principals mediadors implicats en la patogènesi de la CU, es va mesurar la producció local de citocines inflamatòries a la mucosa del còlon i al sèrum aïllat de les mostres de sang després de 7 dies de tractament amb DSS.

El procés inflamatori a la mucosa va estar associat amb un augment d'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  (Taula IV.6). En canvi, el tractament amb un 2% d'àcid el·làgic, apocinina o rutina, va suposar una reducció en la producció d'aquests mediadors (Figura IV.5)

**Taula IV.6. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) en la producció de citocines inflamatòries en el model de colitis ulcerosa aguda induïda per DSS.** \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : significativament diferent del grup control (t de Dunnett, n = 6).

Grup	IL-1 $\beta$		IL-6		TNF- $\alpha$		IFN- $\gamma$	
	pg/mg proteïna $\pm$ E.E.M.	% I	pg/mg proteïna $\pm$ E.E.M.	% I	pg/mg proteïna $\pm$ E.E.M.	% I	pg/mg proteïna $\pm$ E.E.M.	% I
Blanc	63,3 $\pm$ 2,6	–	50,1 $\pm$ 2,3	–	69,6 $\pm$ 0,9	–	21,9 $\pm$ 0,3	–
Control (DSS)	151,8 $\pm$ 5,9	–	108,9 $\pm$ 8,0	–	156,8 $\pm$ 9,8	–	55,8 $\pm$ 6,6	–
DSS + E	135,2 $\pm$ 7,8	19	70,9 $\pm$ 12,8*	65	118,4 $\pm$ 9,7	44	26,6 $\pm$ 2,0***	86
DSS + A	119,8 $\pm$ 6,3	36	65,5 $\pm$ 8,5**	74	88,6 $\pm$ 26,2*	78	30,0 $\pm$ 3,8***	76
DSS + R	121,8 $\pm$ 16,0	34	73,8 $\pm$ 9,9*	60	71,8 $\pm$ 17,4**	97	9,1 $\pm$ 0,2***	100

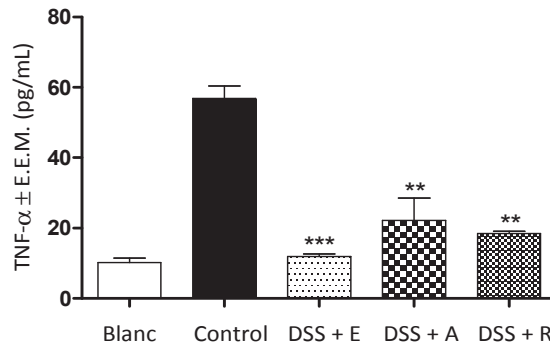


**Figura IV.5. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la producció d'IL-1β, IL-6, TNF-α i IFN-γ al còlon.** Les gràfiques de barres representen la mitjana dels pg de citocines normalitzats respecte als mg de proteïna (E.E.M.). Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

De la mateixa manera, l'administració de DSS va suposar un increment de la concentració sèrica de TNF-α (Taula IV.7). En canvi, en comparació amb el grup control, aquest efecte va ser significativament revertit després de l'administració dels productes en estudi, amb un 96, 74 i 82% d'inhibició per a l'àcid el·làgic, apocinina i rutina, respectivament (Figura IV.6).

**Taula IV.7. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la concentració sèrica de TNF-α en el model de colitis ulcerosa aguda induïda per DSS.** \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : significativament diferent del grup control (*t* de Dunnett;  $n = 6-8$ )

Grup	TNF-α ± E.E.M. (pg/mL)
Blanc	10,18 ± 1,28
Control (DSS)	56,86 ± 3,50
DSS + E	11,89 ± 0,76***
DSS + A	22,14 ± 6,33**
DSS + R	18,41 ± 0,71**

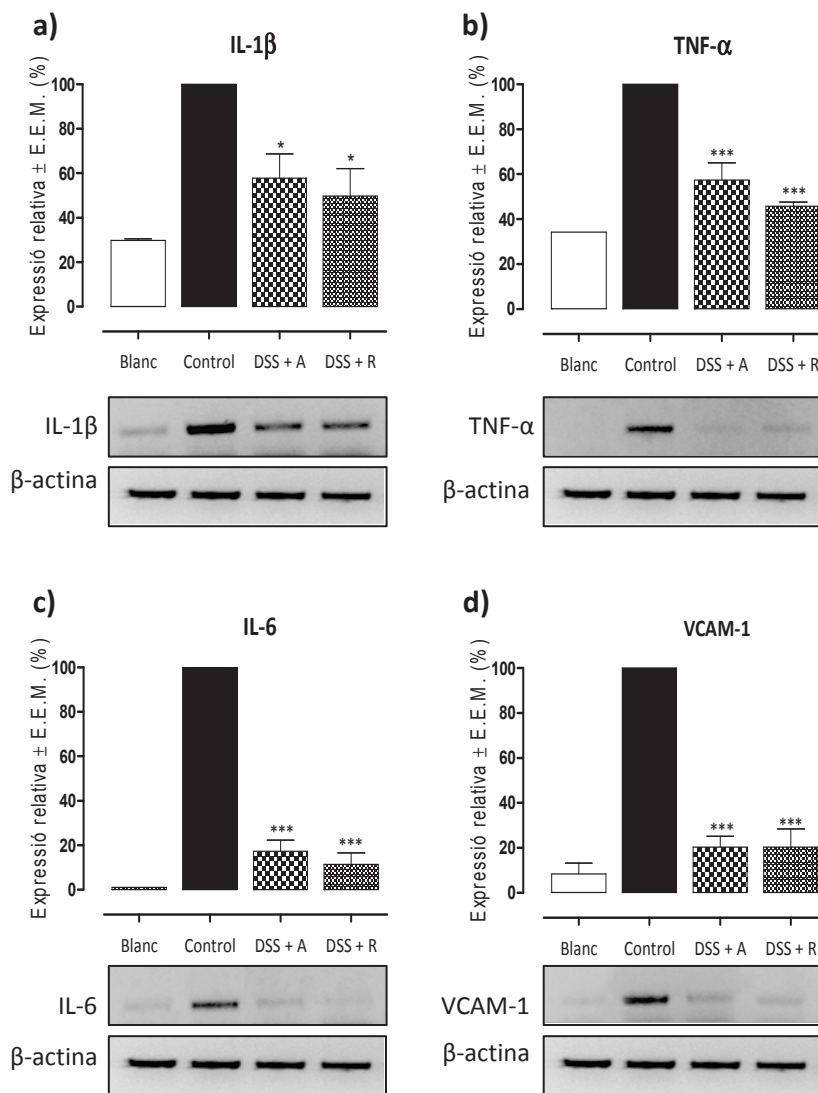


**Figura IV.6. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la concentració sèrica de TNF- $\alpha$ .** Els valors corresponen a la mitjana de la concentració sèrica de TNF- $\alpha$   $\pm$  E.E.M. (pg/mL). Significativament diferent del grup control: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Dunnett;  $n = 6-8$ ).

Per tal d'obtenir una major comprensió del mecanisme molecular implicat en l'efecte preventiu d'apocinina i rutina sobre l'increment en la producció de citocines, es van mesurar per RT-PCR, l'expressió gènica d'IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ , al teixit colònic. Els animals tractats amb DSS van mostrar un marcat augment d'ARNm d'aquestes citocines sobre els valors basals, mentre que als grups tractats amb un 2% d'apocinina o rutina es va observar una reducció en la seua expressió (Figura IV.7a-c).

A més, el desenvolupament de la colitis es va associar amb un marcat augment en l'expressió de VCAM-1 al còlon, quan es va comparar respecte al grup blanc. En canvi, el tractament amb un 2% d'apocinina i rutina va reduir significativament la seua expressió gènica (Figura IV.7d).





**Figura IV.7. Efecte d'apocinina (A) i rutina (R) sobre l'expressió gènica d'IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), IL-6 (c) i VCAM-1 (d) al còlon.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es calcula amb un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors es normalitzen respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  ( $t$  de Dunnett;  $n = 6$ ).

#### IV.1.1.4.3. Expressió proteica de COX-2 i iNOS, i producció de NO i PGE<sub>2</sub>

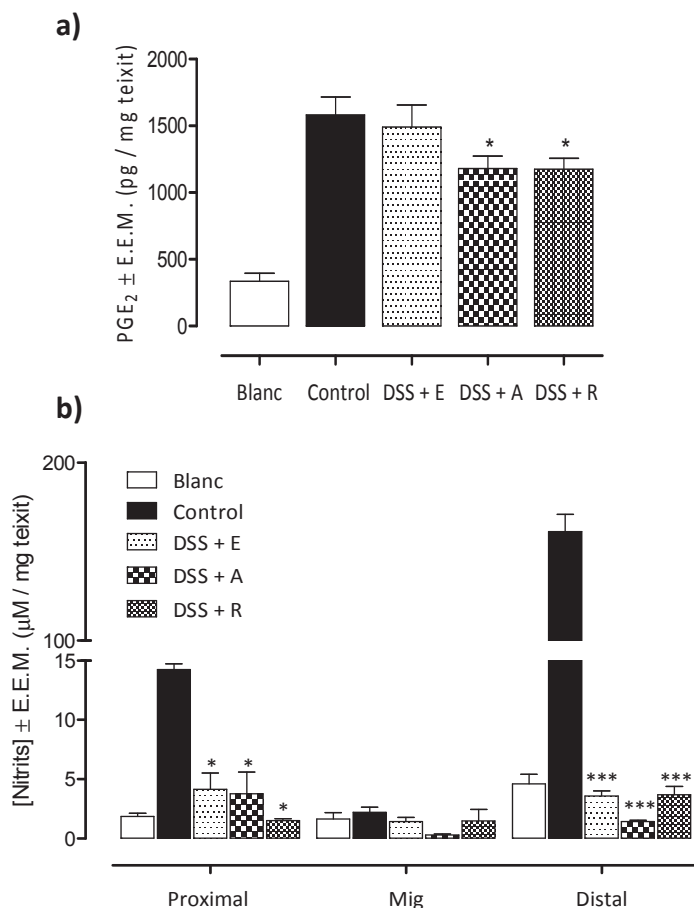
La concentració de PGE<sub>2</sub> en un estat d'inflamació ve determinada majoritàriament per l'enzim COX-2. Després de l'administració de DSS, la concentració de PGE<sub>2</sub> es va incrementar al grup control respecte al blanc (Taula IV.8), mentre que tan sols les dietes suplementades amb un 2% d'apocinina o rutina van contrarestar significativament aquest augment, amb un 32 i 33% d'inhibició, respectivament (Figura IV.8a).

Tanmateix, el model de DSS es caracteritza per una concentració de NO elevada, induïda per l'enzim iNOS. A l'estudi, la producció de NO es va incrementar al grup control respecte al blanc, i en especial a la zona del còlon distal (Taula IV.8). La suplementació de la dieta amb un 2% d'àcid el·làgic, apocinina o rutina va reduir, en aquesta zona, la concentració de NO fins a valors basals (Figura IV.8b).

**Taula IV.8.** Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la producció de PGE<sub>2</sub> i NO al còlon en el model de colitis ulcerosa aguda induïda per DSS. \**p*<0,05: vs grup control (*t* de Dunnett, *n* = 5-6). \**p*<0,05, \*\*\**p*<0,001: vs grup control (Bonferroni, *n*=3).

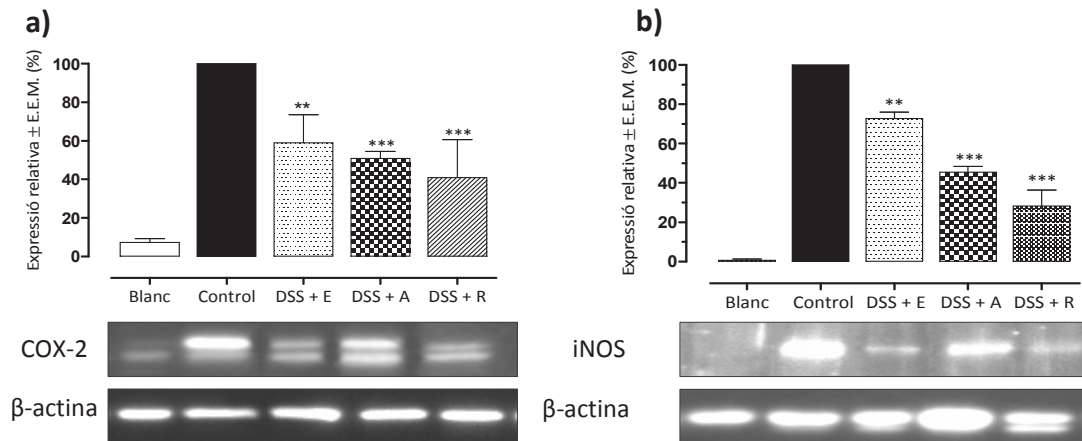
Grup	PGE <sub>2</sub> ± E.E.M. (pg/mg teixit)	[Nitrits] ± E.E.M. (µM/mg teixit)		
		Proximal	Mig	Distal
Blanc	335,63 ± 61,02	1,88 ± 0,27	1,65 ± 0,54	4,61 ± 0,81
Control (DSS)	1581,62 ± 135,03	14,26 ± 0,46	2,23 ± 0,42	161,12 ± 9,72
DSS + E	1492,32 ± 95,15	4,14 ± 1,40*	1,42 ± 0,37	3,57 ± 0,43***
DSS + A	1180,50 ± 93,04*	3,77 ± 1,83*	0,28 ± 0,11	1,42 ± 0,14***
DSS + R	1176,54 ± 81,39*	1,51 ± 0,16*	1,47 ± 0,99	3,69 ± 0,69***





**Figura IV.8.** Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la concentració de PGE<sub>2</sub> (a) i NO (b) en l'homogeneïtzat del còlon. a) Els valors corresponen a la mitjana dels pg de PGE<sub>2</sub> normalitzats respecte al pes de teixit ± E.E.M. (pg/mg teixit). Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$  (*t* de Dunnett,  $n = 5-6$ ). b) Els valors s'expressen com la mitjana de la concentració de nitrits en les zones proximal, mitja i distal del còlon respecte al pes del teixit ± E.E.M. (µM/mg teixit). Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  (Bonferroni,  $n = 3$ ).

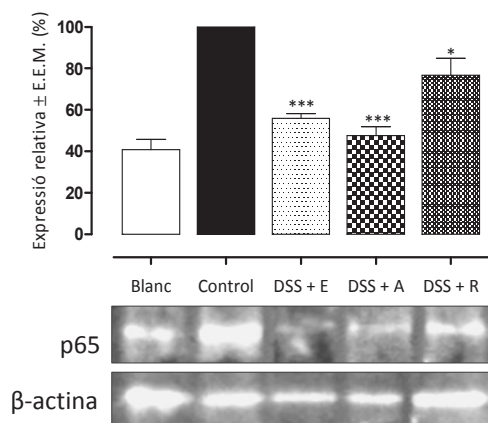
Conforme la concentració de NO i PGE<sub>2</sub>, l'expressió d'iNOS i COX-2 va resultar significativament incrementada en l'homogeneïtzat del còlon després de l'administració de DSS, com es va poder observar per anàlisi Western blot. Com calia esperar, el tractament amb un 2% d'àcid el·làgic, apocinina o rutina va prevenir aquest augment, amb un 44%, 49% i 59% d'inhibició per a COX-2 (Figura IV.9a) i amb un 31%, 54% i 72% per a iNOS (Figura IV.9b), respectivament.



**Figura IV.9. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre l'expressió citosòlica de COX-2 (a) i iNOS (b) al còlon.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges obtingudes; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es calcula amb un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors d'iNOS es normalitzen respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

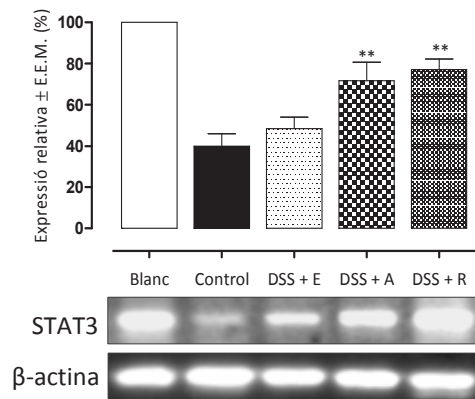
#### IV.1.1.4.4. Activació de NF- $\kappa$ B i STAT3

La CU es caracteritza per una marcada activació de NF- $\kappa$ B que, com a conseqüència, indueix l'expressió de COX-2. Per tal de valorar l'estat d'activació del factor de transcripció a la colitis es va determinar, per Western blot, l'expressió nuclear de la subunitat p65 als diferents grups d'animals. En concordança amb l'expressió de COX-2, els animals afectats van mostrar una major expressió de p65, a diferència dels animals tractats amb un 2% d'àcid el·làgic, apocinina o rutina, on aquest increment es va reduir significativament, amb un 75%, un 89% i un 39% d'inhibició, respectivament (Figura IV.10).



**Figura IV.10. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la translocació nuclear de p65.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es calcula amb un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. L'expressió nuclear de p65 es normalitza respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

A més del paper del NF- $\kappa$ B en la patogènesi de la CU, el STAT3 també ha estat implicat en el desenvolupament de la malaltia per la producció d'IL-6. Per tractar d'explicar l'efecte preventiu dels productes respecte a la producció d'IL-6 en la colitis aguda, es va determinar l'expressió citosòlica de STAT3 al teixit colònic. Als animals tractats amb DSS es va observar una reduïda expressió de STAT3, com un indicatiu d'una incrementada activitat transcripcional del factor. La suplementació de la dieta amb un 2% d'apocinina o rutina va suposar una reducció significativa en l'activació del factor, com es va poder observar per l'augment de STAT3 en l'homogeneïtzat citosòlic. Per contra, el tractament amb àcid el·làgic no va tenir cap influència en l'activitat del factor de transcripció (Figura IV.11).



**Figura IV.11. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre l'expressió de STAT3.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es calcula amb un software d'imatge considerant el grup blanc amb un 100% d'expressió. L'expressió citosòlica de STAT3 va ser normalitzada respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \*\* $p < 0,01$  ( $t$  de Dunnett;  $n = 6$ ).

#### IV.1.2. COLITIS ULCEROSA CRÒNICA INDUÏDA PER DSS

Tant el consum de beguda com d'aliment al llarg de l'experiència de CU crònica no van ser significativament diferent entre els grups experimentals. L'exposició dels animals a l'administració cíclica de DSS va resultar en un consum mitjà diari d'uns 4,7 mL d'aigua amb DSS per ratolí, corresponent amb una ingesta total aproximada de 2 g de DSS per ratolí després de 56 dies de tractament, tenint en compte que la concentració de DSS variava. D'altra banda, amb la quantitat total de pinso ingerit, va resultar una dosi mitjana consumida dels productes en estudi d'1,2 g/kg/d, la qual equival a una dosi en humans de 80 mg/kg/d segons la fórmula DEH descrita a l'apartat III.2.2.1.2.

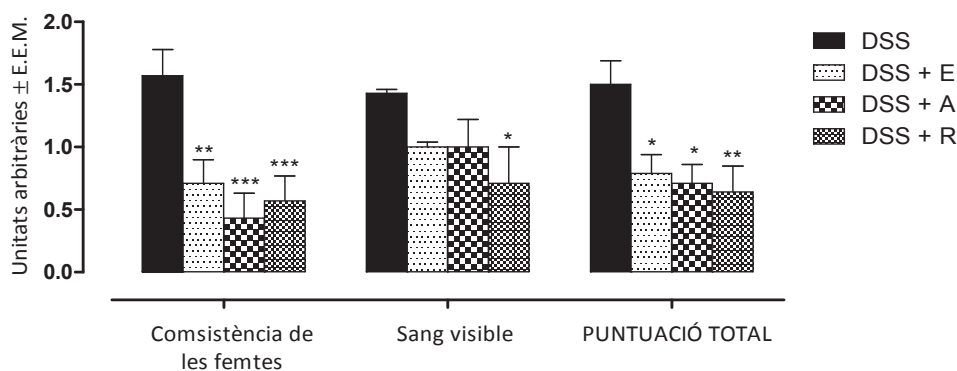
##### IV.1.2.1. Estudi de paràmetres clínics: IAM

L'administració cíclica de DSS en l'aigua de beguda va reproduir una CU crònica, amb lleugers signes clínics de diarrea i, en alguna ocasió, hemorràgia rectal (Taula IV.9). A diferència del que ocorria en

l'experiència aguda, l'evolució del pes dels animals no va diferir entre els diferents grups a l'experiència crònica. Els grups tractats amb un 0,5% d'àcid el·làgic, apocinina o rutina en la dieta van mostrar una reducció d'aquests signes, fet que va assolir un significatiu descens dels paràmetres de l'IAM (Figura IV.12).

**Taula IV.9. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R), sobre l'índex d'activitat de la malaltia (IAM).** \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : significativament diferent del control (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).

Grup	Consistència de les femtes $\pm$ E.E.M.	Sang visible $\pm$ E.E.M.	PUNTUACIÓ TOTAL $\pm$ E.E.M.
Control (DSS)	1,57 $\pm$ 0,21	1,43 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,19
DSS + E	0,71 $\pm$ 0,19**	1,00 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,15*
DSS + A	0,43 $\pm$ 0,20***	1,00 $\pm$ 0,22	0,71 $\pm$ 0,15*
DSS + R	0,57 $\pm$ 0,20***	0,71 $\pm$ 0,29*	0,64 $\pm$ 0,21**



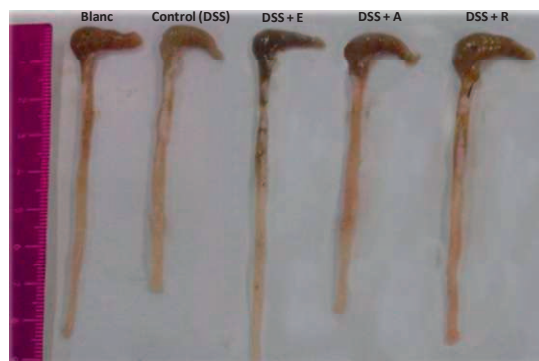
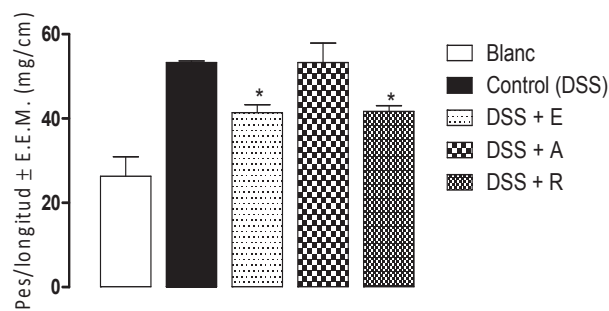
**Figura IV.12. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R), sobre l'índex d'activitat de la malaltia (IAM).** En acabar l'experiència es va avaluar l'IAM als grups control i tractats, i es va assignar el valor 0 al grup blanc. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : significativament diferent del control (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).

#### IV.1.2.2. Anàlisi de dany macroscòpic

L'examen macroscòpic de les mostres de còlon al final de l'experiència va evidenciar un increment del paràmetre inflamatori pes/longitud del còlon d'animals tractats amb DSS respecte als del grup blanc (Taula IV.10). En canvi, tan sols la suplementació de les dietes amb un 0,5% de rutina o àcid el·làgic va reduir significativament aquest increment un 44% en ambdós casos (Figura IV.13).

**Taula IV.10. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la relació pes/longitud en el model de colitis ulcerosa crònica induïda per DSS. \* $p < 0,05$ : significativament diferent del grup control (t de Dunnett, n = 6-8).**

Grup	Pes/longitud del còlon $\pm$ E.E.M. (mg/cm)
Blanc	26,33 $\pm$ 4,62
Control (DSS)	53,27 $\pm$ 0,38
DSS + E	41,38 $\pm$ 1,89*
DSS + A	53,29 $\pm$ 4,58
DSS + R	41,68 $\pm$ 1,35*



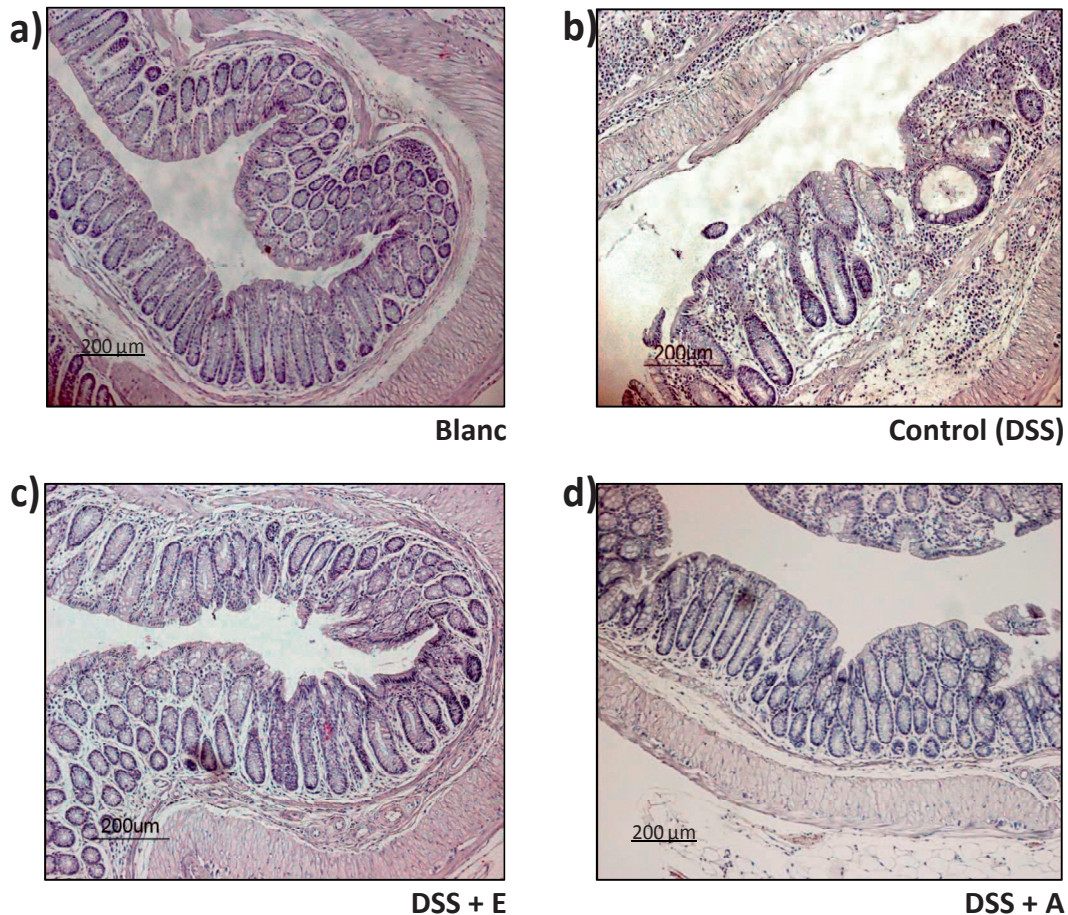
**Figura IV.13. Efecte d'àcid el·làgic (E), apocinina (A) i rutina (R) sobre la relació pes/longitud del còlon.** La imatge és representativa de la longitud d'un còlon de cada grup. la gràfica representa la mitjana aritmètica de la relació pes/longitud del còlon  $\pm$  E.E.M (mg/cm). \* $p < 0,05$ : vs grup control (t de Dunnett, n = 6-8).

### IV.1.2.3. Anàlisi histològica

L'estudi histològic dels còlons aïllats dels animals tractats amb 4 cicles de DSS va mostrar una inflamació lleu a moderadament severa, caracteritzada per una distorsió i abscessos a les criptes amb pèrdua de les cèl·lules caliciformes o globet, erosió de l'epiteli i una severa infiltració cel·lular mononuclear a la *lamina propria*, junt amb ulceració i afectació de la muscular de la mucosa, especialment a la zona distal (Figura IV.14b). Als



còlons dels animals tractats amb una dieta suplementada amb un 0,5% d'àcid el·làgic (Figura IV.14c) o apocinina (Figura IV.14d) es va fer evident una recuperació del procés inflamatori intestinal amb una reducció de l'alteració morfològica associada al DSS. Ambdós tractaments van mantenir l'arquitectura del còlon i van reduir la pèrdua de l'epiteli.

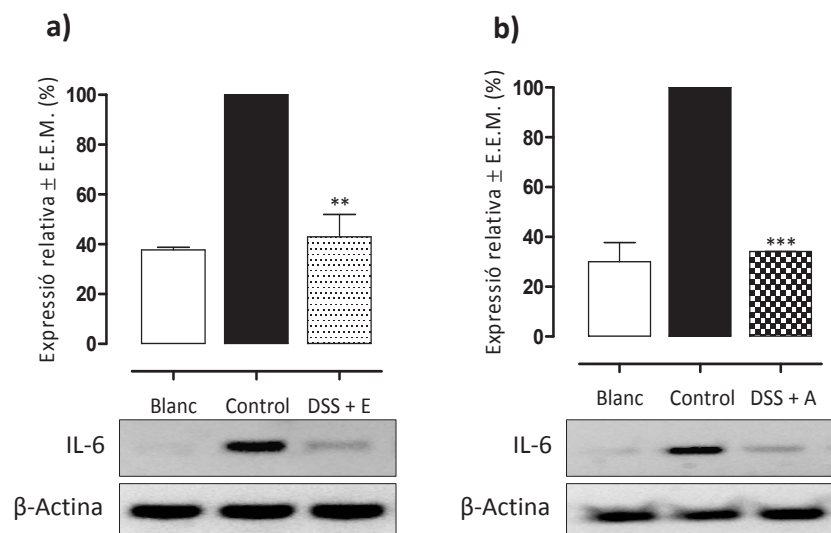


**Figura IV.14.** Seccions del còlon tenyides amb hematoxilina-eosina. a) Grup blanc amb una disposició normal de l'arquitectura del còlon. b) Grup colític per DSS i grups colítics tractats amb c) àcid el·làgic (E) i d) apocinina (A). Augment  $\times 200$ .

#### IV.1.2.4. Estudi bioquímic

##### IV.1.2.4.1. Expressió gènica de citocines inflammatòries

La inflamació crònica és una força motriu per a l'inici i la progressió de tumors en moltes malalties. Així doncs, la cascada de senyalització IL-6/STAT3 ha estat demostrada com un regulador clau en la proliferació i la supervivència de les cèl·lules epitelials iniciadores de tumors (Atreya i Neurath, 2005). Amb concordança amb la severitat de la malaltia, al grup control es va observar un increment de l'expressió gènica d'IL-6 sobre els valors basals. En canvi, el tractament amb les dietes suplementades amb un 0,5% d'àcid el·làgic (Figura IV.15a) o apocinina (Figura IV.15b) va suposar una significativa reducció d'aquesta expressió, quasi assolint els valors basals corresponents als del grup blanc.

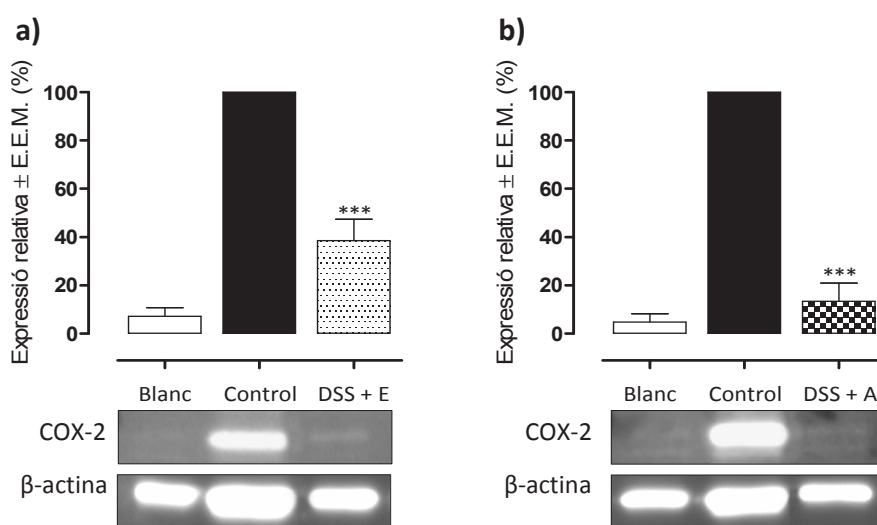


**Figura IV.15.** Efecte a) d'àcid el·làgic (E) i b) apocinina (A) sobre l'expressió gènica d'IL-6. Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es calcula amb un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors d'IL-6 es normalitzen respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

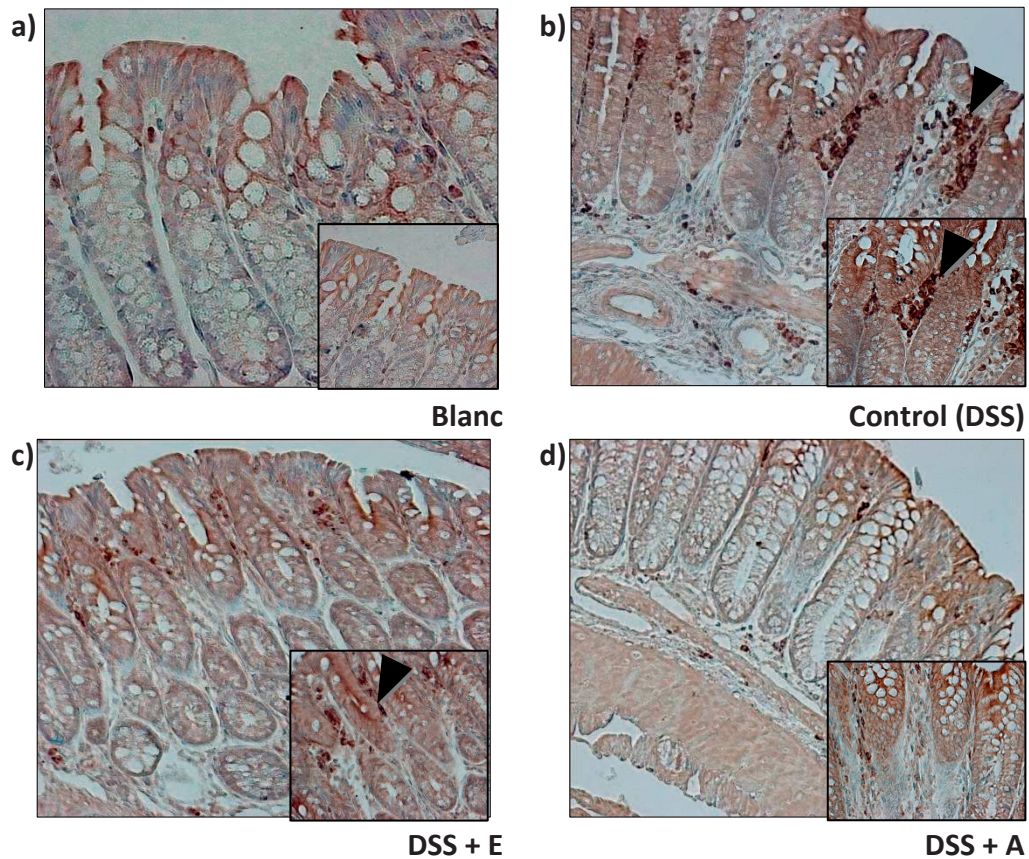


#### IV.1.2.4.2. Expressió proteica de COX-2 i iNOS

A l'estudi, el dany macroscòpic observat al grup colític es va correlacionar amb un augment en l'expressió proteica dels enzims COX-2 e iNOS en l'homogeneïtzat de còlon, respecte al grup blanc. Aquestes proteïnes van mostrar un canvi significatiu als grups tractats amb un 0,5% d'àcid el·làgic i apocinina en la dieta quan es va comparar amb el grup control. D'una banda, el tractament va suposar una marcada inhibició de l'expressió de COX-2 d'un 84% i un 91% als grups d'àcid el·làgic (Figura IV.16a) i apocinina (Figura IV.16b), respectivament. A l'estudi IHQ, on es va evidenciar aquest fet, es va poder observar una reduïda tinció de COX-2 als grups tractats amb els productes respecte al control (Figura IV.17).

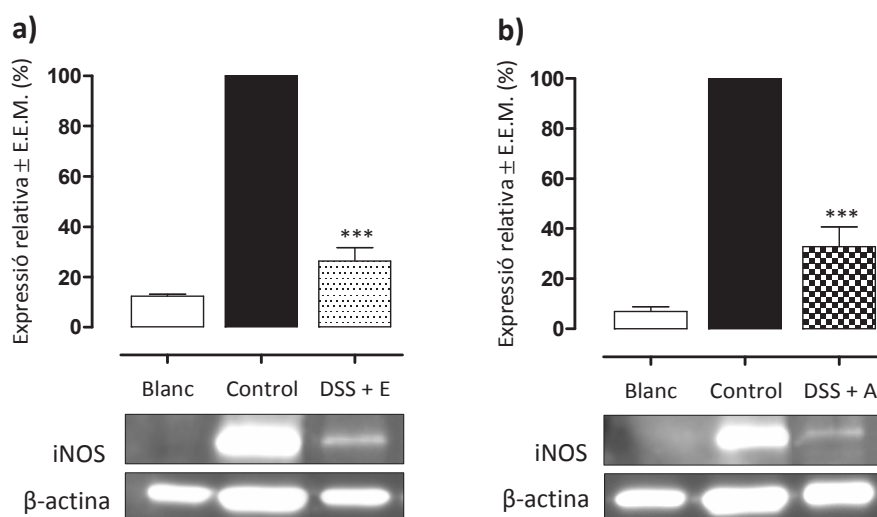


**Figura IV.16. Efecte a) d'àcid el·làgic (E) i b) apocinina (A) sobre l'expressió proteica de COX-2.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es calcula amb un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors de COX-2 es normalitzen respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).



**Figura IV.17. Anàlisi immunohistoquímica de COX-2 al teixit colònic de ratolí.** Les seccions de còlon van ser tractades amb un anticòs específic per a COX-2. Les fletxes assenyalen la tinció positiva. Les imatges són representatives de 4 ratolins independents de cada grup de tractament. Augment  $\times 200$ .

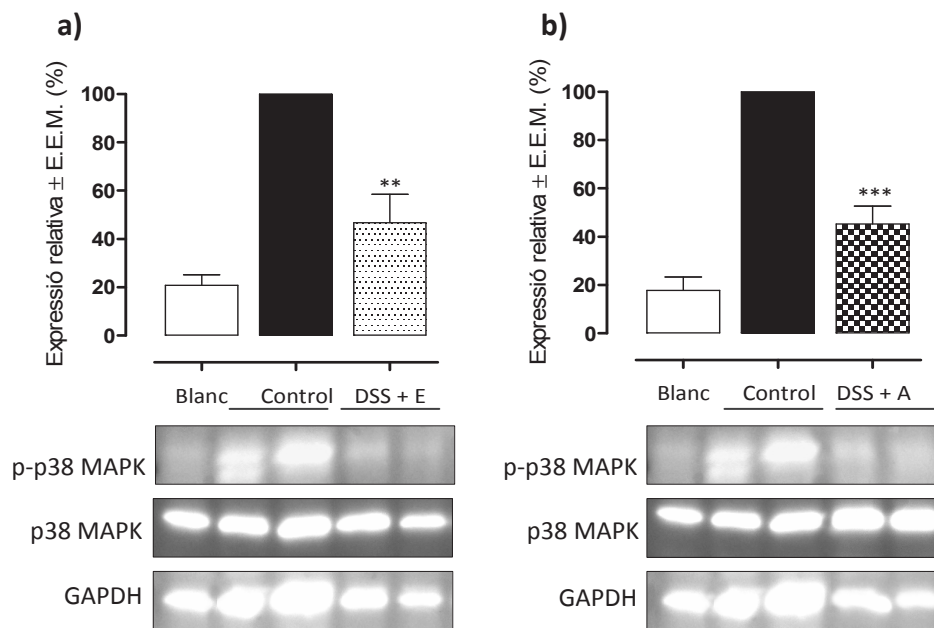
D'altra banda, respecte al control, el tractament amb els productes també va suposar una significativa reducció de l'expressió proteica d'iNOS d'un 66% per al grup tractat amb àcid el·làgic (Figura IV.18a) i un 72% per a apocinina (Figura IV.18b).



**Figura IV.18. Efecte a) d'acid el·làgic (E) i b) apocinina (A) sobre l'expressió proteica d'iNOS.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es calcula mitjançant un software d'imatge i es considera el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors d'iNOS al citosol es van normalitzar respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \*\*\* $p < 0,001$  (t de Dunnett; n = 6).

#### IV.1.2.4.3. Activació de p38 MAPK

En particular, l'activitat de p38 MAPK s'ha vist que està incrementada en pacients que pateixen la MII (Hommes *et al.*, 2002). A l'estudi, aquest fet es va evidenciar pel marcat increment en l'expressió i activació de p38 MAPK a l'extracte de proteïna citosòlica de la mucosa del còlon dels animals afectats. Amb açò, es suggereix una participació activa de la cinasa a l'estadi crònic de la lesió del còlon induïda per DSS. Tanmateix, l'administració en la dieta d'un 0,5% d'acid el·làgic o apocinina va reduir aquesta activació amb un 67% (Figura IV.19a) i 61% (Figura IV.19b), respectivament, com es va poder observar per la disminució en l'expressió proteica de la forma fosforilada de la cinasa.



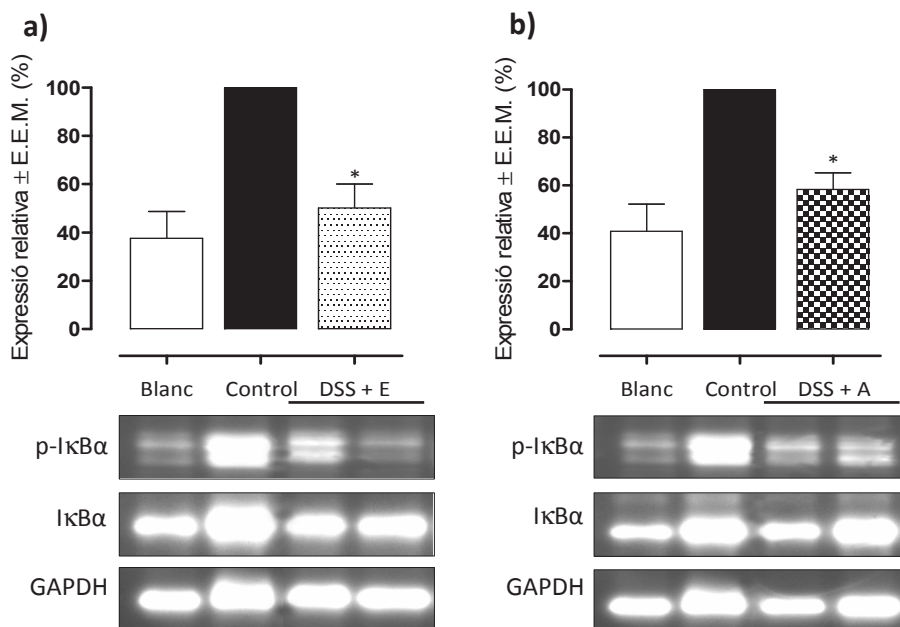
**Figura IV.19. Efecte a) d'àcid el·làgic (E) i b) apocinina (A) en l'activació de p38 MAPK induïda per DSS.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa de l'expressió citosòlica de les formes fosforilades i no fosforilades de p38 MAPK, i GAPDH com a control de càrrega. La intensitat de l'expressió relativa (%) es va calcular per un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. L'expressió de p-p38 MAPK va ser normalitzada respecte a p38 MAPK. Significativament diferent del grup control: \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

#### IV.1.2.4.4. Degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$ i activació transcripcional de NF- $\kappa$ B

Existeixen múltiples passos d'actuació en l'activació del NF- $\kappa$ B dins de la cascada de senyalització. Un d'ells és la inhibició específica dels sistemes de translocació nuclear del factor, bé dirigits al complex IKK, bé als seus inhibidors (I $\kappa$ B) (Atreya *et al.*, 2008).

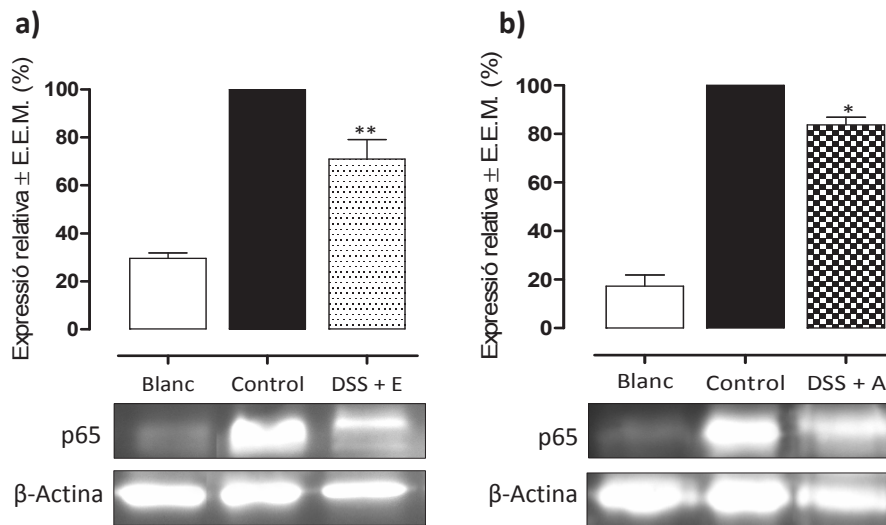
Amb l'objectiu d'avaluar si àcid el·làgic i apocinina van intervenir en el model inflamatori per mitjà de l'activació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B, es va determinar per Western blot l'expressió citosòlica de la proteïna I $\kappa$ B $\alpha$  i la seua forma fosforilada (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ), així com la translocació nuclear de la subunitat p65.

D'una banda, es va observar un pic significatiu de fosforilació d'I $\kappa$ B $\alpha$  al finalitzar l'administració de DSS. La suplementació de la dieta amb un 0,5% d'àcid el·làgic o apocinina, va inhibir aquest augment de forma significativa, amb un 80% (Figura IV.20a) i 71% (Figura IV.20b), respectivament.



**Figura IV.20. Efecte a) d'àcid el·làgic (E) i b) apocinina (A) en la degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$  induïda per DSS.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa de l'expressió citosòlica de les formes fosforilades i no fosforilades d'I $\kappa$ B $\alpha$ , i de GAPDH com a control de càrrega. La intensitat de l'expressió relativa (%) es va calcular mitjançant un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. L'expressió de p-I $\kappa$ B $\alpha$  va ser normalitzada respecte a I $\kappa$ B $\alpha$ . Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$  (t de Dunnett; n = 6).

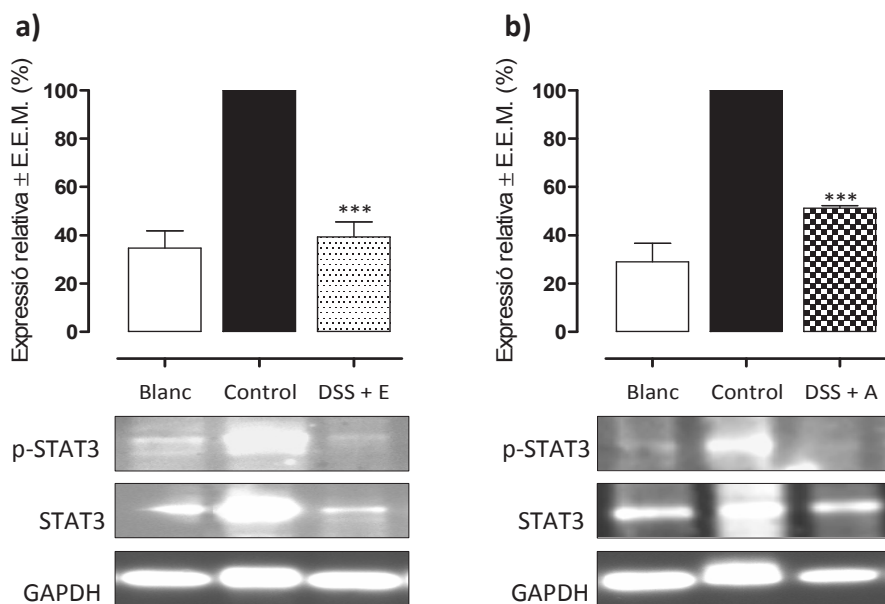
D'altra banda, encara que significativa també, la inhibició de la translocació nuclear de la subunitat p65 no va ser tan acusada com s'ha vist per a la degradació del seu inhibidor: 41% per a l'àcid el·làgic (Figura IV.21a) i 20% per a apocinina (Figura IV.21b).



**Figura IV.21.** Efecte a) d'àcid el·làgic (E) i b) apocinina (A) sobre la translocació nuclear de p65 induïda per DSS. Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es va calcular per un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors de p65 nuclear es va normalitzar respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

#### IV.1.2.4.5. Activació de STAT3

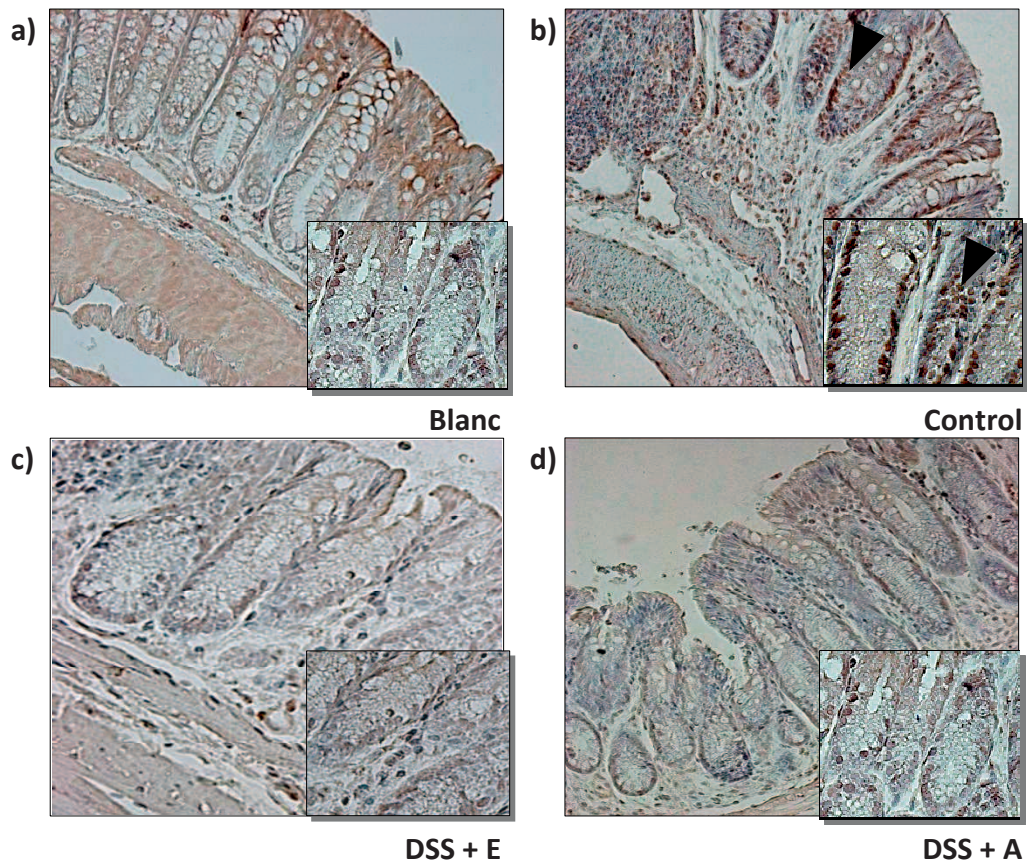
Com el NF- $\kappa$ B, el STAT3 es troba de forma latent al citoplasma fins a ser estimulat per senyals inflamatoris. Principalment és activat per la via de senyalització IL-6/JAK, mitjançant la fosforilació directa del residu Tyr-705. En la colitis, el STAT3 ha estat demostrat que està associat a la carcinogènesis colorectal. L'anàlisi Western blot va revelar que el tractament amb un 0,5% d'àcid el·làgic (Figura IV.22a) o apocinina (Figura IV.22b) en la dieta inhibia significativament la fosforilació del factor de transcripció induïda per DSS.



**Figura IV.22. Efecte a) d'àcid el·làgic (E) i b) apocinina (A) en l'activació de STAT3 induïda per DSS.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges obtingudes; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa de l'expressió citosòlica de les formes fosforilades i no fosforilades de STAT3, i GAPDH com a control de càrrega. La intensitat de l'expressió relativa (%) es va calcular mitjançant un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. L'expressió de p-STAT3 va ser normalitzada respecte a la STAT3. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

Aquest fet es va corroborar amb l'estudi IHQ, on es va evidenciar una reduïda tinció de la forma fosforilada (pSTAT3) als grups tractats amb els productes respecte al control (Figura IV.23).



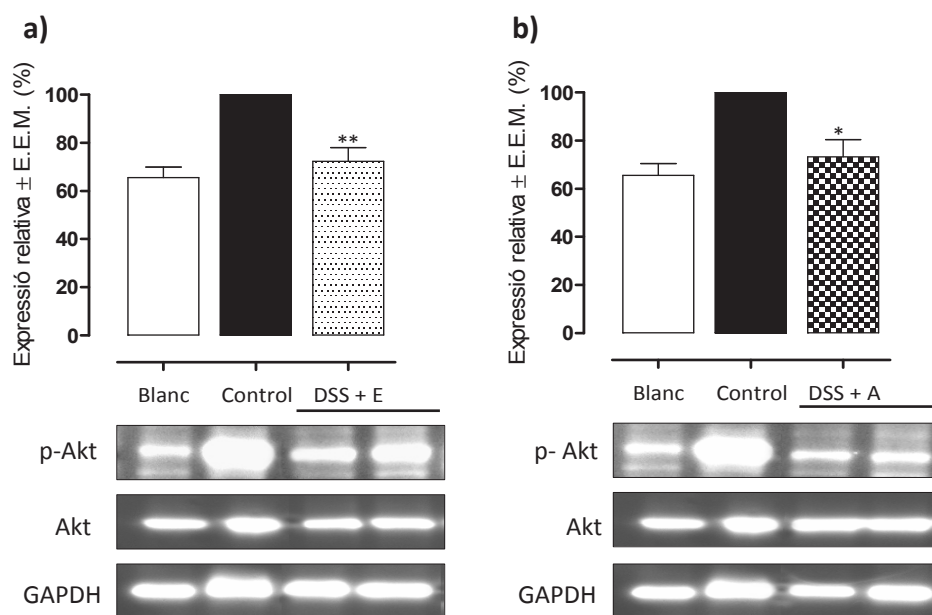


**Figura IV.23.** Anàlisi immunohistoquímica de p-STAT3 en teixit colònic de ratolí. Les seccions de còlon van ser tractades amb un anticòs específic per a p-STAT3. Les fletxes assenyalen la tinció positiva. Les imatges són representatives de 4 ratolins independents de cada grup de tractament. Augment  $\times 200$ .

#### IV.1.2.4.6. Activació d'Akt

Amb l'objectiu d'avaluar si l'activitat antiinflamatòria d'àcid el·làgic i apocinina en el model crònic de colitis va implicar la via de senyalització PI3k/Akt, es va determinar per anàlisi Western blot l'expressió d'Akt fosforilat al còlon dels animals. Aquesta determinació és un bon marcador que s'empra per a valorar l'activació del PI3K, la qual es va observar incrementada després de l'administració de DSS. El tractament dels ratolins amb una dieta suplementada amb un 0,5% d'àcid el·làgic o apocinina va suposar una inhibició significativa de la fosforilació d'Akt, d'un 81% (Figura IV.24a) i 78% (Figura IV.24b), respectivament.





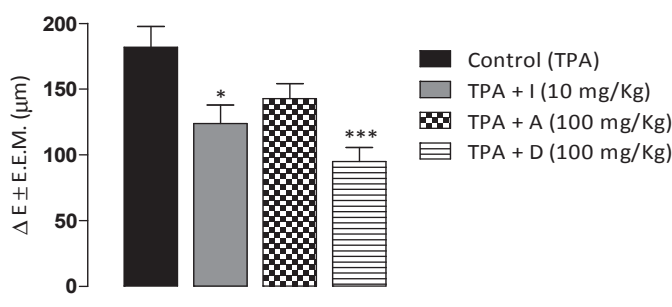
**Figura IV.24. Efecte a) d'àcid el·làgic (E) i b) apocinina (A) en l'activació d'Akt induïda per DSS.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa de les formes fosforilades i no fosforilades d'Akt, i GAPDH com a control de càrrega. La intensitat de l'expressió relativa (%) es va calcular mitjançant un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. L'expressió citosòlica de p-Akt va ser normalitzada respecte a Akt. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

### IV.1.3. INFLAMACIÓ AURICULAR AGUDA INDUÏDA PER TPA

L'aplicació tòpica d'una única dosi de TPA en l'orella del ratolí (2,5 µg/orella) desencadena un procés inflamatori agut que aconsegueix un màxim a les 4 h. L'administració oral d'apocinina i diapocinina (100 mg/kg) 1 h abans de l'aplicació de TPA va reduir l'edema mesurat a les 4 h de la inducció (Taula IV.11), encara que aquest efecte va resultar significatiu tan sols per a diapocinina, amb un 48% d'inhibició respecte al control, fins i tot superior al del fàrmac de referència, (Figura IV.25).

**Taula IV.11. Efecte d'apocinina (A) i diapocinina (D) sobre l'edema auricular en el model agut induït per aplicació tòpica de TPA.** Indometacina (I) com a fàrmac de referència. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs grup control (*t* de Dunnett,  $n = 6-8$ ).

Grup	$\Delta E \pm E.E.M$ ( $\mu\text{m}$ )	% I
Control (TPA)	$181 \pm 16$	-
TPA + I (10 mg/kg)	$123 \pm 14^*$	32
TPA + A (100 mg/kg)	$142 \pm 11$	21
TPA + D (100 mg/kg)	$94 \pm 10^{***}$	48



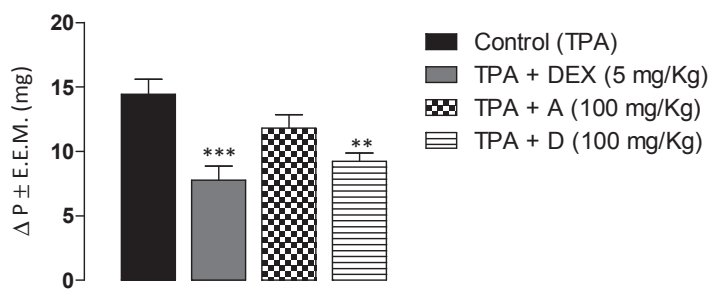
**Figura IV.25. Efecte d'apocinina (A) i diapocinina (D) sobre l'edema auricular induït per aplicació tòpica de TPA.** Després de 4 h de la inducció es va determinar l'espessor de les orelles. Els valors s'expressen com la mitjana de l'increment de l'espessor de cada orella ( $\Delta E$ )  $\pm$  E.E.M. ( $\mu\text{m}$ ) entre les 0 i les 4 h. Indometacina (I) com a fàrmac de referència. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs grup control (*t* de Dunnett,  $n = 6$ ).

#### IV.1.4. INFLAMACIÓ AURICULAR CRÒNICA INDUÏDA PER APLICACIÓ REPETIDA DE TPA

L'aplicació tòpica de dosis repetides de TPA en l'orella del ratolí (2  $\mu\text{g}$ /orella) va induir una resposta inflamatòria excessiva i perllongada en el temps. En aquest cas, tan sols l'administració oral de diapocinina (100 mg/kg) respecte a apocinina (100 mg/kg) va contribuir significativament a millorar el procés inflamatori (Taula IV.12), reduint l'increment de pes de les orelles al finalitzar l'experiència un 36% respecte al grup control (Figura IV.26).

**Taula IV.12. Efecte d'apocinina (A) i diapocinina (D) sobre l'edema auricular induït per aplicació tòpica repetida de TPA.** Dexametasona (DEX) com a fàrmac de referència. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs grup control (*t* de Dunnett,  $n = 6-8$ ).

Grup	$\Delta P \pm E.E.M$ (mg)	% I
Control (TPA)	$14,44 \pm 1,15$	-
TPA + DEX (5 mg/kg)	$7,78 \pm 1,09^{***}$	46
TPA + A (100 mg/kg)	$11,82 \pm 1,03$	18
TPA + D (100 mg/kg)	$9,25 \pm 0,63^{**}$	36

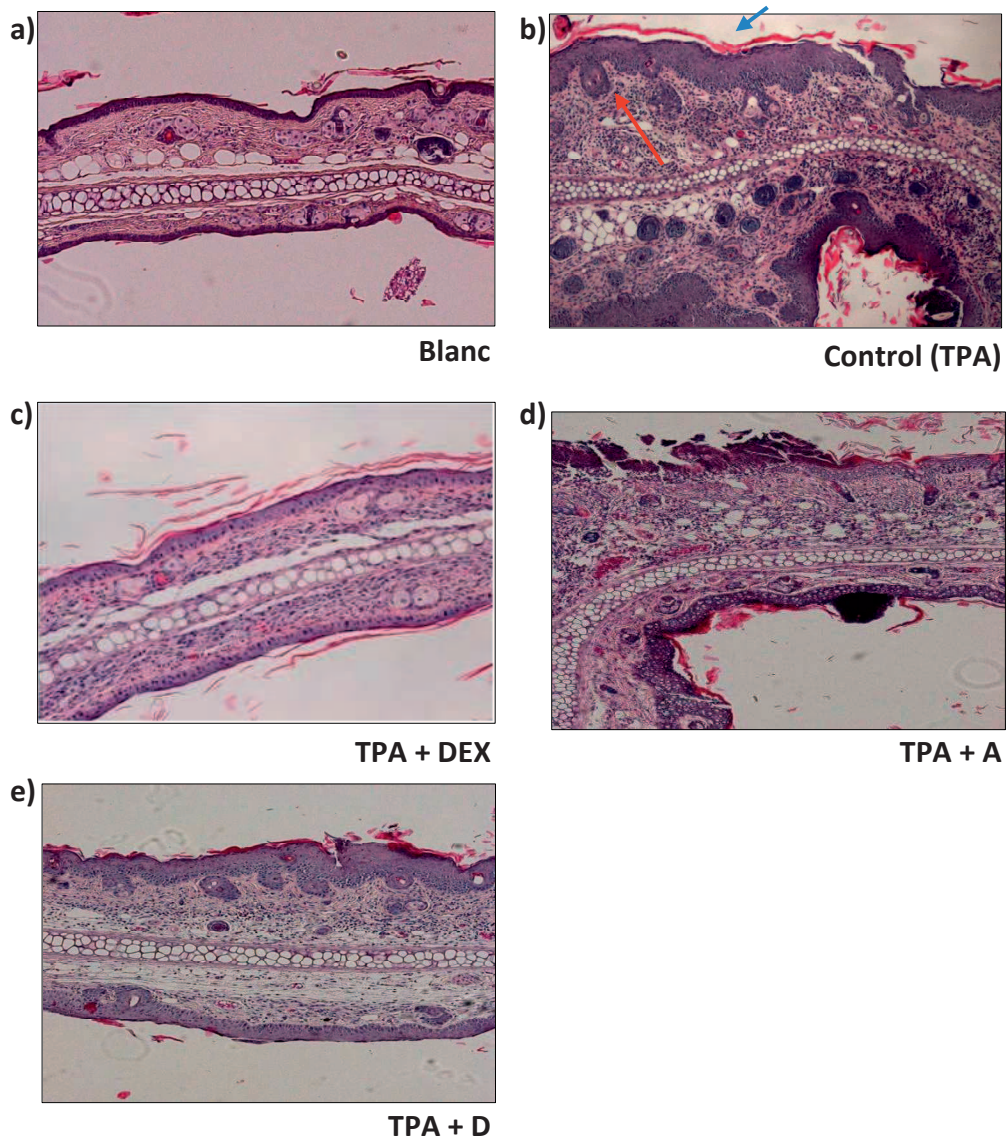


**Figura IV.26. Efecte d'apocinina (A) i diapocinina (D) sobre l'edema auricular induït per aplicació tòpica repetida de TPA.** Després de 6 h de l'última administració, els animals es van sacrificar i les orelles es van pesar. Els valors s'expressen com la mitjana de l'increment de pes de cada orella ( $\Delta P$ )  $\pm$  E.E.M. (mg) respecte al grup blanc tractat amb acetona. Com a fàrmac de referència es va emprar dexametasona (DEX). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs grup control (*t* de Dunnett,  $n = 6-8$ ).

#### IV.1.4.1. Anàlisi histològica

Histològicament, l'aplicació de TPA a l'orella del ratolí evidenciava una lesió inflamatòria difusa afectant a la dermis, amb edema i infiltració cel·lular. A més, els teixits inflamats mostraven canvis epitelials, amb hiperplàsia epitelial hiperqueratòsica (fletxa blava, Figura IV.27b) i canvis cel·lulars reactius a la inflamació, com són les atípies reactives (fletxa roja, Figura IV.27b). El tractament amb apocinina (100 mg/kg) va induir una lleu milloria del procés inflamatori, mantenint un caràcter moderat (2 sobre 3; Figura IV.27d), amb una incrementada extravasació cel·lular en la dermis. En canvi, al grup tractat amb diapocinina (100 mg/kg), la lesió inflamatòria mostrava un caràcter lleu (1 sobre 3), on es van evidenciar uns canvis epitelials que van minvar junt amb una discreta hiperplàsia

epitelial sense hiperqueratosi. En canvi, es mantenen les atípies reactives així com una infiltració cel·lular que s'observava lleugerament reduïda respecte al grup control (Figura IV.27e).



**Figura IV.27. Anàlisi histològica.** Seccions d'orella del grup a) blanc, b) control, c) dexametasona (DEX), d) apocinina (A) i e) diapocinina (D) tenyides amb hematoxilina-eosina.  $\times 200$ .

#### IV.1.4.2. Estudi bioquímic

##### IV.1.4.2.1. Activitat MPO

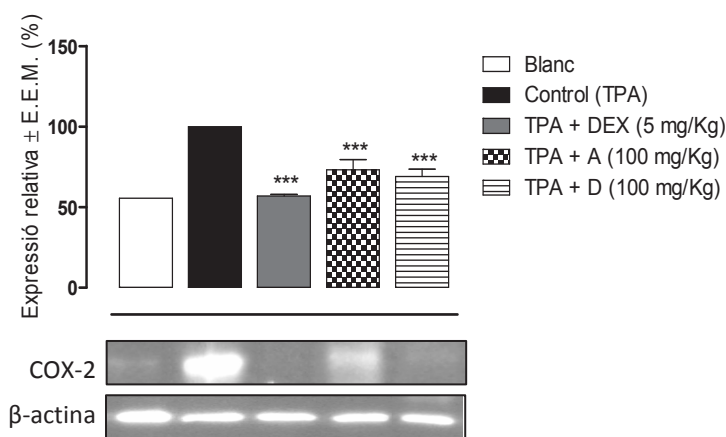
El procés inflamatori originat com a conseqüència de l'aplicació repetida de TPA es caracteritza per una massiva infiltració leucocitària amb predomini de neutròfils. Com una mesura indirecta d'aquesta infiltració neutrofílica, es va determinar l'activitat MPO als teixits afectats. Ni apocinina ni diapocinina van inhibir l'activitat de l'enzim (Taula IV.13), la qual cosa va estar correlacionada amb l'anàlisi histològica.

**Taula IV.13. Efecte d'apocinina i diapocinina sobre l'activitat MPO.** Dexametasona (DEX) com a fàrmac de referència. \*\*\* $p < 0,001$  vs grup control ( $t$  de Dunnett,  $n = 6-8$ ).

Grup	MPO (U/g de teixit $\pm$ E.E.M)	% I
Blanc	19,05 $\pm$ 2,81	-
Control (TPA)	62,50 $\pm$ 7,81	-
TPA + DEX (5 mg/kg)	21,80 $\pm$ 3,40***	94
TPA + A (100 mg/kg)	60,55 $\pm$ 15,13	5
TPA + D (100 mg/kg)	60,10 $\pm$ 12,46	6

##### IV.1.4.2.2. Expressió de COX-2

Estudis previs han demostrat que el TPA es un potent estimulador de l'expressió de COX-2 en diferents línies cel·lulars (Liu i Rose, 1996) i en models *in vivo* d'inflamació cutània (Chun i cols., 2003). L'anàlisi Western blot va revelar un increment de l'expressió de l'enzim als teixits inflamats. En canvi, el tractament amb apocinina i diapocinina (100 mg/kg) va inhibir significativament l'expressió de COX-2, amb un 60% i un 69% d'inhibició, respectivament (Figura IV.28).



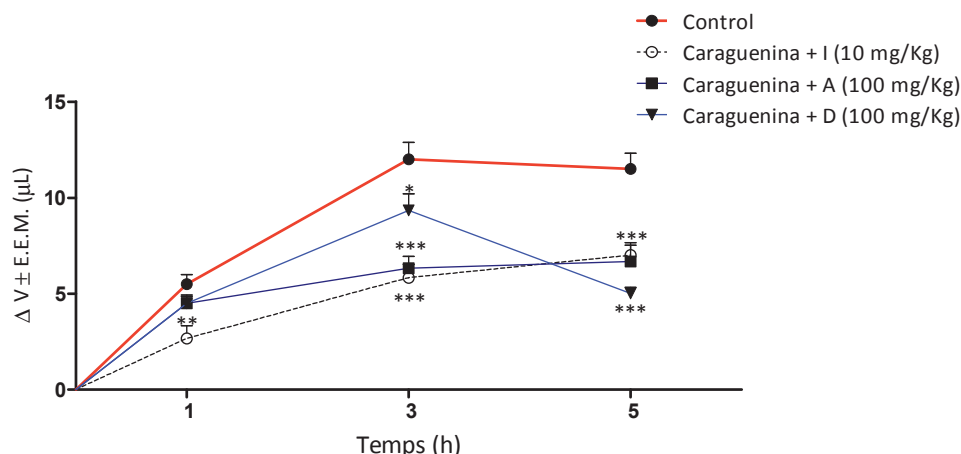
**Figura IV.28. Efecte d'apocinina i diapocinina sobre l'expressió de COX-2.** Les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges; els panells a peu de gràfica mostren una imatge representativa. La intensitat de l'expressió relativa (%) es va calcular per un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors de COX-2 es van normalitzar respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

#### IV.1.5. EDEMA PLANTAR INDUÏT PER CARRAGUENINA

L'efecte de l'administració oral d'apocinina i diapocinina 1 h abans de la injecció s.c. de carraguenina va induir una significativa reducció de l'edema plantar a les 3 h de la inducció, mantenint l'efecte 5 h després (Taula IV.14). En el cas concret de diapocinina, l'efecte inhibitori va ser superior a les 5 h de la inducció (Figura IV.29).

**Taula IV.14. Efecte d'apocinina (A) i diapocinina (D) (100 mg/kg) sobre l'edema ( $\Delta V$ ) induït per carraguenina en el peu del ratolí.** Indometacina (I) (10 mg/kg) com a fàrmac de referència. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs grup control (*t* de Dunnett,  $n = 6-8$ ).

Grup	$\Delta V \pm E.E.M$ ( $\mu L$ )			% I		
	1 h	3 h	5 h	1 h	3 h	5 h
Control	5,50 $\pm$ 0,50	12,00 $\pm$ 0,89	11,50 $\pm$ 0,81	-	-	-
Carraguenina + I	2,67 $\pm$ 0,67**	5,83 $\pm$ 0,70***	7,00 $\pm$ 0,52***	52	51	39
Carraguenina + A	4,50 $\pm$ 0,34	6,33 $\pm$ 0,61***	6,67 $\pm$ 0,99***	18	47	42
Carraguenina + D	4,50 $\pm$ 0,43	9,33 $\pm$ 0,88 *	5,00 $\pm$ 0,32***	18	22	57

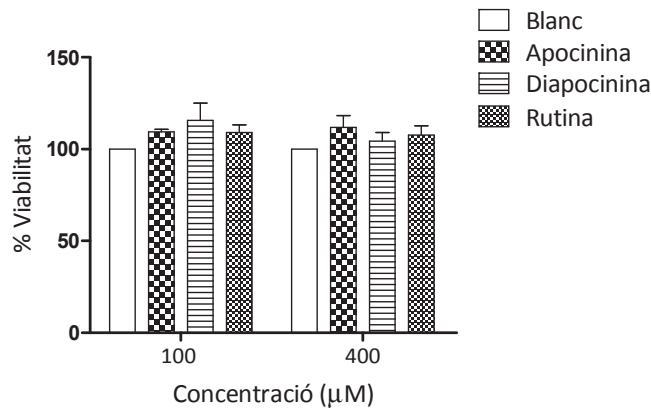


**Figura IV.29. Efecte d'apocinina (A) i diapocinina (D) sobre l'edema plantar induït per carraguenina.** El volum del peu de cada animal es va determinar a diferents temps (1, 3 i 5 h) després de la injecció s.c. de carraguenina. Els valors s'expressen com l'increment de volum ( $\Delta V \pm E.E.M.$  ( $\mu L$ ) respecte al grup blanc. Indometacina (I) com a fàrmac de referència. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Dunnett;  $n = 6$ ).

## IV.2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIINFLAMATÒRIA *IN VITRO* EN MACRÒFAGS RAW 264.7

### IV.2.1. CITOTOXICITAT

Prèvi a l'estudi de l'activitat *in vitro*, es va realitzar l'estudi de viabilitat cel·lular per mitjà de l'assaig de MTT, en presència dels compostos en estudi: apocinina, diapocinina i rutina. A les concentracions de 100 i 400  $\mu M$ , cap dels productes va resultar citotòxic (Figura IV.30), com es va poder observar per una viabilitat cel·lular que no es va veure afectada.



**Figura IV.30.** Percentatge de viabilitat cel·lular de macròfags RAW 264.7 tractats amb apocinina, diapocinina i rutina (100 i 400 µM).

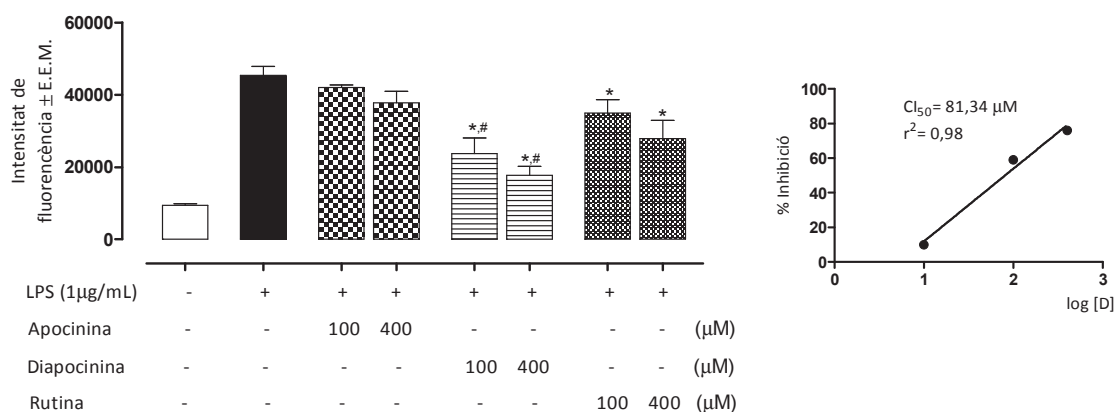
### IV.2.2. EFECTE SOBRE LA PRODUCCIÓ D'EROS

El pretractament de les cèl·lules amb diapocinina i rutina (100 i 400 µM) va inhibir significativament la producció intracel·lular d'EROS de manera dosi-dependent, com es va poder observar per la reducció de l'emissió de fluorescència induïda per l'addició de LPS al medi cel·lular. Apocinina, tan sols a la màxima concentració, va mostrar una lleugera inhibició, encara que no va aconseguir assolir la significació estadística (Taula IV.15). Per tant, l'efecte de diapocinina va ser significativament superior al de la seua precursora amb una concentració inhibidora 50 (CI<sub>50</sub>) de 81,34 µM, calculada per regressió lineal (Figura IV.31).



**Taula IV.15. Efecte d'apocinina (A), diapocinina (D) i rutina (R) sobre la producció intracel·lular d'EROs en macròfags RAW 264.7 induïda per LPS.** Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ ; grup d'apocinina (400  $\mu\text{M}$ ): # $p < 0,05$  (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).

Grup	Concentració ( $\mu\text{M}$ )	(Intensitat de fluorescència $\pm$ E.E.M.) $\times 10^{-3}$	% I
Blanc		9,46 $\pm$ 0,37	
Control (LPS)		45,36 $\pm$ 2,51	
LPS + A	100	42,03 $\pm$ 0,65	11
	400	37,83 $\pm$ 3,16	21
LPS + D	100	23,75 $\pm$ 4,35* <sup>#</sup>	59
	400	17,67 $\pm$ 2,52* <sup>#</sup>	76
LPS + R	100	34,98 $\pm$ 3,73*	30
	400	27,91 $\pm$ 5,00*	50



**Figura IV.31. Efecte d'apocinina, diapocinina i rutina en la producció intracel·lular d'EROs en macròfags RAW 264.7 induïda per LPS.** Les dades s'expressen com la mitjana de la intensitat de fluorescència  $\pm$  E.E.M. A la dreta percentatge d'inhibició de la producció d'EROs respecte al log de la concentració de diapocinina. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ ; grup d'apocinina (400  $\mu\text{M}$ ): # $p < 0,05$  (Bonferroni,  $n = 8-10$ ).

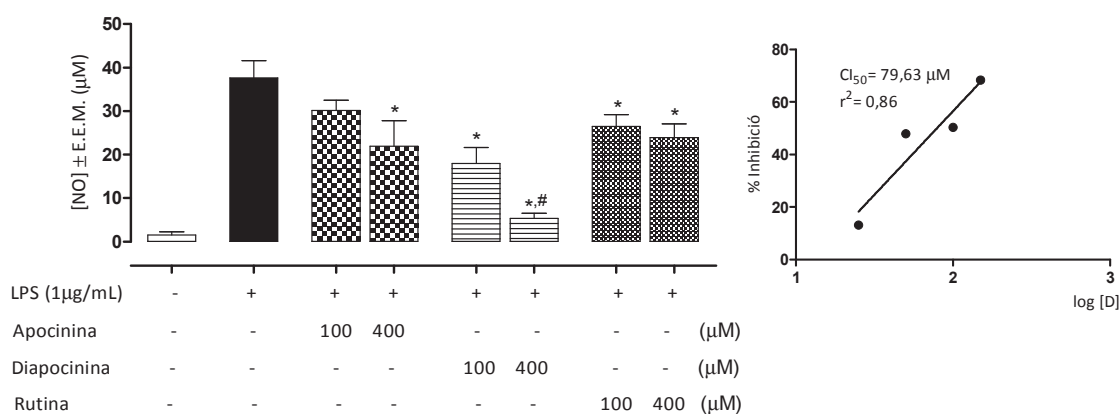
### IV.2.3. EFECTE SOBRE LA PRODUCCIÓ DE NO I L'EXPRESSIÓ D'INOS

L'increment en la producció de NO és un fenomen que es produeix després de l'estimulació dels macròfags amb LPS, i és emprat com un indicador d'una típica resposta inflamatòria. El tractament de les cèl·lules amb dosis baixes de diapocinina i rutina va reduir de forma significativa i dosi-dependent la producció de NO al medi de cultiu (Taula IV.16). Apocinina tan sols va ser efectiva a la dosi més elevada, sent l'activitat de

diapocinina, a aquesta dosi, significativament superior a la de la primera, resultant en una  $CI_{50}$  per a diapocinina de  $79,63 \mu\text{M}$  (Figura IV.32).

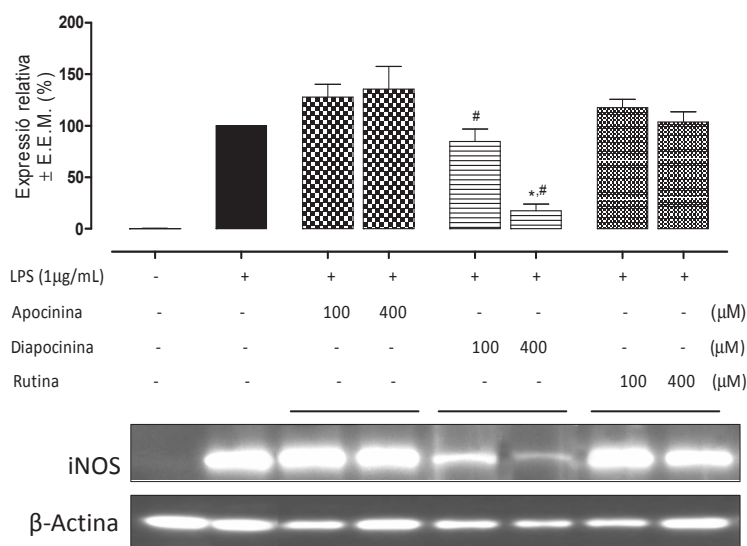
**Taula IV.16. Efecte d'apocinina (A), diapocinina (D) i rutina (R) sobre la producció de NO en macròfags RAW 264.7 induïda per LPS.** Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ ; grup d'apocinina ( $400 \mu\text{M}$ ): # $p < 0,05$  (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).

Grup	Concentració ( $\mu\text{M}$ )	[NO] $\pm$ E.E.M. ( $\mu\text{M}$ )	% I
Blanc		$1,51 \pm 0,77$	
Control (LPS)		$37,60 \pm 4,06$	
LPS + A	100	$30,18 \pm 2,31$	20
	400	$21,98 \pm 5,86^*$	42
LPS + D	100	$17,98 \pm 3,68^*$	52
	400	$5,35 \pm 1,15^{*,\#}$	86
LPS + R	100	$26,46 \pm 2,79^*$	30
	400	$23,94 \pm 3,12^*$	36



**Figura IV.32. Efecte d'apocinina, diapocinina i rutina en la producció de NO en macròfags RAW 264.7 induïda per LPS.** Les dades s'expressen com la mitjana de la concentració de nitrits en el medi de cultiu  $\pm$  E.E.M ( $\mu\text{M}$ ). A la dreta percentatge d'inhibició de la producció de NO respecte al log de la concentració de diapocinina. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ ; grup d'apocinina ( $400 \mu\text{M}$ ): # $p < 0,05$  (test de Bonferroni,  $n = 8-10$ ).

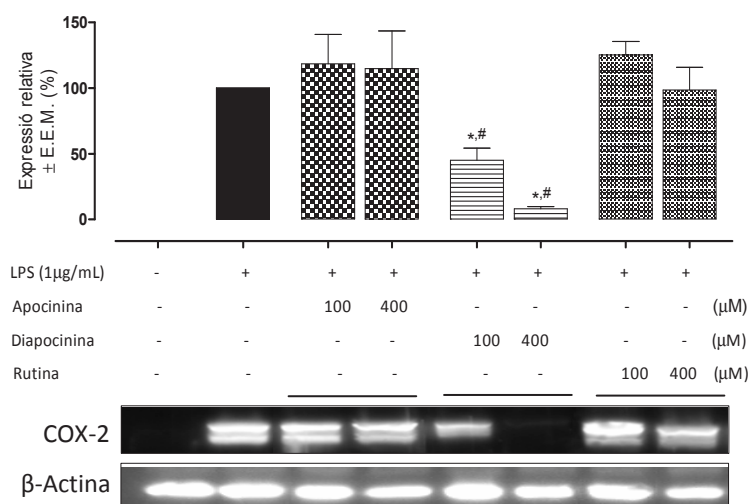
Per tractar de valorar si aquest efecte poguera ser induït per la reducció en l'expressió d'iNOS, es va determinar per anàlisi Western blot la seua expressió proteica al medi cel·lular. Tanmateix, l'estudi demostrava que tan sols el tractament amb diapocinina a la concentració més elevada, reduïa l'expressió de l'enzim un 88% (Figura IV.33).



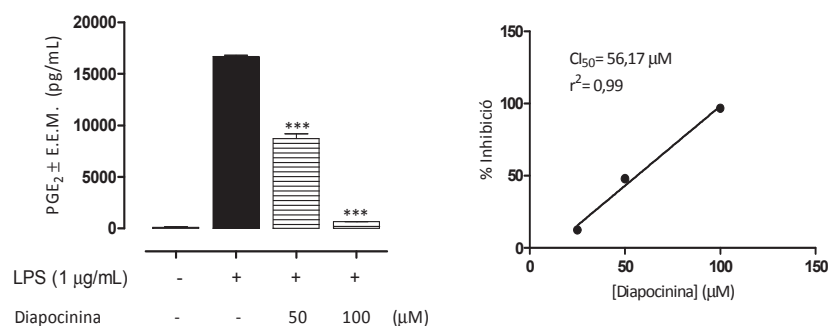
**Figura IV.33. Efecte d'apococinina, diapococinina i rutina sobre l'expressió proteica d'iNOS en macròfags RAW 264.7 induïda per LPS.** El panell inferior mostra una imatge representativa; les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica. La intensitat de l'expressió relativa (%) es va calcular per un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors d'iNOS es normalitzen respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ ; grup d'apococinina (400  $\mu$ M): # $p < 0,05$  (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).

#### IV.2.4. EFECTE SOBRE L'EXPRESSIÓ DE COX-2 I LA PRODUCCIÓ DE PGE<sub>2</sub>

L'estimulació per LPS va induir una producció massiva de PGE<sub>2</sub> que va estar correlacionada amb l'expressió de COX-2. A l'estudi, el tractament amb diapococinina a la menor concentració va reduir l'expressió de COX-2 un 55% (Figura IV.34). Paral·lelament, diapococinina també va reduir significativament la producció de PGE<sub>2</sub> de forma dosi-dependent, amb una Cl<sub>50</sub>, calculada per regressió lineal, de 56,17  $\mu$ M (Figura IV.35).



**Figura IV.34. Efecte d'apocinina, diapocinina i rutina en l'expressió de COX-2 en macròfags RAW 264.7 induïda per LPS.** El panell inferior mostra una imatge representativa; les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica. La intensitat de l'expressió relativa (%) es va calcular per un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors de COX-2 es normalitzen respecte a  $\beta$ -actina. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ ; grup d'apocinina (400  $\mu\text{M}$ ): # $p < 0,05$  (test de Bonferroni,  $n = 6-8$ ).



**Figura IV.35. Efecte de diapocinina sobre la producció de PGE<sub>2</sub>.** Les dades s'expressen com la mitjana de la concentració de PGE<sub>2</sub> al medi de cultiu  $\pm$  E.E.M. (pg/mL). A la dreta percentatge d'inhibició de la producció de PGE<sub>2</sub> respecte la concentració de diapocinina ( $\mu\text{M}$ ). Significativament diferent del grup control: \*\*\* $p < 0,05$  ( $t$  de Dunnett,  $n = 6-8$ ).

#### IV.2.5. EFECTE SOBRE LA PRODUCCIÓ DE CITOCINES PROINFLAMATÒRIES

Per tal d'assajar les propietats antiinflamatòries dels compostos en estudi, es va determinar el seu efecte en la producció de citocines proinflamatòries en cèl·lules RAW 264.7 estimulades amb LPS. D'una banda, apocinina i rutina, a les dos concentracions assajades, van resultar efectives en inhibir significativament la producció d'IL-6, a més de TNF- $\alpha$  tan sols en el cas d'apocinina. Per contra, diapocinina, a la menor concentració assajada (100  $\mu$ M), va evidenciar una activitat inhibidòria de la producció de les tres principals citocines inflammatòries –IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ – que va resultar fins i tot significativa respecte a la de la seua precursora (Taula IV.17).

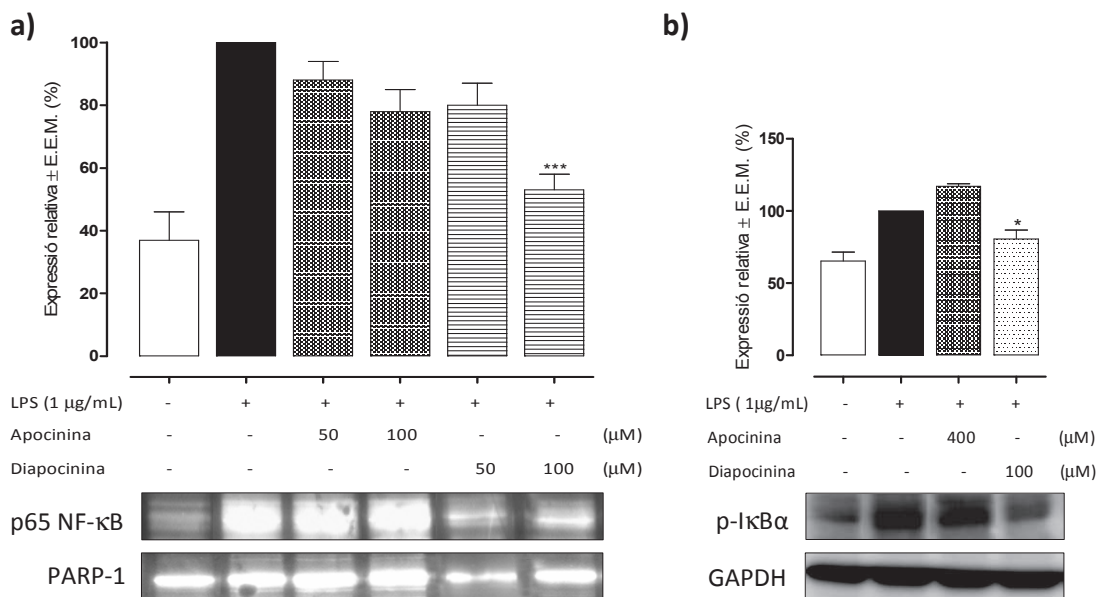
Taula IV.17. Efecte d'apocinina (A), diapocinina (D) i rutina (R) en la producció de citocines proinflamatòries en macròfags RAW 264.7 estimulats amb LPS. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ ; grup d'apocinina (400  $\mu$ M): # $p < 0,05$  (Bonferroni,  $n = 6-8$ ).

Grup	Concentració ( $\mu$ M)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (ng/mL)
Blanc		0,35 $\pm$ 0,31	72,82 $\pm$ 12,32	0,07 $\pm$ 0,01
Control (LPS)		156,74 $\pm$ 25,16	2289,03 $\pm$ 31,53	7,79 $\pm$ 1,05
LPS + A	100	84,73 $\pm$ 7,36*	1015,72 $\pm$ 93,44*	8,20 $\pm$ 1,06
	400	63,08 $\pm$ 6,13*	567,47 $\pm$ 59,93*	9,87 $\pm$ 2,48
LPS + D	100	19,32 $\pm$ 5,85*, #	82,09 $\pm$ 19,66*, #	0,25 $\pm$ 0,12*, #
	400	12,53 $\pm$ 2,13*, #	64,53 $\pm$ 15,01*, #	0,01 $\pm$ 0,01*, #
LPS + R	100	112,48 $\pm$ 21,64	1893,50 $\pm$ 236,62*	8,85 $\pm$ 0,59
	400	123,46 $\pm$ 17,44	1613,11 $\pm$ 131,54*	4,93 $\pm$ 1,66

#### IV.2.6. EFECTE EN L'ACTIVACIÓ DE NF- $\kappa$ B

El factor de transcripció NF- $\kappa$ B és activat pel LPS i és ben conegut per controlar l'expressió de gens implicats en la supervivència cel·lular així com d'enzims i citocines proinflamatòries. A l'estudi, la subunitat p65 del factor de transcripció es va observar incrementada al nucli cel·lular després de l'estimulació amb LPS. A la concentració de 100  $\mu$ M, el

tractament amb diapocinina va resultar més efectiu que apocinina en la inhibició de la translocació nuclear de p65, amb un 74% i un 19% d'inhibició, respectivament (Figura IV.36a). A més, es va determinar l'expressió citoplasmàtica de la forma fosforilada de l'inhibidor del factor de transcripció NF- $\kappa$ B (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ). Com calia esperar, la mateixa concentració de diapocinina va inhibir la fosforilació d'I $\kappa$ B $\alpha$  un 56% (Figura IV.36b).



**Figura IV.36. Efecte d'apocinina i diapocinina en l'activació de NF- $\kappa$ B en macròfags RAW 264.7 induïda per LPS.** a) Translocació nuclear de p65 i b) expressió citoplasmàtica de p-I $\kappa$ B $\alpha$ . El panell inferior mostra una imatge representativa d'un Western blot; les gràfiques de barres representen les dades derivades de l'anàlisi densitomètrica de totes les imatges obtingudes. La intensitat de l'expressió relativa (%) es calcula per un software d'imatge considerant el grup control amb un 100% d'expressió. Els valors de p65 i p-I $\kappa$ B $\alpha$  es normalitzen respecte a PARP-1 i GAPDH, respectivament. Significativament diferent del grup control: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  ( $t$  de Dunnett,  $n = 6-8$ ).



V. DISCUSSION

---





Els compostos fenòlics són un tipus de metabòlits secundaris de plantes considerats responsables del seu efecte preventiu de les principals malalties cròniques contemporànies i als que s'han dirigit nombrosos estudis per avaluar la seua activitat. Estudis epidemiològics han posat de manifest el seu potencial i rellevància nutricional dins d'una dieta saludable (Rusell i Duthie, 2011). S'estima que el seu consum mitjà en humans a partir d'una dieta basada en productes d'origen vegetal és aproximadament d'1 g al dia, superior fins i tot al consum de vitamines C i E i  $\beta$ -carotè. Els seus efectes promotors de la salut inclouen l'alleujament de malalties humanes amb un component inflamatori, algunes de les quals son simulades experimentalment en models animals. A més, tenen activitat antioxidant, anticancerígena i efectes sensibilitzants a la insulina (Shapiro *et al.*, 2007), i d'acord amb estudis epidemiològics, redueixen la malaltia cardiovascular (Álvarez-Suárez *et al.*, 2014). No obstant això, la baixa disponibilitat i l'ampli i diferent metabolisme hepàtic i intestinal, han obstaculitzat la caracterització del seu paper en el tractament o la prevenció de diverses malalties.

Després de la seua ingesta, els compostos fenòlics són reconeguts pel cos humà com a xenobiòtics. S'ha estimat que aproximadament entre un 5-10% s'absorbeix a l'intestí prim i el percentatge romanent pot acumular-se al lumen de l'intestí gros on està subjecte a l'activitat enzimàtica dels bacteris intestinals, que transformen aquests compostos més complexos en simples metabòlits fenòlics, que en moltes ocasions es consideren els principals responsables de la seua activitat (Rusell i Duthie, 2011).

En aquest sentit, els compostos fenòlics constitueixen una de les principals teràpies emprades en CAM per al tractament d'alguna de les formes de MII, junt a dietes específiques i probiòtics, entre altres. D'acord amb Wong *et al.* (2009), més del 50% de pacients pediàtrics amb MII han emprat alguna forma de CAM relacionada amb la teràpia natural. Recentment, Suskind *et al.* (2013) van publicar els primers resultats sobre la tolerància de curcumina en aquests pacients. L'estudi pilot va suggerir que curcumina podria ser emprada com un adjuvant, combinat amb medicina convencional, sense cap efecte advers clínicament significatiu.

El present treball ha abordat l'avaluació de les propietats protectores de tres compostos amb estructura fenòlica –àcid el·làgic, apocinina i rutina–, administrats junt amb el pinso, en una colitis experimental en ratolins induïda per l'agent químic DSS amb l'objectiu d'establir el seu potencial com agents terapèutics o coadjuvants en el tractament de la CU en humans.

En el model d'inflamació aguda, quan la malaltia es manifesta de forma severa, es van observar diferències d'activitat entre els tres compostos, fet que va permetre seleccionar un d'ells amb una marcada activitat antiinflamatòria, avaluar el seu efecte i, fins i tot el del seu metabòlit actiu, front a un tipus cel·lular àmpliament involucrat en el desenvolupament de la malaltia. Aquest estudi *in vitro* comparatiu es va reforçar, a més, amb l'avaluació de l'activitat en altres estudis d'inflamació experimental.

## ÀCID EL·LÀGIC, APOCININA I RUTINA EN LA CU AGUDA EXPERIMENTAL

L'addició del DSS a l'aigua de beguda dels animals indueix uns símptomes clínics de pèrdua de pes, femtes amb sang i diarrea, característics de la CU humana. Histològicament es pot observar una excessiva infiltració cel·lular, pèrdua de les criptes epitelials, atrofia de les vellositats i ulceració. Vowinkel *et al.* (2004) van suggerir que es necessària una dosi superior a 30 mg de DSS/g de pes corporal ingerida durant 7 dies per tal de reproduir de forma fiable la colitis experimental, fet que van justificar per l'activitat MPO i l'anàlisi histològica. Al present treball, la CU aguda va ser induïda amb una dosi diària mitjana entre 16-20 mg de DSS/g de pes corporal, el que va resultar, després de 7 dies, en una dosi superior a la fixada pels investigadors, i suficientment elevada per a induir de forma severa la malaltia. A la fi de l'experiència, la fase aguda va suposar una adequada correlació entre els signes clínics observats i els marcadors inflamatoris, així com els canvis histopatològics induïts.

Com una primera línia de tractament en el model agut, la **sulfasalazina** (50 mg/kg/d) va produir una lleugera milloria dels paràmetres clínics de la malaltia, consistent amb l'anàlisi macroscòpica posterior. Aquest efecte, en concordança amb l'estudi de Sann *et al.* (2013), suggereix que el període de tractament emprat amb la sulfasalazina va ser massa curt per a ser efectiu, possiblement com a conseqüència d'una insuficient exposició colònica, que va resultar, fins i tot, en una lleu milloria del procés inflamatori. A més, mentre la sulfasalazina s'empra generalment en la malaltia crònica humana per a prevenir recaigudes, així com en la malaltia aguda lleu a moderada, no s'utilitza habitualment en el tractament dels atacs aguts greus, per als

quals hi han tractaments més efectius, com els corticoides (Costa *et al.*, 2012).

En l'estudi, la dosi d'**àcid el·làgic** incorporada en la dieta habitual dels ratolins durant 7 dies (5 g/kg/d) no va ser suficient per tal de prevenir la inflamació aguda intestinal induïda per DSS, si sols es tenen en compte els paràmetres clínics i l'anàlisi histològica. En canvi, l'avaluació de mediadors inflamatoris revelava una reducció significativa de les concentracions de les citocines proinflamatòries TNF- $\alpha$  i IL-6 en la mucosa del còlon, i de TNF- $\alpha$  en el sèrum, així com una inhibició de l'expressió proteica dels enzims COX-2 i iNOS, possiblement degut al seu efecte sobre el factor de transcripció NF- $\kappa$ B. A més, mitjançant la regulació de l'enzim iNOS, l'àcid el·làgic també va prevenir la producció de NO en la mucosa del còlon, especialment en la zona distal.

La recerca en els efectes beneficiosos associats a les dietes riques en aliments d'origen natural és una tasca complicada. Pareix ser que aquests efectes es manifesten mitjançant una àmplia varietat de substàncies i dels seus productes de transformació metabòlica, i que, a més, aquests són el resultat d'una llarga exposició a les dietes (Clifford i Brown, 2005). Lei *et al.* (2003) van observar que després de la ingestió d'un extracte de magrana –fruita amb un alt contingut en àcid el·làgic– en rates, es produïa una pobra absorció i una ràpida eliminació d'àcid el·làgic. És clar que es tracta d'un àcid dèbil que és ionitzat a pH fisiològic i és poc soluble en aigua (aproximadament 9,7  $\mu$ g/mL) (Bala *et al.*, 2006), la qual cosa fa, com ocorre amb compostos similars, que sovint siguin difícils de processar en diverses formes de dosificació que permeten una adequada biodisponibilitat oral per a estudis clínics i la seua posterior

comercialització. Soh *et al.* (2009), per exemple, van observar que un tractament de 4 dies del polifenol (1g/kg/d) per via oral front a la malària va resultar poc efectiu respecte a una menor dosi administrada per via intraperitoneal. Per contra, Singh *et al.* (2009), van reportar l'efecte protector per via oral d'un extracte hidroalcohòlic de les flors de la magrana i la seua fracció enriquida en àcid el·làgic (100 i 200 mg/kg) en el model de colitis induïda per DSS en ratolins, mentre que Ogawa *et al.* (2002), van demostrar que l'administració oral de microesferes d'àcid el·làgic protegia de forma més eficient front a la malaltia respecte al compost en forma lliure. Per tant, la moderada activitat de l'àcid el·làgic en l'experiència podria explicar-se per la reduïda exposició i la pobra absorció resultant d'aquesta via d'administració, junt amb la pronunciada gravetat del model agut experimental.

Pel que fa a l'**apocinina**, demostrà un efecte protector quan va ser suplementada en la dieta habitual dels ratolins durant 7 dies a la mateixa dosi (5 g/kg/d). L'acetofenona va reduir la severitat de la malaltia atenuant les característiques macroscòpiques i histopatològiques induïdes al còlon. Es va observar una reducció en l'expressió gènica i proteica de citocines com IL-6 i TNF- $\alpha$ ; una reducció de l'expressió proteica dels enzims iNOS i COX-2, acompanyada d'una menor producció dels seus metabòlits, NO i PGE<sub>2</sub>; així com una reduïda activació dels factors de transcripció NF- $\kappa$ B i STAT3 als teixits intestinals. És ben conegut que, en condicions patològiques, una concentració elevada d'EROs és la responsable de l'expressió de proteïnes redox-sensibles com el NF- $\kappa$ B i les MAPKs (Bowie i O'Neill, 2000), així com del conseqüent dany endotelial mediat per PARP i la infiltració de cèl·lules PMNs al teixit afectat. En aquest context, com que l'apocinina és un conegut inhibidor del complex

enzimàtic NADPH oxidasa i, per tant actua per mitjà del bloqueig de la producció d'EROs, Impellizzeri *et al.* (2011) proposaren que aquest fora el seu mecanisme d'acció en la reducció dels efectes danyosos al teixit pulmonar inflammat en els estadis primerencs del procés inflamatori. No obstant això, atès que el paper de la NADPH oxidasa en la CU induïda per DSS és menor que aquell d'iNOS, pareix clar que podria haver-hi un mecanisme addicional involucrat en el nostre model experimental. Krieglstein *et al.* (2001) van demostrar que la influència d'una deficient activitat d'iNOS en la malaltia tan sols resulta en una protecció parcial, i que el bloqueig simultani d'ambdós, iNOS i NADPH oxidasa, és més efectiu en protegir als ratolins front a la CU induïda per DSS. Aquesta protecció addicional podria explicar-se per l'efecte del NO en inhibir directament la NADPH oxidasa, i així, limitar la generació de superòxid. La supressió de la producció de NO comporta un significatiu augment de l'activitat de l'oxidasa i, amb açò, un resultant procés inflamatori més sever. Per tant, el bloqueig combinat d'iNOS i de la NADPH oxidasa podria justificar la protecció d'apocinina front a la colitis.

Durant diversos processos patològics com són la MII, l'aterosclerosi, les infeccions o les respostes asmàtiques, s'indueix l'expressió de VCAM-1 a les cèl·lules endotelials (Cook-Mills, 2002). En la MII, una incrementada expressió de VCAM-1 a l'endoteli vascular intestinal, principalment induïda per les EROs (Pavlick *et al.*, 2002), accelera l'adhesió de leucòcits a les cèl·lules endotelials i la migració als llocs d'inflamació amb el consegüent dany a la mucosa (Rijcken *et al.*, 2002). La importància fonamental d'aquesta incrementada expressió intestinal de VCAM-1 en la colitis està suportada per estudis que demostren que el reclutament de leucòcits i el dany a la mucosa als models de colitis experimental són

bloquejats per la immunoneutralització de la molècula d'adhesió (Sans *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 2000). A més, l'enzim antioxidant SOD se suggereix que podria alleujar la colitis induïda per TNBS amb la inhibició de l'expressió de VCAM-1 i el reclutament de leucòcits a l'intestí inflammat per mitjà del bloqueig de la producció d'EROs (Seguí *et al.*, 2004). En l'estudi es va demostrar que apocinina redueix l'expressió gènica endotelial de VCAM-1 a la mucosa del còlon procedent d'animals amb un brot inflamatori agut de CU induïda per DSS, amb la conseqüent reducció significativa de la infiltració de leucòcits, determinada per l'activitat MPO al còlon, i les concentracions de citocines inflamatòries IFN- $\gamma$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ . Aquests efectes es correlacionen amb estudis recents que demostren que apocinina indueix un descens immediat de l'expressió endotelial de VCAM-1 en el tractament d'estadis primerencs d'aterosclerosi en ratolins (Khanicheh *et al.*, 2013) i d'altres molècules d'adhesió com ICAM-1 i P-selectina, així com de l'activitat de MPO en un model d'inflamació pulmonar aguda (Impellizzeri *et al.*, 2011).

En referència al flavonoide **rutina**, la seua suplementació en la dieta va mostrar efectes beneficiosos front a un atac agut de colitis. D'una banda, va alleujar els paràmetres de l'IAM i la relació pes/longitud del còlon, i va atenuar la producció local de les citocines inflamatòries IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , actuant a nivell transcripcional, així com de TNF- $\alpha$  a nivell sèric. D'altra banda, va inhibir la producció de PGE<sub>2</sub> i de NO a la mucosa del còlon, com a conseqüència de la reducció de l'expressió de COX-2 i iNOS, via inhibició dels factors de transcripció NF- $\kappa$ B i STAT3. A més, encara que a nivell transcripcional s'evidenciava una subtil reducció en l'expressió gènica d'IL-1 $\beta$ , no va ser capaç d'inhibir la seua producció en la mucosa colònica. Aquest fet difereix de l'estudi de Kwon *et al.* (2005) que



varen demostrar l'activitat de la rutina en un model de CU per DSS administrada en la dieta a dosis mínimes (0,1-0,001%). Els investigadors van atribuir el paper beneficiós de la rutina en la prevenció i curació de la colitis al seu efecte sobre la citocina IL-1 $\beta$ . Aquest resultat contradictori podria atribuir-se a les diferents condicions del treball, com per exemple la dosi d'agent irritant utilitzada, període de tractament, etc.

### **ÀCID EL·LÀGIC, APOCININA I RUTINA EN LA CU CRÒNICA EXPERIMENTAL**

El model de CU aguda tracta de reproduir el que, en el desenvolupament de la malaltia humana, seria un brot agut, el qual està establert que deu tractar-se amb corticoides o immunosupressors. Degut a les conegudes complicacions del tractament crònic amb aquests fàrmacs i, que en la majoria dels casos, el brot sorgeix malgrat que el pacient es troba en tractament, es va plantejar a l'estudi avaluar el comportament d'àcid el·làgic, apocinina i rutina en un model crònic d'inflamació intestinal amb l'administració dels productes a llarg termini incorporats al pinso habitual dels animals. El model crònic simula la malaltia humana on s'alternen exacerbacions que coincideixen amb l'administració de DSS, amb períodes de completa remissió o quiescència coincidents amb cicles d'aigua on els símptomes desapareixen o són molt dèbils.

Al finalitzar l'estudi, en aquest model crònic no es va observar una bona correlació entre els signes clínics i els marcadors inflamatoris, tan sols la pèrdua de la consistència de les femtes i algun rastre de sang, fet que està en concordança amb l'estudi de Melgar *et al.* (2005).

L'administració d'**àcid el·làgic** durant 56 dies en la dieta (1,25 g/kg/d), va suposar una reducció significativa en l'extensió de la malaltia, acompanyada d'una significativa milloria dels signes clínics. Per tant, l'àcid

el·lògic va ser efectiu, fins i tot a menor dosi però durant un llarg període de temps, front a un major període d'exposició a DSS a concentracions més baixes, el que suggereix que el període de tractament en el model agut va ser massa curt per a que el producte fora efectiu.

Atès que la producció d'EROs és un mecanisme per mitjà del qual la resposta inflamatòria s'amplifica a sí mateixa, una qüestió clau és si **apocinina** té un efecte beneficiós en una etapa tardana de la malaltia per tal de reduir el procés inflamatori i aturar la progressió de la malaltia. De la mateixa manera que en el model agut, apocinina va suposar un potencial efecte beneficiós en el procés inflamatori crònic, on va reduir de forma significativa els paràmetres clínics de la malaltia.

Encara que l'administració de **rutina** va produir una milloria dels signes clínics i paràmetres macroscòpics de la malaltia, no es va poder continuar l'estudi per problemes externs a la nostra voluntat.

És ben conegut que una anormal cascada de senyalització té un paper rellevant en el procés inflamatori, i pot permetre la desregulació de la resposta inflamatòria, la qual cosa és un punt clau de desenvolupament de la malaltia. Les vies de senyalització principalment incloses en el procés inflamatori són: el NF- $\kappa$ B, les MAPKs i la PI3K/Akt. D'una banda, el factor NF- $\kappa$ B és marcadament actiu a l'intestí inflammat i en especial a les cèl·lules epitelials i macròfags. Fins i tot s'ha establert que el seu grau d'activació es correlaciona amb la severitat de la inflamació intestinal (Rogler *et al.*, 1998). Per tant, el factor de transcripció es considera una excel·lent diana per al desenvolupament d'agents farmacològics per a la malaltia (Atreya *et al.*, 2008).

En el model crònic de colitis, es va observar un increment significatiu de l'activitat del factor NF- $\kappa$ B, amb una expressió augmentada de la subunitat p65 al nucli cel·lular. D'igual manera que a l'estudi agut, tant l'àcid el·làgic com apocinina van reduir aquesta activació, un efecte directament atribuït a la capacitat d'ambdós productes de prevenir la degradació del seu inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ . Aquest fet concorda amb estudis previs on l'àcid el·làgic protegeix front a la MC per mitjà de la seua influència sobre la cascada inflamatòria bloquejant el factor de transcripció (Rosillo *et al.*, 2011, 2012). De forma semblant, s'ha demostrat que el tractament a llarg termini amb apocinina inhibeix el factor de transcripció amb el consegüent alleujament del procés inflamatori en patologies com la hipertensió o la diabetis (Pechánová *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2010).

Els enzims induïbles COX-2 i iNOS són proteïnes que estan àmpliament expressades als llocs d'inflamació. La seua activació estimula una excessiva producció de mediadors inflamatoris que pot ser perjudicial per a la integritat del còlon i pot contribuir al desenvolupament del dany intestinal. D'una banda, l'activació de COX-2 indueix la producció de PGE<sub>2</sub> i tromboxà B<sub>2</sub>, els quals són mediadors inflamatoris que contribueixen a la hiperèmia, a l'edema i, fins i tot, a la disfunció intestinal. D'altra banda, l'activació d'iNOS provoca una excessiva producció de NO que pot causar dany intestinal per mitjà de la generació d'ERNs (Talero *et al.*, 2011). A més, iNOS actua de forma sinèrgica amb COX-2 promovent la reacció inflamatòria (Krauss i Arber, 2009). A l'estudi de CU crònica, el tractament amb àcid el·làgic i apocinina durant 56 dies va reduir l'expressió proteica d'ambdós enzims.

Per tant, en conjunt, els resultats suggereixen que el tractament amb l'àcid el·làgic i apocinina es capaç de prevenir la degradació de la proteïna inhibidora  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , el que va induir el bloqueig de l'activació del factor nuclear NF- $\kappa$ B i la consegüent inhibició de l'expressió d'ambdós enzims induïbles.

Com a conseqüència d'estímuls fisiològics o patològics, el NF- $\kappa$ B indueix la producció d'IL-6, una citocina involucrada en el desenvolupament de la fase crònica de la malaltia i produïda principalment per macròfags CD11b+ de la *lamina propria* i cèl·lules T CD4+. Funcionalment, IL-6 estimula directament la supervivència i proliferació de les cèl·lules epitelials de l'intestí al lloc d'inflamació, el que promou la formació de tumors (Becker *et al.*, 2004). En l'estudi de Sánchez de Medina *et al.* (2010), els autors suggereixen que la reducció de l'expressió gènica d'aquesta citocina podria ser una estratègia terapèutica que podria potencialment contribuir a la resolució de la colitis. Prèviament, bloquejant el receptor de IL-6 es va demostrar que aquesta via de senyalització juga un paper fonamental en el desenvolupament de la colitis mitjançant l'activació de la via de senyalització de STAT3 (Atreya *et al.*, 2006). A més, s'ha vist un increment de cèl·lules epitelials positives a IL-6 i p-STAT3 en pacients amb CU respecte a voluntaris sans (Li *et al.*, 2010). Es creu que aquest factor de transcripció està involucrat en la progressió més que en l'inici de la malaltia, i s'ha demostrat que pot ser mediador de la resistència a l'apoptosi en la inflamació intestinal crònica (Atreya, 2000). En aquest sentit, existeix una recolzada evidència de que les estratègies dirigides a la via de senyalització de IL-6/STAT3 tenen un potencial superior per tractar la colitis de forma més efectiva. Les dades obtingudes confirmen els resultats d'altres estudis que demostren que el

tractament amb àcid el·làgic inhibeix la producció d'IL-6 (Umesalma i Sudhandiran, 2010). A més, els nostres resultats proporcionen evidència de que aquesta inhibició pren lloc a nivell transcripcional. Com s'esperava, l'expressió de la forma fosforilada de STAT3 al còlon va ser dràsticament suprimida en ratolins tractats amb àcid el·làgic i exposats a DSS.

Investigacions recents han demostrat que la producció d'EROs dependent de la NADPH oxidasa està involucrada en la fosforilació i activació de STAT3 per la Jak2 (Cheng *et al.*, 2013). En aquest context, a l'estudi s'ha demostrat que, en ambdós models de colitis, agut i crònic, l'apocinina va resultar efectiva en inhibir l'activitat del factor STAT3, la qual cosa va comportar una reducció en la citocina inflamatòria IL-6 principalment involucrada en aquesta via de senyalització.

Un important mediador que participa en iniciar i amplificar la cascada inflamatòria en la mucosa en pacients amb MII és TNF- $\alpha$ , i és també un dels més ben caracteritzats agonistes de la via de les MAPKs. Aquestes cinases són components de les cascades de senyalització en les quals diversos estímuls extracel·lulars convergeixen per iniciar la inflamació. Entre les principals MAPKs involucrades en la MII s'ha descrit que la forma fosforilada de p38 i, per tant, la seua activitat, estan especialment incrementades en la mucosa del còlon de pacients afectats per la malaltia (Docena *et al.*, 2010; Feng i Li, 2011). En particular, l'activació de la cinasa s'ha vist que contribueix a la modulació de la capacitat de transactivació de la subunitat p65 del NF- $\kappa$ B (Vanden Berghe *et al.*, 1998). Hollenbach *et al.* (2004) van trobar que l'inhibidor de p38 MAPK, SB203580, alleujava les alteracions histològiques i millorava els marcadors inflamatoris en un model experimental de colitis induït per DSS

en ratolins. En qualsevol cas, malgrat els efectes laterals obvis d'aquests inhibidors, la qual cosa limita la seua aplicació, està clar que p38 MAPK està activada de forma excessiva en pacients amb CU, i la seua inhibició pot efectivament suprimir la producció de citocines proinflamatòries i debilitar la inflamació intestinal.

En l'estudi, es va observar una activació excessiva de p38 MAPK durant el desenvolupament de la colitis crònica. En canvi, el tractament a llarg termini en la dieta suplementada amb àcid el·làgic va resultar en una significativa inhibició de l'expressió de la seua forma fosforilada, la qual cosa concorda amb els resultats de Rosillo *et al.* (2012) en un model de MC. Encara que es tracta de malalties diferents, van Beelen Granlund *et al.* (2013) han demostrat recentment, per mitjà d'una meta-anàlisi sobre l'expressió gènica del genoma del còlon, que existeix una certa similitud entre la mucosa inflamada de pacients amb CU i MC, el que suggereix que una vegada s'ha establert la inflamació, el mecanisme inflamatori en la mucosa és exactament el mateix en ambdues malalties.

Al seu torn, tant les MAPKs com la PKC participen en la fosforilació i activació de la NADPH oxidasa (El-Benna *et al.*, 2009). De fet, el pas clau en l'activació de la oxidasa és la fosforilació de la proteïna citosòlica p47phox (Klink *et al.*, 2009), la qual conté al menys sis llocs diana potencials de fosforilació de serina per a PKC i dos per a MAPKs (Reeves *et al.*, 1999; Yamamori *et al.*, 2000). D'igual manera que l'àcid el·làgic, la suplementació d'apocinina en la dieta a llarg termini va reduir significativament l'increment de la fosforilació de p38 MAPK al teixit del còlon. Aquest fet es correlaciona amb estudis anteriors on l'apocinina protegeix front al dany inflamatori pulmonar induït per LPS mitjançant la

inhibició de l'activació de p38 junt amb la reducció de l'activitat MPO, l'expressió de citocines com IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  i l'activació de NF- $\kappa$ B al teixit pulmonar (Chian *et al.*, 2012).

Un altra de les principals vies intracel·lulars activades en la MII és la PI3K/Akt. Hi ha evidència que la fosforilació d'Akt, dependent de PI3K, és un esdeveniment primerenc per a la senyalització en la CU (Huang *et al.*, 2011). De fet, la interacció de p-Akt amb PIP3 a la membrana cel·lular, estimula la fosforilació de dianes que regulen diverses funcions immunes i inflamatòries, incloent el reclutament de macròfags i neutròfils i l'activació de les cèl·lules T (Peng *et al.*, 2010). Una d'aquestes dianes és el NF- $\kappa$ B. La forma fosforilada d'Akt activa el factor de transcripció per mitjà de la fosforilació d'I $\kappa$ B, principalment I $\kappa$ B $\alpha$  (Sizemore *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2000; Gustin *et al.*, 2004), la qual cosa facilita l'expressió i secreció de citocines proinflamatòries que, en última instància, causen dany a la mucosa i comporten el desenvolupament de la colitis. Aquest fet s'evidencia amb l'inhibidor de PI3K $\gamma$ , AS605240, que ha demostrat efectes antiinflamatoris en diversos models murins experimentals, entre ells el de CU per DSS, on l'inhibidor va ser capaç de suprimir la infiltració de leucòcits i regular el desequilibri entre citocines pro- i antiinflamatòries (Peng *et al.*, 2010). Altres inhibidors de PI3K/Akt s'han suggerit com a potencials agents terapèutics en el tractament del càncer colorectal. Diverses investigacions associen aquesta via amb la tumorigènesi al còlon i, en aquest sentit, molts productes naturals s'han establert com efectius inhibidors de la via PI3K/Akt i en conseqüència eficaços agents antitumorals (Pandurangan *et al.*, 2013).

En concordança amb altres estudis, en el model crònic de CU induïda per DSS, la via PI3K/Akt es troba activada (Peng *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2011), com es va poder observar per l'augment de p-Akt a la mucosa del còlon dels animals afectats. En canvi, tant l'àcid el·làgic com apocinina van reduir de forma significativa l'expressió proteica de p-Akt a la mucosa. Resultats semblants han sigut reportats per a l'àcid el·làgic en un model de càncer colorectal en rates per mitjà de la inhibició de la senyalització PI3K/Akt, el que va resultar al seu torn en la modulació de molècules apoptòtiques com Bcl-2, Bax i la caspasa 3 (Umesalma i Sandhandiran, 2011), demostrant així el potencial efecte quimioprotector d'aquest polifenol.

D'altra banda, apocinina va ser emprada a l'estudi de Zhang *et al.* (2009) per bloquejar la NADPH oxidasa, la qual suggereixen els autors que està àmpliament involucrada en l'activació d'Akt per mitjà de mecanismes dependents de PI3K. Cal tindre en compte que les EROs procedents de la NADPH oxidasa tenen un paper important en la regulació d'aquesta via, induint l'activació d'Akt en una gran varietat de línies cel·lulars (Wang *et al.*, 2007). A més, diversos autors suggereixen que la via PI3K/Akt pot regular l'expressió de gens diana dependents del NF- $\kappa$ B (Martelli *et al.*, 2006) i induir la proliferació i inhibició de l'apoptosi en cèl·lules, el que segons Huang *et al.* (2011), podria alleujar la resposta inflamatòria i assolir un resultat terapèutic en pacients amb CU.

Amb la fi de corroborar algun dels resultats obtinguts *in vivo*, es va plantejar l'estudi de l'efecte d'aquests compostos sobre mediadors inflamatoris alliberats a partir de macròfags RAW 264.7, un tipus cel·lular àmpliament involucrat en el desenvolupament de la inflamació intestinal.



El principal escull que es presentà va ser la solubilitat de l'àcid el·làgic, la qual cosa va fer impossible estudiar-lo en les condicions establertes. D'altra banda, pel que fa a l'apocinina, aquesta es considera un profàrmac que sembla exercir el seu efecte per mitjà del seu metabòlit actiu, la diapocinina. Kanegae *et al.* (2010) reforcen la importància de la bioconversió d'apocinina en diapocinina per dur a terme els seus efectes biològics. A l'estudi, es va sintetitzar diapocinina i es van avaluar els seus efectes antiinflamatori i antioxidant comparats amb la seua precursora apocinina en diversos models experimentals *in vitro* i *in vivo*.

### **ESTUDIS IN VITRO**

El model de macròfags murins RAW 264.7 estimulats amb LPS es considera adequat per tal d'identificar dianes moleculars d'agents antiinflamatoris. Després del tractament amb LPS, la proteïna inhibidora I $\kappa$ B allibera el factor NF- $\kappa$ B que es transloca al nucli on indueix la transcripció de diversos gens diana. Altres factors transcripcionals són alhora activats per les cascades de senyalització de les MAPKs. Tots aquests esdeveniments culminen en un ràpid canvi en l'expressió de gens que codifiquen citocines, enzims proteolítics i hidrolítics, així com enzims que participen en la producció de mediadors inflamatoris (Burk *et al.*, 2009).

En resposta al LPS, els macròfags ràpidament indueixen l'alliberació de TNF- $\alpha$ , la qual actua induint i perpetuant la inflamació per reaccions autoimmunes que activen alhora cèl·lules T i macròfags per mitjà de la producció d'altres citocines com IL-6 i IL-1 $\beta$ , i molècules d'adhesió, responsables d'incrementar el reclutament de leucòcits al lloc d'inflamació (Ying *et al.*, 2013). A l'estudi, l'**apocinina** va inhibir l'alliberació de les

citocines TNF- $\alpha$  i IL-6, fins i tot a la dosi més baixa, mentre que la **diapocinina** va tindre un efecte inhibitori significativament superior al de la seua precursora per a les tres citocines esmentades. Aquest efecte concorda amb l'estudi de Kanegae *et al.* (2010) en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica estimulades amb LPS, on ambdós productes són efectius front a TNF- $\alpha$ , però de la mateixa manera, diapocinina mostra major eficiència.

L'excessiva generació de NO induïda pels macròfags activats actua com un mediador de dany cel·lular. Aquesta excessiva producció és per mitjà principalment d'iNOS, la qual pot ser al seu torn incrementada en macròfags (Xie i Nathan, 1994). A l'estudi, novament **diapocinina**, amb un efecte dosi-dependent, va ser més efectiva que apocinina en inhibir la producció de NO, i a més es va confirmar aquest fet en l'expressió proteica d'iNOS. Apocinina tan sols va ser efectiva a la dosi més elevada (400  $\mu$ M), la qual cosa es correlaciona amb un estudi previ que demostra que l'apocinina inhibeix la producció de NO al mateix model experimental a concentracions de l'ordre d'1 mM (Viačková *et al.*, 2011).

Si bé es coneix que la participació de les EROs està implicada en l'activació de la via de senyalització del NF- $\kappa$ B, el mecanisme molecular exacte d'aquesta activació roman pobrament definit. Diversos estudis demostren que els antioxidants poden funcionar com antiinflamatoris per mitjà de la reducció de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kim *et al.*, 2008). Les nostres dades demostren que diapocinina va ser més efectiva que apocinina en inhibir la producció intracel·lular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pels macròfags.

En l'estudi, l'apocinina no va ser efectiva en inhibir l'activació del NF- $\kappa$ B, en canvi la diapocinina va bloquejar l'activació del factor per mitjà

de la inhibició de la fosforilació del seu inhibidor  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . S'ha vist que l'apocinina redueix tant la translocació com l'expressió de la subunitat p47phox en la membrana de monòcits estimulats durant un llarg període de temps. A més, s'ha vist que la subunitat p47phox participa en l'activació del factor per mitjà de l'associació del seu domini SH3 amb la subunitat RelA del factor de transcripció en cèl·lules endotelials (Gu *et al.*, 2003). Per tant, es suggereix que l'efecte inhibitori de diapocinina en l'activació de NF- $\kappa$ B de macròfags, podria incloure la reduïda modulació de la subunitat de l'oxidasa i, tenint en compte que els efectes de p47phox i COX-2 van de la mà, aquest fet podria ser responsable de la reducció en l'expressió de l'enzim.

Per concloure, l'absència d'efecte d'apocinina en l'estudi *in vitro* podria explicar-se per l'ús d'una dosi insuficient. Malgrat que l'apocinina és àmpliament emprada per a bloquejar l'activitat de l'oxidasa a diversos estudis farmacològics, la seua dosi efectiva és de l'ordre mM (Kim *et al.*, 2008; Viačková *et al.*, 2011). D'altra banda, com que cal un ambient oxidatiu per tal d'activar l'acetofenona, la seua carència d'efecte podria ser deguda a la incapacitat del LPS d'induir una intensa generació d'EROs. Barbieri *et al.* (2004) van trobar que la quantitat d'EROs induïda per LPS en monòcits humans, era quatre vegades inferior a aquella producció procedent dels monòcits activats per TPA i zimosan opsonitzat, els quals són factors més efectius en modular l'activació d'apocinina per mitjà de la peroxidasa.

En l'estudi *in vitro*, el flavonoide **rutina** va ser efectiva en inhibir la producció d'EROs i NO a la mínima concentració, en canvi, no va mostrar cap efecte sobre l'expressió dels enzims iNOS i COX-2, la qual cosa

concorda amb estudis previs (Shen *et al.*, 2002b). Diversos autors posen de manifest que la rutina és convertida a quercetina per tal d'exercir el seu efecte (Morand *et al.*, 2000), per tant, és possible que, a diferència del que ocorre *in vitro*, els efectes observats en els estudis *in vivo* pogueren ser conseqüència de la seua hidròlisi.

## **APOCININA I DIAPOCININA EN ALTRES MODELS EXPERIMENTALS**

Els estudis *in vivo* d'inflamació aguda i crònica per aplicació tòpica de TPA i edema plantar per aplicació de carraguenina recolzen l'efectivitat superior de diapocinina observada en el model *in vitro*. Si bé diapocinina (100 mg/kg) va reduir l'espessor macroscòpic del lòbul de l'orella inflamada en els models agut i crònic, amb un efecte semblant als fàrmacs de referència, apocinina (100 mg/kg) no va aconseguir aquest efecte en cap dels models d'inflamació auricular emprats. Aquesta milloria induïda per diapocinina no va estar acompanyada d'una reducció de la infiltració de neutròfils en el model crònic, detectada histològicament i per la determinació de l'activitat MPO, la qual cosa podria suggerir que el seu efecte poguera estar mediat per la inhibició de l'activitat dels neutròfils infiltrats més que pel nombre o la viabilitat d'aquests. S'ha demostrat en ratolins que manquen d'una NADPH oxidasa funcional, que és l'activitat dels neutròfils infiltrats més que el seu nombre el que determina l'extensió del dany local i, per tant, inhibir l'activitat seria beneficiós per tal de limitar el dany tissular i accelerar la reparació/regeneració del teixit afectat (Gao *et al.*, 2002).

D'altra banda, s'ha vist que la supressió d'un dels gens responsable de la producció de COX-2 en ratolins és capaç de reduir el procés inflamatori en diversos models d'inflamació cutània, el que indica aquest

fet que els metabòlits de l'àcid araquidònic derivats de COX-2 exerceixen un paper crític en les malalties inflamatòries de la pell (Muller-Decker *et al.*, 2002). A l'estudi, apocinina i diapocinina van reduir de forma significativa l'expressió de COX-2 al teixit auricular.

En definitiva, establir un mecanisme exacte d'actuació dels compostos en estudi és una tasca complicada. Cal tindre en compte que nombrosos agents aïllats de fonts naturals han demostrat una important activitat antiinflamatòria per mitjà del bloqueig de NF- $\kappa$ B (Nam, 2006). Curcumina (Zhou *et al.*, 2011) o shikonina (Andújar *et al.*, 2012), entre altres, van suprimir a més la via de l'STAT3, el que suggereix que tenen múltiples dianes. L'àcid el·làgic, apocinina i rutina, fins i tot a dosis baixes possiblement assolides a l'intestí després de l'administració oral, modulen les principals vies implicades en el desenvolupament de la CU. Tanmateix, els compostos fenòlics són productes derivats en la majoria dels casos dels aliments i són utilitzats, a més, com a suplementes dietètics en càpsules, pols, tablettes o formes líquides, la qual cosa suposa que siguin reconeguts com a productes segurs (Espín *et al.*, 2007b). A més, atès que la solubilitat d'aquests productes limita l'elecció d'una via d'administració adequada i efectiva, una possibilitat de tractament recau en la suplementació, bé de la dieta habitual, bé de qualsevol fórmula nutricional completa amb aquests compostos. Com exemple, en els últims anys diverses fórmules de nutrició artificial han sigut modificades amb dosis farmacològiques de nutrients (glutamina i àcids grassos  $\omega$ -3), fibra dietètica, pre- i probiòtics i fins i tot, molècules no relacionades amb l'alimentació com TGF- $\beta$ , amb l'objectiu de reproduir l'alimentació saludable, de corregir la malnutrició, d'atenuar el catabolisme, la inflamació i la immunosupressió i incrementar la resolució i curació d'una malaltia (Shapiro *et al.*, 2007).

Pel que fa a la farmacocinètica dels compostos fenòlics, els estudis són escassos (He *et al.*, 2011). En aquest context, es va plantejar un estudi preliminar de l'absorció intestinal d'apocinina en un model experimental de perfusió *in situ* utilitzant rates sanes i malaltes de CU (Sánchez-Rivera, 2012) (Annex II). Després de l'administració oral d'apocinina, es va demostrar que l'absorció es produïa quasi totalment a l'intestí prim. No obstant això, aquest fenomen es va veure afectat quan la colitis estava establerta, el que suggereix que l'absorció es produïa per transport actiu i que el DSS pot repercutir en l'afinitat/velocitat màxima del portador involucrat. No obstant això, se sap que el DSS tan sols afecta a la mucosa del còlon i no hi ha evidències que demostren les alteracions induïdes en els transportadors. A més, l'absorció d'apocinina al còlon es va incrementar en rates amb CU, fet que podria interpretar-se per l'augment de la permeabilitat paracel·lular degut a l'alteració de l'estructura intestinal, per l'increment de cèl·lules inflamatòries i els seus productes d'inflamació, i per l'augment del flux sanguini a la mucosa ulcerada i inflamada. En qualsevol cas, la constant d'absorció d'apocinina al còlon va resultar suficient per tal de prevenir que la seua administració intracolònica en presència de CU podria derivar en l'aparició de nivells en sang que suposarien l'efecte protector de l'acetofenona front a la malaltia per acció sistèmica. Lamentablement, la baixa sensibilitat del procés analític no va fer possible quantificar amb exactitud la concentració plasmàtica d'apocinina després de la perfusió intestinal, encara que es van trobar traces d'apocinina i diapocinina. Per tant, l'estudi suggereix que després de la ingestió d'apocinina, aquesta s'absorbiria principalment al tracte intestinal i que l'afectació per DSS indueix un canvi en el patró d'absorció, incrementant la seua absorció al còlon, de tal manera que la

seua activitat antiinflamatòria en la CU no podria considerar-se merament tòpica, i que, com en els altres models d'inflamació, el producte responsable de l'activitat seria la diapocinina.

A falta de més estudis, farmacocinètics i terapèutics, es pot concloure que l'àcid el·làgic, apocinina i rutina són efectius i segurs en el tractament de la CU, la qual cosa fa que puguen ser considerats com adequats complements antiinflamatoris en el tractament convencional de la malaltia.

## VI. CONCLUSIONS





1. La suplementació de la dieta amb àcid el·làgic, apocinina o rutina protegeix de la inflamació intestinal induïda en el model de colitis per DSS, amb la reducció del dany intestinal macroscòpic i histològic, així com dels principals mediadors implicats en la resposta inflamatòria.
2. L'efecte beneficiós de l'àcid el·làgic adquireix una major rellevància durant la fase crònica de la malaltia. Després d'una prolongada administració, el polifenol redueix la inflamació pel bloqueig transcripcional de la citocina IL-6 i inhibició de l'activació de p38 MAPK, els factors NF- $\kappa$ B i STAT3 i la via d'Akt.
3. L'addició en la dieta d'apocinina té un efecte antiinflamatori en les fases primerenques i tardanes de la malaltia. L'acetofenona manifesta un important efecte protector després d'un atac agut, observat per la marcada disminució de l'IAM i una reduïda infiltració cel·lular a la mucosa, que es correlacionen amb l'afectació de l'activació de les vies del NF- $\kappa$ B i STAT3.
4. El tractament amb rutina modula la inflamació intestinal aguda i crònica protegint en ambdós casos front al dany intestinal. En l'atac agut, la rutina inhibeix l'expressió d'iNOS i COX-2, així com la producció d'IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i VCAM-1.
5. Encara que no s'ha avaluat l'efecte de diapocinina en la colitis ulcerosa, cal assenyalar que aquest metabòlit de l'apocinina és el responsable de l'activitat antiinflamatòria *in vivo*, al menys en altres models d'inflamació aguda i crònica assajats. A més, s'ha comprovat

que mostra un major efecte antiinflamatori, fet suportat pels resultats obtinguts en els estudis *in vitro*. A nivell molecular diapocinina bloqueja la via del NF- $\kappa$ B impedit la degradació de l'inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ .

6. Els resultats obtinguts són prometedors però són necessaris més estudis per a recolzar l'ús d'aquests compostos fenòlics com a potencials complements i/o tractaments alternatius en pacients amb malaltia intestinal inflamatòria.

## VII. BIBLIOGRAFIA

---



1. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2009;361:2066-78.
2. Afaq F, Malik A, Syed D, Maes D, Matsui MS, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor- $\kappa$ B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign. *Photochem Photobiol.* 2005;81:38-45.
3. Afif W, Loftus EV Jr. Safety profile of IBD therapeutics: infectious risks. *Med Clin North Am.* 2010;94:115-33.
4. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:4059.
5. Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan LA, Favela-Torres E, Aguilar CN. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78:189-99.
6. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate, and induction of cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1881-86.
7. Álvarez-Suárez JM, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, González-Paramás AM, Santos-Buelga C, Busco F, Quiles JL, Cordero MD, Bompadre S, Mezzetti B, Battino M. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *J Nutr Biochem.* 2014;25:289-94.
8. Andújar I, Recio MC, Bacelli T, Giner RM, Ríos JL. Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  degradation thus inhibiting translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus. *Br J Pharmacol.* 2010;160:376-88.

9. Andújar I, Recio MC, Giner RM, Cienfuegos-Jovellanos E, Laghi S, Muguerza B, Ríos JL. Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *J Agric Food Chem.* 2011;59:6474-83.
10. Andújar I, Ríos JL, Giner RM, Miguel Cerdá J, Recio Mdel C. Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:271606.
11. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis.* 2002; 23:143-50.
12. Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Schindler PW, Burer HJ, Hemmerle H, Schubert G, Below P, Herling AW. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Arch Biochem Biophys.* 1997;339:315-22.
13. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 2008;263:591-6.
14. Atreya R, Atreya I, Neurath MF. Novel signal transduction pathways: analysis of STAT-3 and Rac-1 signaling in inflammatory bowel disease. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1072:98-113.
15. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med.* 2000;6:583-88.

16. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005;28:187-96.
17. Aviram M, Rosenblat M. Pomegranate protection against cardiovascular diseases. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:382763.
18. Axelsson LG, Landström E, Bylund-Fellenius AC. Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998;12:925-34.
19. Azuma T, Shigeshiro M, Kodama M, Tanabe S, Suzuki T. Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. *J Nutr*. 2013;143:827-34.
20. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology: terminology and critical thinking. *FEBS Lett*. 2004;558:3-6.
21. Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MN. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40:206-10.
22. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;108:1440-5.
23. Banić M, Anić B, Brkić T, Ljubicić N, Plesko S, Dohoczky C, Erceg D, Petrovecki M, Stipančić I, Rotkvić I. Effect of cyclosporine in a murine model of experimental colitis. *Dig Dis Sci*. 2002;47:1362-8.
24. Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, Brambilla M, Caiani A, Tremoli E, Colli S. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:156-65.
25. Barnett M, Fraser A. Animal models of colitis: lessons learned, and their relevance to the clinic. En: *Ulcerative colitis-treatments, special populations and the future*. Dr Mortimer O'Connor (Ed.), 2011.



- <http://www.intechopen.com/articles/show/title/animal-models-of-colitis-lessons-learned-and-their-relevance-to-the-clinic>
26. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369:1641-57.
  27. Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lémann M, Cosnes J, Hébuterne X, Cortot A, Bouhnik Y, Gendre JP, Simon T, Maynadié M, Hermine O, Faivre J, Carrat F. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet*. 2009;374:1617-25.
  28. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF- $\beta$  suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*. 2004;21:491-501.
  29. Bell C, Hawthorne S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer – a mini review. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60:139-44.
  30. Beloqui A, Coco R, Alhouayek M, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, Muccioli GG, Prétat V. Budesonide-loaded nanostructured lipid carriers reduce inflammation in murine DSS-induced colitis. *Int J Pharm*. 2013;454:775-83.
  31. Bento AF, Leite DF, Marcon R, Claudino RF, Dutra RC, Cola M, Martini AC, Calixto JB. Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochem Pharmacol*. 2012;84:1459-69.
  32. Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:883-8.
  33. Billerey-Larmonier C, Uno JK, Larmonier N, Midura AJ, Timmermann B, Ghishan FK, Kiela PR. Protective effects of dietary curcumin in mouse model of chemically induced colitis are strain dependent. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:780-93.

34. Binker MG, Binker-Cosen AA, Gaisano HY, de Cosen RH, Cosen-Binker LI. TGF- $\beta$ 1 increases invasiveness of SW1990 cells through Rac1/ROS/NF $\kappa$ B/IL-6/MMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405:140-5.
35. Blumberg RS. Inflammation in the intestinal tract: pathogenesis and treatment. *Dig Dis*. 2009;27:455-64.
36. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:521-33.
37. Bousoño C, Ramos E. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Bol Pediatr*. 2006;46:91-9.
38. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:13-23.
39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
40. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998;56:317-33.
41. Bremner P, Heinrich M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol*. 2002;54:453-72.
42. Buchwalow IB, Böcker W. 2010. *Immunohistochemistry*. Berlin: Springer.
43. Burk DR, Senechal-Willis P, Lopez LC, Hogue BG, Daskalova SM. Suppression of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages by aqueous extract of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2009;126:397-405.
44. Burk DR, Senechal-Willis P, Lopez LC, Hogue BG, Daskalova SM. Suppression of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages by aqueous extract of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2009;126:397-405.

45. Caruso R, Fina D, Peluso I, Stolfi C, Fantini MC, Gioia V, Caprioli F, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G. A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3 $\alpha$ , by gut epithelial cells. *Gastroenterology*. 2007;132:166-75.
46. Cerdá B, Periago P, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Identification of urolithin a as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *J Agric Food Chem*. 2005a;53:5571-6.
47. Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC. 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;53:227-35.
48. Chae B, Yang KM, Kim TI, Kim WH. Adherens junction-dependent PI3K/Akt activation induces resistance to genotoxin-induced cell death in differentiated intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:738-43.
49. Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr Metab*. 2009;6:33.
50. Chen CY, Jang JH, Li MH, YJ Surh. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331:993-1000.
51. Chen S, Gong J, Liu F, Mohammed U. Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation. *Immunology*. 2000;100:471-80.
52. Cheng SE, Lee IT, Lin CC, Wu WL, Hsiao LD, Yang CM. ATP mediates NADPH oxidase/ROS generation and COX-2/PGE2 expression in A549 cells: role of P2 receptor-dependent STAT3 activation. *PLoS One*. 2013;8:e54125.

53. Chian CF, Chiang CH, Yuan-Jung C, Chuang CH, Liu SL, Yi-Han J, Zhang H, Ryu JH. Apocynin attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Shock*. 2012;38:196-202.
54. Choudhury R, Srail SK, Debnam E, Rice-Evans CA. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:278-86.
55. Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2013;150:805-17.
56. Chun KS, Keum YS, Han SS, Song YS, Kim SH, Surh YJ. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF- $\kappa$ B activation. *Carcinogenesis*. 2003;24:1515-24.
57. Chung YC, Lu LC, Tsai MH, Chen YJ, Chen YY, Yao SP, Hsu CP. The inhibitory effect of ellagic acid on cell growth of ovarian carcinoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:306705.
58. Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signalling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*. 1998;92:996-1002.
59. Clifford MN, Brown JE. Dietary flavonoids and health: broadening the perspective. En: Andersen, O., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 2005. pp. 320-70.
60. Colaric M, Veberic R, Solar A, Hudina M, Stampar F. Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *J Agric Food Chem*. 2005;53:6390-6.
61. Connell BJ, Saleh MC, Khan BV, Saleh TM. Apocynin may limit total cell death following cerebral ischemia and reperfusion by enhancing apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2011;49:3063-9.
62. Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol Immunol*. 2002;39:499-508.

63. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 1993;69:238-49.
64. Cornélio Favarin D, Martins Teixeira M, Lemos de Andrade E, de Freitas Alves C, Lazo Chica JE, Artério Sorgi C, Faccioli LH, Paula Rogerio A. Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:164202
65. Coskun M, Olsen J, Seidelin JB, Nielsen OH. MAP kinases in inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta.* 2011;412:513-20.
66. Cruz T, Gálvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sánchez de Medina L-H F, Zarzuelo A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci.* 1998;62:687-95.
67. Cuéllar MJ, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Ríos JL. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. *Fitoterapia.* 2001;72:221-9.
68. Danese S. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut.* 2012;61:918-32.
69. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989;26:335-41.
70. Devlin SM. Curry for the cure? *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1576-7
71. D'Haens G. Risks and benefits of biologic therapy for inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2007;56:725-32.
72. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52:S128-38.
73. Djurić M, Maškovic P, Murtić S, Veljković B, Čurčić S, Paunović G, Bošković Rakočević L. Quantitation of ellagic acid in blackberries. *Hemijaska industrija.* 2014. OnLine-First Issue (00):48.

74. Docena G, Rovedatti L, Kruidenier L, Fanning A, Leakey NA, Knowles CH, Lee K, Shanahan F, Nally K, McLean PG, Di Sabatino A, MacDonald TT. Down-regulation of p38 mitogen-activated protein kinase activation and proinflammatory cytokine production by mitogen-activated protein kinase inhibitors in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2010;162:108-15.
75. Dodd-O JM, Pearse DB. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H303-12.
76. Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky JV. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci.* 1969;58:1196-200.
77. Dothel G, Vasina V, Barbara G, De Ponti F. Animal models of chemically induced intestinal inflammation: predictivity and ethical issues. *Pharmacol Ther.* 2013;139:71-86.
78. Edderkaoui M, Odinkova I, Ohno I, Gukovsky I, Go VL, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2008;14:3672-80.
79. Egerton M, Fitzpatrick DR, Catling AD, Kelso A. Differential activation of T cell cytokine production by the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Eur J Immunol.* 1996;26:2279-85.
80. Egger AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mesecar AD. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:10070-5.
81. Egwuagu CE. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2009;47:149-56.

82. Elahi M, Rakhshan V, Ghasemian NT, Moshref M. Prognostic value of transforming growth factor  $\beta$ 1 [TGF- $\beta$ 1] and matrix metalloproteinase 9 [MMP-9] in oral squamous cell carcinoma. *Biomarkers*. 2012;17:21-7.
83. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med*. 2009;41:217-25
84. Elbs K, Lerch HJ. Über Dehydrodivanillin. *Prakt Chem*. 1916;93:1-6.
85. Ellis RD, Goodlad JR, Limb GA, Powell JJ, Thompson RP, Punchard NA. Activation of nuclear factor  $\kappa$ B in Crohn's disease. *Inflamm Res*. 1998; 47:440-5.
86. Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;56:545-53.
87. Espín J, García-Conesa M, Tomás-Barberán F. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry* 2007a;68:2986-3008.
88. Espín JC, González-Barrio R, Cerdá B, López-Bote C, Rey AI, Tomás-Barberán FA. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food Chem*. 2007b;55:10476-85.
89. Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:270418.
90. Falsaperla M, Morgia G, Tartarone A, Ardito R, Romano G. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. *Eur Urol*. 2005;47:449-54.
91. Fan Y, Mao R, Yang J. NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*. 2013;4:176-85.

92. Fantini MC, Fina D, Pallone F. Inmunología de las enfermedades inflamatorias intestinales. En: Gassull MA, Gomollón F, Hinojosa J, Obrador A (Ed.). Enfermedad Inflamatoria Intestinal. 3ra edición. Madrid: Aran Ediciones, 2007. pp. 81-102.
93. Feng YJ, Li YY. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis.* 2011;12:327-32.
94. Costa C, Castiñeira MDC, Louro A. 2012. Guía clínica de Colitis ulcerosa. <http://www.fisterra.com/guias-clinicas/colitis-ulcerosa/>
95. Foijer F, Simonis M, van Vliet M, Wessels L, Kerkhoven R, Sorger PK, Te Riele H. Oncogenic pathways impinging on the G2-restriction point. *Oncogene.* 2008;27:1142-54.
96. Forest CP, Padma-Nathan H, Liker HR. Efficacy and safety of pomegranate juice on improvement of erectile dysfunction in male patients with mild to moderate erectile dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Int J Impot Res.* 2007;19:564-7.
97. Fujiwara Y, Furukawa K, Haruki K, Shimada Y, Iida T, Shiba H, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Nafamostat mesilate can prevent adhesion, invasion and peritoneal dissemination of pancreatic cancer through nuclear factor  $\kappa$ -B inhibition. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2011;18:731-9.
98. Gábor, M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Budapest: Akadémiai Kiadó. 2000.
99. Galloway JB, Hyrich KL, Mercer LK, Dixon WG, Fu B, Ustianowski AP, Watson KD, Lunt M, Symmons DP. Anti-TNF therapy is associated with an increased risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis especially in the first 6 months of treatment: updated results from the British Society for Rheumatology Biologics Register with special emphasis on risks in the elderly. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:124-31.



100. Ganguli SC, Cawdron R, Irvine EJ. Alternative medicine use by Canadian ambulatory gastroenterology patients: secular trend or epidemic? *Am J Gastroenterol.* 2004;99:319-26.
101. Gao M, Ma Y, Liu D. Rutin suppresses palmitic acids-triggered inflammation in macrophages and blocks high fat diet-induced obesity and Fatty liver in mice. *Pharm Res.* 2013;30:2940-50.
102. Gao XP, Standiford TJ, Rahman A et al. Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47phox<sup>-/-</sup> and gp91phox<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol.* 2002;168:3974-82.
103. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 2000;48:4581-9.
104. Giner E, Andújar I, Recio MC, Ríos JL, Cerdá-Nicolás JM, Giner RM. Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *J Agric Food Chem.* 2011b;59:12882-92.
105. Giner E, El Alami M, Máñez S, Recio MC, Ríos JL, Giner RM. Phenolic substances from *Phagnalon rupestre* protect against 2,4,6-trinitrochlorobenzene-induced contact hypersensitivity. *J Nat Prod.* 2011a;74:1079-84.
106. Giner E, Recio MC, Ríos JL, Giner RM. Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. *J Nat Prod.* 2013;76:1113-20.
107. Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, Tharappel JC, Spear BT. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: a review. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54:875-96.
108. Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem.* 1999;47:3978-85.

109. Gomollón F, García López S. Tratamiento general del brote de colitis ulcerosa. En: Gassull MA, Gomollón F, Hinojosa J, Obrador A (Ed.). Enfermedad Inflamatoria Intestinal. 3ra edición. Madrid: Aran Ediciones, 2007. pp. 265-80.
110. Griess P (1879). Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen". Chem Ber. 1879;12:426-8.
111. Gu Y, Xu YC, Wu RF, Nwariaku FE, Souza RF, Flores SC, Terada LS. p47phox participates in activation of RelA in endothelial cells. J Biol Chem. 2003;278:17210-7.
112. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. AAPS J. 2013;15:195-218.
113. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2012;39:283-99.
114. Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. Nat Prod Rep. 2011;28:1937-55.
115. Gustin JA, Ozes ON, Akca H, Pincheira R, Mayo LD, Li Q, Guzman JR, Korgaonkar CK, Donner DB. Cell type-specific expression of the I $\kappa$ B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF- $\kappa$ B activation. J Biol Chem. 2004;279:1615-20.
116. Hanauer SB. Review article: evolving concepts in treatment and disease modification in ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther. 2008;27:15-21.
117. Handel ML. Transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B: where steroids meet the gold standard of anti-rheumatic drugs. Inflamm Res. 1997;46:282-6.
118. Hassoun EA, Vodhanel J, Abushaban A. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different

- brain regions of rats after subchronic exposure. *J Biochem Mol Toxicol*. 2004;18:196-203.
119. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene*. 2006;25:6758-80.
120. He SM, Chan E, Zhou SF. ADME properties of herbal medicines in humans: evidence, challenges and strategies. *Curr Pharm Des*. 2011;17:357-407.
121. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374:1-20.
122. Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perré S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1276-83.
123. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129:550-64
124. Hernández V, Máñez S, Recio MC, Giner RM, Ríos JL. Anti-inflammatory profile of dehydrocostic acid, a novel sesquiterpene acid with a pharmacophoric conjugated diene. *Eur J Pharm Sci*. 2005;26:162-9.
125. Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K, Brandes RP. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension*. 2008;51:211-7.
126. Hilsden RJ, Verhoef MJ, Best A, Pocobelli G. Complementary and alternative medicine use by Canadian patients with inflammatory bowel disease: results from a national survey. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:1563-8.

127. Hinojosa Del Val J. Farmacología de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal. 3rd ed. Madrid: GETECCU, 2007. pp. 222-3.
128. Ho CC, Huang AC, Yu CS, Lien JC, Wu SH, Huang YP, Huang HY, Kuo JH, Liao WY, Yang JS, Chen PY, Chung JG. Ellagic acid induces apoptosis in tsgh8301 human bladder cancer cells through the endoplasmic reticulum stress- and mitochondria-dependent signaling pathways. *Environ Toxicol*. 2013. doi: 10.1002/tox.21857.
129. Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF- $\kappa$ B-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J*. 2004;18:1550-2.
130. Hommes D1, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:7-14.
131. Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*. 2003;52:144-51.
132. Hougee S, Hartog A, Sanders A, Graus YM, Hoijer MA, Garssen J, van den Berg WB, van Beuningen HM, Smit HF. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*. 2006;531:264-9
133. Hseu YC, Chou CW, Senthil Kumar KJ, Fu KT, Wang HM, Hsu LS, Kuo YH, Wu CR, Chen SC, Yang HL. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. *Food Chem Toxicol*. 2012;50:1245-55.

134. Hu FB. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:544S-51S.
135. Huang XL, Xu J, Zhang XH, Qiu BY, Peng L, Zhang M, Gan HT. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Inflamm Res.* 2011;60:727-34.
136. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. NFκB is essential for epithelial–mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest.* 2004;114:569-81.
137. Humpel N, Jones SC. Gaining insight into the what, why, and where of complementary and alternative medicine use by cancer patients and survivors. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2006;15:362-8.
138. Hur J, Lee P, Kim MJ, Kim Y, Cho YW. Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp91phox NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391:1526-30.
139. Iino T, Nakahara K, Miki W, Kiso Y, Ogawa Y, Kato S, Takeuchi K. Less damaging effect of whisky in rat stomachs in comparison with pure ethanol. Role of ellagic acid, the nonalcoholic component. *Digestion.* 2001;64:214-21.
140. Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Cuzzocrea S. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2011;81:636-48.
141. Iwai K, Kim MY, Onodera A, Matsue H: α-glucosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* Thunb. *Agric Food Chem.* 2006;54:4588-92.
142. Jeong HS, Choi HY, Choi TW, Kim BW, Kim JH, Lee ER, Cho SG. Differential regulation of the antiapoptotic action of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and B-cell lymphoma extra long (Bcl-xL) by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK)

- 1-involved pathway in neuroglioma cells. *Biol Pharm Bull.* 2008;31:1686-90.
143. Jewel DP. Colitis ulcerosa. En: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, editores. *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.* 7ª ed. Tomo 2. Buenos Aires: Medica Panamerica, 2004. pp. 2178-209.
144. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004;50:81-92.
145. Kanegae MP, Condino-Neto A, Pedroza LA, de Almeida AC, Rehder J, da Fonseca LM, Ximenes VF. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393:551-4.
146. Kao GD, Jiang Z, Fernandes AM, Gupta AK, Maity A. Inhibition of phosphatidyl inositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *J Biol Chem.* 2007;282:21206-12.
147. Karin M, Ben-neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-63
148. Karlsson S, Nanberg 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;103:1102-9.
149. Kawada M, Arihiro A, Mizoguchi E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13:5581-93.
150. Khanicheh E, Qi Y, Xie A, Mitterhuber M, Xu L, Mochizuki M, Daali Y, Jaquet V, Krause KH, Ruggeri ZM, Kuster GM, Lindner JR, Kaufmann BA. Molecular imaging reveals rapid reduction of endothelial activation in early

- atherosclerosis with apocynin independent of antioxidative properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:2187-92.
151. Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y, Lim MJ, Neckers L, Jung Y. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharm Res.* 2005;22:1499-509.
152. Kim JH, Na HJ, Kim CK, Kim JY, Ha KS, Lee H, Chung HT, Kwon HJ, Kwon YG, Kim YM. The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF- $\kappa$ B-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF- $\kappa$ B-inducing kinase pathways: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NF- $\kappa$ B activation. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:885-96.
153. Kinkade K, Streeter J, Miller FJ. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2013;14:17017-28.
154. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim.* 2000;49:9-15.
155. Klink M, Jastrzemska K, Bednarska K, Banasik M, Sulowska Z. Effect of nitric oxide donors on NADPH oxidase signaling pathway in human neutrophils in vitro. *Immunobiology.* 2009;214:692-702.
156. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:405-10.
157. Kriegstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen, divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med.* 2001;194:1207-18.
158. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med.* 2002;113:71S-88S.

159. Kumar KN, Raja SB, Vidhya N, Devaraj SN. Ellagic acid modulates antioxidant status, ornithine decarboxylase expression, and aberrant crypt foci progression in 1,2-dimethylhydrazine-instigated colon preneoplastic lesions in rats. *J Agric Food Chem.* 2012;60:3665-72.
160. Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin, an antioxidant and antitumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochem Biophys Acta.* 1996;1317: 95-100.
161. Kverka M, Rossmann P, Tlaskalova-Hogenova H, Klimesova K, Jharap B, de Boer NK, Vos RM, van Bodegraven AA, Lukas M, Mulder CJ. Safety and efficacy of the immunosuppressive agent 6-tioguanine in murine model of acute and chronic colitis. *BMC Gastroenterol.* 2011;11:47.
162. Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:395-406.
163. Kwon KH, Ohigashi H, Murakami A. Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 $\beta$  release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages. *Life Sci.* 2007;81:362-71.
164. La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martín Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol.* 2000;71:45-53.
165. Labrecque L, Lamy S, Chapus A, Mihoubi S, Durocher Y, Cass B, Bojanowski MW, Gingras D, Béliveau R. Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. *Carcinogenesis.* 2005;26:821-6.
166. Lafeber FP, Beukelman CJ, van den Worm E, van Roy JL, Vianen ME, van Roon JA, van Dijk H, Bijlsma JW. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving



- drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:1088-93.
167. Langhorst J, Anthonisen IB, Steder-Neukamm U, Lüdtke R, Spahn G, Michalsen A, Dobos GJ. Amount of systemic steroid medication is a strong predictor for the use of complementary and alternative medicine in patients with inflammatory bowel disease: results from a German national survey. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:287-95.
168. Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem*. 2006;17:611-25.
169. Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D. Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Functions. In: Lattanzio V, Daayf F. eds. 2008. *Recent Advances in Polyphenol Research*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1-35.
170. Lee W, Ku SK, Bae JS. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*. 2012;50:3048-55.
171. Lee WJ, Ou HC, Hsu WC, Chou MM, Tseng JJ, Hsu SL, Tsai KL, Sheu WH. Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells. *J Vasc Surg*. 2010;52:1290-300.
172. Lei F, Xing DM, Xiang L, Zhao YN, Wang W, Zhang LJ, Du LD. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *J Chromatogr*. 2003;796:189-94.
173. Li F, Zou Y, Li X. Up-regulation of signal transducer and activator of transcription-3 is associated with aggravation of ulcerative colitis. *Surgeon*. 2010a;8:262-6.

174. Li TM, Chen GW, Su CC, Lin JG, Yeh CC, Cheng KC, Chung JG. Ellagic acid induce p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res.* 2005;25:971-9.
175. Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, Xia B, Kuipers EJ, van der Woude CJ. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signaling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut.* 2010b;59:227-35.
176. Lin CH, Yeh SH, Lin CH, Lu KT, Leu TH, Chang WC, Gean PW. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron.* 2001;31:841-51.
177. Liu IM, Hsu FL, Chen CF, Cheng JT. Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2000;129:631-6.
178. Liu L, Liu YL, Liu GX, Chen X, Yang K, Yang YX, Xie Q, Gan HK, Huang XL, Gan HT. Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by blocking STAT3 signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2013;17:314-20.
179. Liu XH, Rose DP. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1996;56:5125-7.
180. Lopetuso LR, Petito V, Cufino V, Arena V, Stigliano E, Gerardi V, Gaetani E, Poscia A, Amato A, Cammarota G, Papa A, Sgambato A, Gasbarrini A, Scaldaferri F. Locally injected Infliximab ameliorates murine DSS colitis: differences in serum and intestinal levels of drug between healthy and colitic mice. *Dig Liver Dis.* 2013;45:1017-21.
181. Losso JN, Bansode RR, Trappey A 2nd, Bawadi HA, Truax R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J Nutr Biochem.* 2004;15:672-8.
182. Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. Dose formulation and analysis of diapocynin. *J Agric Food Chem.* 2008;56:301-6.

183. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005;307:1920-5.
184. Magalingam KB, Radhakrishnan A, Haleagrahara N. Rutin, a bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6 hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity. *Int J Mol Med*. 2013;32:235-40.
185. Malik A, Afaq S, Shahid M, Akhtar K, Assiri A. Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: a caspase-dependent pathway. *Asian Pac J Trop Med*. 2011;4:550-5.
186. Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C, Regerat F, Remesy C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*. 1995;125:1911-22.
187. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727-47.
188. Mañé J. Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutr Hosp*. 2007;22:178-89.
189. Martelli AM, Nyåkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, Cocco L. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006;20:911-28.
190. Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Satoh K, Shimosegawa T. Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. *Biochem Pharmacol*. 2005;70:869-78.
191. Matalka KZ, Tutunji MF, Abu-Baker M, Abu Baker Y. Measurement of protein cytokines in tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assays: application to lipopolysaccharide-induced differential milieu of cytokines. *Neuro Endocrinol Lett*. 2005;26:231-6.

192. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G1328-38.
193. Mendoza JL, Lana R, Díaz-Rubio M. Definiciones y manifestaciones clínicas generales. En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. 3ª edición. Madrid: Aran Ediciones, 2007. pp. 21-8.
194. Meng R, Zhu DL, Bi Y, Yang DH, Wang YP. Apocynin improves insulin resistance through suppressing inflammation in high-fat diet-induced obese mice. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:858735.
195. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52:673-751.
196. Mitsuyama K, Sata M, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006b;17:451-61.
197. Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N, Tsuruta O, Kitazaki S, Takeda T, Satoh Y, Bennett BL, Toyonaga A, Sata M. Pro-inflammatory signaling by Jun- N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med.* 2006a;17:449-55.
198. Mochizuki M, Hasegawa N. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reduces experimental colon injury in rats by regulating macrophage and mast cell. *Phytother Res.* 2010;24:S120-2.
199. Monteleone G, Mann J, Monteleone I, Vavassori P, Bremner R, Fantini M, Del Vecchio Blanco G, Tersigni R, Alessandrini L, Mann D, Pallone F, MacDonald TT. A failure of transforming growth factor- $\beta$ 1 negative regulation maintains sustained NF- $\kappa$ B activation in gut inflammation. *J Biol Chem.* 2004;279:3925-32.

200. Morand C, Manach C, Crespy V, Remesy C. Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors*. 2000;12:169-74.
201. Moridani MY, Pourahmad J, Bui H, Siraki A, O'Brien PJ. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:243-53.
202. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
203. Most MM. Estimated phytochemical content of the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet is higher than in the Control Study Diet. *J Am Diet Assoc*. 2004;104:1725-7.
204. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho GT, Satsangi J, Bloom S. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2011;60:571-607
205. Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J, Neurath MF. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:64-72.
206. Muller-Decker K, Neufang G, Berger I, Neumann M, Marks F, Furstenberger G. Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:12483-8.
207. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51:263-73.
208. Nam NH. Naturally occurring NF- $\kappa$ B inhibitors. *Mini Rev Med Chem*. 2006;6:945-51.

209. Nomura M, Ma W, Chen N, Bode AM, Dong Z. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF- $\kappa$ B activation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate and theaflavins. *Carcinogenesis*. 2000;21:1885-90.
210. Novotny V, Prieschl EE, Csonga R, Fajani G, Baumruker T. Nrf1 in a complex with fosB, c-jun, junD and ATF2 forms the AP1 component at the TNF $\alpha$  promoter in stimulated mast cells. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:5480-5.
211. O'Connor PM, Lapointe TK, Beck PL, Buret AG. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1411-20.
212. Ogawa Y, Kanatsu K, Iino T, Kato S, Jeong YI, Shibata N, Takada K, Takeuchi K. Protection against dextran sulfate sodium-induced colitis by microspheres of ellagic acid in rats. *Life Sci*. 2002;71:827-39.
213. Okada Y, Maeda N, Takakura S, Miyata K, Koshiba M. Tacrolimus ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: implication of interferon- $\gamma$  and interleukin-1 $\beta$  suppression. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:1823-7.
214. Olmos A, Giner RM, Recio MC, Rios JL, Cerdá-Nicolás JM, Máñez S. Effects of plant alkylphenols on cytokine production, tyrosine nitration and inflammatory damage in the efferent phase of contact hypersensitivity. *Br J Pharmacol*. 2007;152:366-73
215. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000;12:1-13.
216. Ou HC, Lee WJ, Lee SD, Huang CY, Chiu TH, Tsai KL, Hsu WC, Sheu WH. Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;248:134-43.

217. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999;401:82-5.
218. Pandey A, Kour K, Bani S, Suri KA, Satti NK, Sharma P, Qazi GN. Amelioration of adjuvant induced arthritis by apocynin. *Phytother Res*. 2009;23:1462-8.
219. Pandurangan AK. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:2201-5.
220. Park JB. (1999). Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260:568-74.
221. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*. 1997;150:823-32.
222. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:311-22.
223. Pechánová O, Jendeková L, Vranková S. Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneous hypertension. *Pharmacol Rep*. 2009;61:116-22.
224. Peng XD, Wu XH, Chen LJ, Wang ZL, Hu XH, Song LF, He CM, Luo YF, Chen ZZ, Jin K, Lin HG, Li XL, Wang YS, Wei YQ. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;332:46-56.
225. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:718617.

226. Petrônio MS, Zeraik ML, Fonseca LM, Ximenes VF. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules*. 2013;18:2821-39
227. Pietersma A, Tilly BC, Gaestel M, de Jong N, Lee JC, Koster JF, Sluiter W. p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the posttranscriptional level. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;230:44-8.
228. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16:933-43.
229. Prieto JM, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Ríos JL. Dual inhibition of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase by aerial part of *Bupleurum fruticosens* methanol extract. *Fitoterapia*. 2004;75:179-86.
230. Prieto JM, Recio MC, Giner RM, Schinella GR, Máñez S, Ríos JL. In vitro and in vivo effects of *Ranunculus peltatus* subsp. *baudotii* methanol extract on models of eicosanoid production and contact dermatitis. *Phytother Res*. 2008;22:297-302.
231. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem*. 2002;50:2200-6.
232. Rabišková M, Bautzová T, Gajdziok J, Dvořáčková K, Lamprecht A, Pellequer Y, Spilková J. Coated chitosan pellets containing rutin intended for the treatment of inflammatory bowel disease: in vitro characteristics and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2012;422:151-9.
233. Rachmilewitz D, Okon E, Karmeli F. Sulphydryl blocker induced small intestinal inflammation in rats: a new model mimicking Crohn's disease. *Gut*. 1997;41:358-65.
234. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 2006;72:1439-52.



235. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52:507-26.
236. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005;42:405-26.
237. Recio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Curr Med Chem.* 2012;19:2088-103.
238. Recio MC, Giner RM, Máñez S, Gueho J, Julien HR, Hostettmann K, Ríos JL. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med.* 1995;61:9-12.
239. Recio MC, Giner RM, Uriburu L, Máñez S, Cerdá M, De la Fuente JR, Ríos JL. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.* 2000;66:2509-18.
240. Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 2007;73:461-7.
241. Reddy SA, Huang JH, Liao WS. Phosphatidylinositol-3-kinase as a mediator of TNF-induced NF- $\kappa$ B activation. *J Immunol.* 2000;164:1355-63.
242. Reeves EP, Dekker LV, Forbes LV, Wientjes FB, Grogan A, Pappin DJ, et al. Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *Biochem J.* 1999;344:859-66.
243. Ren J, Fan C, Chen N, Huang J, Yang Q. Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats. *Neurochem Res.* 2011;36:2352-62.
244. Resolución de la 56ª Asamblea Mundial de la Salud WHA56.31. Organización Mundial de la Salud. Punto 14.10 del orden del día. 28 de mayo de 2003.

245. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 1996;20:933-56
246. Rijcken E, Krieglstein CF, Anthoni C, Laukoetter MG, Mennigen R, Spiegel HU, Senninger N, Bennett CF, Schuermann G. ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leucocyte adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease. *Gut.* 2002;51:529-35.
247. Rogerio AP, Fontanari C, Borducchi E, Keller AC, Russo M, Soares EG, Albuquerque DA, Faccioli LH. Antiinflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. *Eur J Pharmacol.* 2008;580:262-70.
248. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V. Nuclear factor  $\kappa$  B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 1998;115:357-69.
249. Romano C, Famiani A, Gallizzi R, Comito D, Ferrau' V, Rossi P. Indeterminate colitis: a distinctive clinical pattern of inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics.* 2008;122:e1278-81.
250. Romashkova JA, Makarov SS. NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature.* 1999;401:86-90.
251. Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev.* 2009;67:363-78.
252. Romier B, Van De Walle J, During A, Larondelle Y, Schneider YJ. Modulation of signalling nuclear factor- $\kappa$ B activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. *Br J Nutr.* 2008;100:542-51.
253. Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Aparicio-Soto M, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, de la Lastra CA. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res.* 2012;66:235-42.

254. Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cárdeno A, de la Lastra CA. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochem Pharmacol.* 2011;82:737-45.
255. Roy PK, Rashid F, Bragg J, Ibdah JA. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:200-2.
256. Russell W, Duthie G. Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. *Proc Nutr Soc.* 2011;70:389-96.
257. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Barcellona ML, Vanella A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol.* 2000;16:91-8.
258. Rutgeerts P, van Deventer S, Schreiber S. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:1435-50.
259. Sala A, Recio M, Giner RM, Máñez S, Tournier H, Schinella G, Ríos JL. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:365-71.
260. Sánchez de Medina F, Daddaoua A, Requena P, Capitán-Cañadas F, Zarzuelo A, Suárez MD, Martínez-Augustin O. New insights in to the immunological effects off ood bioactive peptides in animal models of intestinal inflammation. *Proc Nutr Soc.* 2010;69:454-62.
261. Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Villegas I, Talero E, de la Lastra CA. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 2010;633:78-8.
262. Sánchez-Rivera JP, Domingo A, Marín M, Garrigues TM, Recio MC. Study of the absorption of apocynin, anti-inflammatory natural product, in rats with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfated (DSS). *Br J Pharmacol.* 2012;P396.

263. Sann H, Erichsen Jv, Hessmann M, Pahl A, Hoffmeyer A. Efficacy of drugs used in the treatment of IBD and combinations thereof in acute DSS-induced colitis in mice. *Life Sci.* 2013;92:708-18.
264. Sans M, Panés J, Ardite E, Elizalde JI, Arce Y, Elena M, Palacín A, Fernández-Checa JC, Anderson DC, Lobb R, Piqué JM. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology.* 1999;116:874-83.
265. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43:394-405.
266. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3:390-407.
267. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45:287-306.
268. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000;130:S2073-85.
269. Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Fabio G. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 2011;44:192-201.
270. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor  $\kappa$  B in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998;42:477-84.
271. Schwanke RC, Marcon R, Meotti FC, Bento AF, Dutra RC, Pizzollatti MG, Calixto JB. Oral administration of the flavonoid myricitrin prevents dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice through modulation of PI3K/Akt signaling pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57:1938-49.
272. Seeram NP, Aronson WJ, Zhang Y, Henning SM, Moro A, Lee RP, Sartippour M, Harris DM, Rettig M, Suchard MA, Pantuck AJ, Belldegrun A, Heber D.

- Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *J Agric Food Chem.* 2007;55:7732-7.
273. Seguí J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, Coronel P, Piqué JM, Panés J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol.* 2004;76:537-44.
274. Shah ZA, Li RC, Ahmad AS, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S, Doré S. The flavanol (-)- epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30:1951-61.
275. Shapiro H, Singer P, Halpern Z, Bruck R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut.* 2007;56:426-35.
276. Shen J, Andersen R, Albert PS, Wenger N, Glaspy J, Cole M, Shekelle P. Use of complementary/alternative therapies by women with advanced-stage breast cancer. *BMC Complement Altern Med.* 2002a;2:8.
277. Shen SC, Lee WR, Lin HY, Huang HC, Ko CH, Yang LL, Chen YC. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur J Pharmacol.* 2002b;446:187-94.
278. Singh K, Jaggi AS, Singh N. Exploring the ameliorative potential of *Punica granatum* in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Phytotherapy Research.* 2009;23:1565-74.
279. Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor- $\kappa$ B activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332:829-39.

280. Sizemore N, Leung S, Stark GR. Activation of phosphatidylinositol- 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF- $\kappa$ B P65/RelA subunit. *Mol Cell Biol.* 1999;19:4798-805.
281. Small DJ. Rodent and lagomorph health surveillance-quality assurance. En: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, eds. *Laboratory animal medicine.* Toronto: Academic Press, 1984. pp. 709-23.
282. Soh PN, Witkowski B, Olganier D, Nicolau ML, Garcia-Álvarez MC, Berry A, Benoit-Vical F. In vitro and in vivo properties of ellagic acid in malaria treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1100-6.
283. Soriano A, Salas A, Salas A, Sans M, Gironella M, Elena M, Anderson DC, Piqué JM, Panés J. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2000;80:1541-51.
284. Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, Winyard PG, Kettle AJ. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51:1796-803.
285. Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:106507.
286. Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Mono- *O*-methylated flavanols and other flavonoides as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2008;469:209-19
287. Sugimoto K. Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:5110-4.
288. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:768-80.
289. Suskind DL, Wahbeh G, Burpee T, Cohen M, Christie D, Weber W. Tolerability of curcumin in pediatric inflammatory bowel disease: a forced dose titration study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;56:277-9.

290. Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2001;193:471-81.
291. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*. 1983;132: 345-52.
292. Suzuki N, Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Shimosegawa T. Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Dig Dis Sci*. 2009;54:802-10.
293. Takagi A, Sai K, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y. Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8 hydroxydeoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. *Cancer Lett*. 1995;91:139-44.
294. Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, de la Lastra CA, Illanes M, Motilva V. Role of different inflammatory and tumor biomarkers in the development of ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:696-710.
295. Terme M, Colussi O, Marcheteau E, Tanchot C, Tartour E, Taieb J. Modulation of immunity by antiangiogenic molecules in cancer. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:492920.
296. Tillisch K. Complementary and alternative medicine for gastrointestinal disorders. *Clin Med*. 2007;7:224-7.
297. Toth LA, January B. Physiological stabilization of rabbits after shipping. *Lab Anim Sci*. 1990;40:384-7.
298. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:4350-4.

299. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010;2:1231-46.
300. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*. 2002;53:35-57.
301. Umesalma S, Sudhandiran G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- $\kappa$ B, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;107:650-55.
302. Umesalma S, Sudhandiran G. Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. *Eur J Pharmacol*. 2011;660:249-58.
303. Umesalma S, Sudhandiran G. Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. *Eur J Pharmacol*. 2011;660:249-58.
304. van Beelen Granlund A, Østvik AE, Brenna Ø, Torp SH, Gustafsson BI, Sandvik AK. REG gene expression in inflamed and healthy colon mucosa explored by in situ hybridisation. *Cell Tissue Res*. 2013;352:639-46.
305. Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur J Pharmacol*. 2001b;433:225-30.
306. Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg, AJ, Kroes BH, Van der Wal, D, Van Dijk H, Labadie RP. Apocynin: a lead-compound for new respiratory burst inhibitors? En: *Investigations on apocynin, a potent NADPH oxidase inhibitor*. Cruijff J (Ed). 2001a. pp 48-58.
307. Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- $\kappa$ B p65



- transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 1998;273:3285-90.
308. Viačková D1, Pekarová M, Crhák T, Búcsaiová M, Matiašovic J, Lojek A, Kubala L. Redox-sensitive regulation of macrophage-inducible nitric oxide synthase expression in vitro does not correlate with the failure of apocynin to prevent lung inflammation induced by endotoxin. *Immunobiology.* 2011;216:457-65.
309. Vidya Priyadarsini R, Kumar N, Khan I, Thiyagarajan P, Kondaiah P, Nagini S. Gene expression signature of DMBA-induced hamster buccal pouch carcinomas: modulation by chlorophyllin and ellagic acid. *PLoS One.* 2012;7:e34628.
310. Viinikka L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996;56:577-81.
311. Vowinkel T, Kalogeris TJ, Mori M, Krieglstein CF, Granger DN. Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Dig Dis Sci.* 2004;49:556-64.
312. Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogenactivated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2002;168:5342-51.
313. Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem.* 2002;277:34933-40.
314. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols *J Agric Food Chem.* 2006;54:9798-804.
315. Wang N, Wang ZY, Mo SL, Loo TY, Wang DM, Luo HB, Yang DP, Chen YL, Shen JG, Chen JP. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012a;134:943-55.

316. Wang SW, Wang YJ, Su YJ, Zhou WW, Yang SG, Zhang R, Zhao M, Li YN, Zhang ZP, Zhan DW, Liu RT. Rutin inhibits  $\beta$ -amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology*. 2012b;33:482-90.
317. Wang Y, Zeigler MM, Lam GK, Hunter MG, Eubank TD, Khramtsov VV, Tridandapani S, Sen CK, and Marsh CB. The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36:68-77.
318. Watson W, Cai J, Jones D. Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr*. 2000;108:153-64.
319. Whitley AC, Stoner GD, Darby MV, Walle T. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid-extensive binding to protein and DNA. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:907-15.
320. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544-7.
321. Wong AP, Clark AL, Garnett EA, Acree M, Cohen SA, Ferry GD, Heyman MB. Use of complementary medicine in pediatric patients with inflammatory bowel disease: results from a multicenter survey. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;48:55-60.
322. Wullaert A. Role of NF- $\kappa$ B activation in intestinal immune homeostasis. *Int J Med Microbiol*. 2010;300:49-56.
323. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427-34.
324. Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*. 1994;56:576-82.

325. Ximenes VF, Kanegae MP, Rissato SR, Galhiane MS. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch Biochem Biophys*. 2007;457:134-41.
326. Yamamori T, Inanami O, Nagahata H, Cui Y, Kuwabara M. Roles of p38MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett*. 2000;467:253-8.
327. Yamamoto K, Rose-John S. Therapeutic blockade of interleukin-6 in chronic inflammatory disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;91:574-6.
328. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol*. 2000;164:4878-82.
329. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:381-406.
330. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther*. 2014;141:125-39.
331. Ye Z, Liu Z, Henderson A, Lee K, Hostetter J, Wannemuehler M, Hendrich S. Increased CYP4B1 mRNA is associated with the inhibition of dextran sulfate sodium-induced colitis by caffeic acid in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234:605-16.
332. Ying X, Yu K, Chen X, Chen H, Hong J, Cheng S, Peng L. Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Cell Immunol*. 2013;285:49-54.
333. Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J*. 2005;46:585-96.
334. Young JM, Wagner BM, Spires DA. Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *J Invest Dermatol*. 1983;80:48-52.

- 
335. Yu YM, Chang WC, Wu CH, Chiang SY. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. *J Nutr Biochem.* 2005;16:675-81.
336. Yu YM, Wang ZH, Liu CH, Chen CS. Ellagic acid inhibits IL-1 $\beta$ -induced cell adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Nutr.* 2007;97:692-8.
337. Yüce A, Ateşşahin A, Ceribaşı AO. Amelioration of cyclosporine A-induced renal, hepatic and cardiac damages by ellagic acid in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103:186-91.
338. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:201.
339. Zhang W, Rojas M, Lilly B, Tsai NT, Lemtalsi T, Liou GI, Caldwell RW, Caldwell RB. NAD(P)H oxidase-dependent regulation of CCL2 production during retinal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:3033-40.
340. Zhao M, Tang SN, Marsh JL, Shankar S, Srivastava RK. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. *Cancer Lett.* 2013;337:210-7.
341. Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets.* 2011;12:332-47.



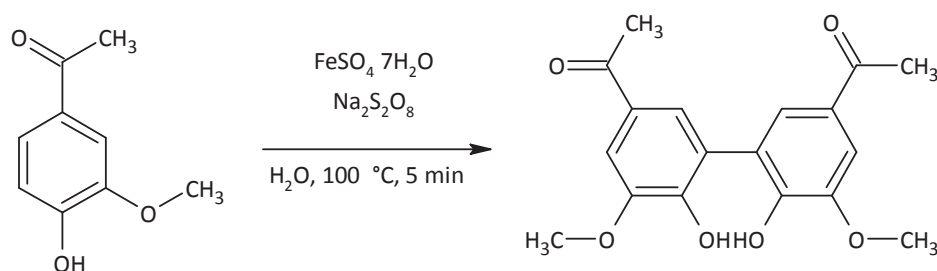
## VIII. ANNEXOS

---



## ANNEX I. SEMISÍNTESI DE DIAPOCININA

La síntesi química del dímer diapocinina es va portar a terme mitjançant la dimerització oxidativa d'apocinina segons descriuen Luchtefeld *et al.* (2008). Aquesta síntesi és quasi una rèplica de la síntesi publicada de la dihidrodivanil·lina a partir de la vanil·lina (Elbs i Lerch, 1916). Es tracta d'una reacció d'oxidació-reducció (Figura Al.1) que requereix *in situ* la formació de radicals sulfat capaços d'eliminar un àtom d'hidrogen de cada molècula d'apocinina, la qual cosa dóna lloc a la diapocinina.



**Figura Al.1.** Reacció de conversió d'apocinina a diapocinina

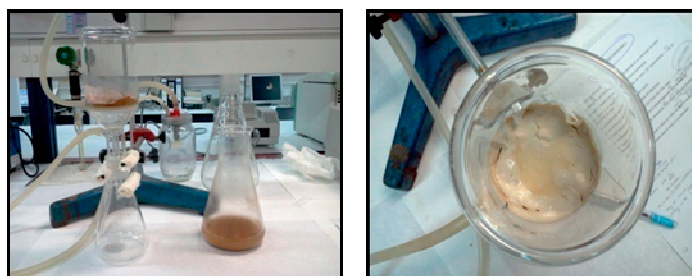
La reacció es va iniciar dissolent 2 g d'apocinina en 200 mL d'aigua desionitzada mitjançant agitació i calfant fins a aconseguir una ebullició suau. A continuació, es van afegir 0,15 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O i 1,6 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, i es va observar, gradualment, la formació d'un precipitat marró intens. Després de 5 min d'agitació, es va deixar refredar la solució per a posteriorment ser filtrada a través d'un paper de filtre Shark Skin<sup>®</sup> sobre un embut Buchner (Figura Al.2). Degut a l'escassa solubilitat de diapocinina, fins i tot en aigua calenta, dóna lloc a un precipitat que pot contenir contaminants com ferro, sulfat i persulfat. Per tal d'eliminar aquests agents, així com traces d'apocinina que no hagen reaccionat, es va



redissoldre el precipitat en 25 mL d'una solució aquosa de  $\text{NH}_4\text{OH}$  3N i es va precipitar de nou afegint lentament 15 mL d' $\text{HCl}$  6N amb agitació. Aquest segon precipitat es va filtrar de nou i es va rentar tres vegades amb metanol bullent. El producte purificat es va deshidratar en un dessecador abans de ser utilitzat i es va pesar per tal de calcular el rendiment de la reacció a partir de la següent fórmula:

$$\% \text{ Rendiment} = \frac{\text{mols producte obtingut}}{\text{mols producte partida}} \times 100$$

El rendiment obtingut en la conversió d'apocinina en diapocinina va ser d'un 33%. A continuació, el producte obtés es va identificar amb tècniques de espectroscòpiques de RMN del protó ( $^1\text{H}$ -RMN) i d'espectrometria de masses (EM). Ambdues anàlisis espectrals es van realitzar al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear del SCSIE.

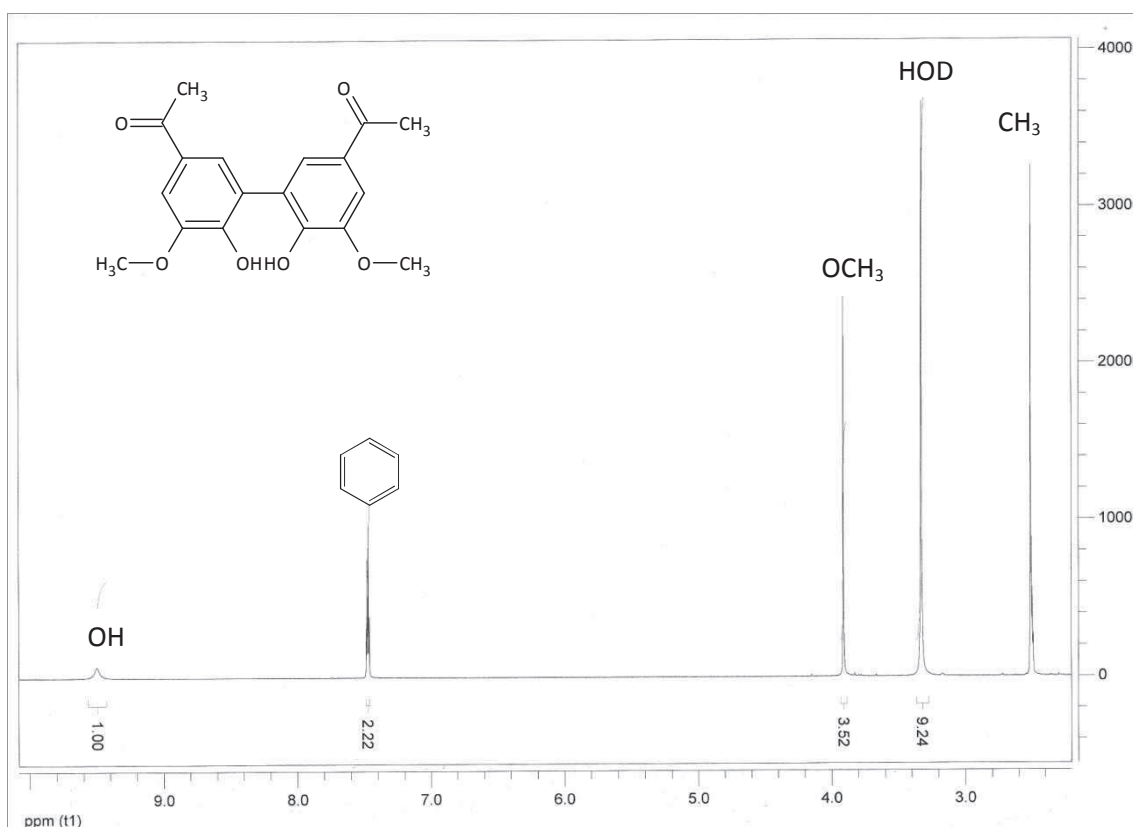


**Figura A1.2.** Procés de síntesi química de diapocinina al laboratori.

#### – Elucidació estructural

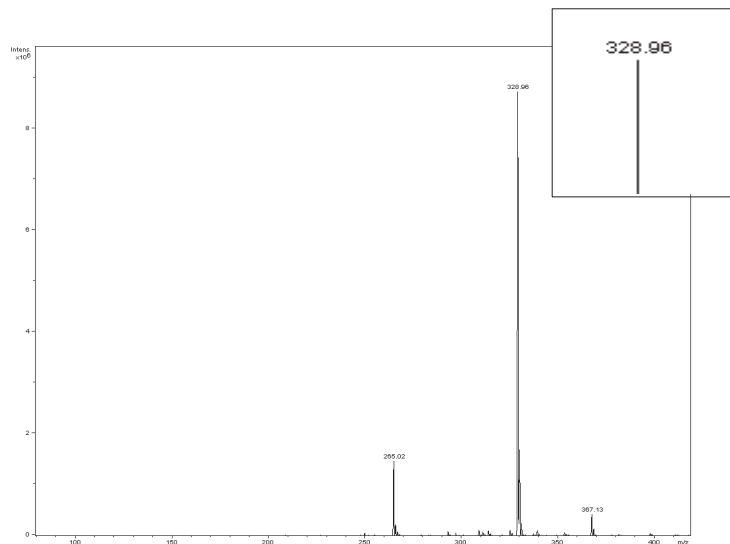
D'una banda, l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN aporta informació sobre l'estructura del compost obtingut a través de l'anàlisi detallada dels moments magnètics dels àtoms d'hidrogen presents en la molècula. D'altra banda, l'espectre de masses proporciona les dades sobre la massa molecular i les seues fragmentacions característiques.

A la molècula de diapocinina hi ha cinc tipus de protons diferents, els quals poden ser comptabilitzats pels cinc pics observats a l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN (Bruker AC 300 MHz) registrat en  $\text{DMSO-}d_6$ , i d'acord amb Dasari *et al.* (2008). D'una banda, els dos senyals a 7,451 i 7,463 ppm corresponen als dos tipus de protons aromàtics (CH aromàtic). Els senyals a 3,895 ppm i a 2,494 ppm corresponen als protons metoxil i acetil ( $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}_3$ , respectivament). Finalment, el senyal a 9,465 ppm correspon al protó alcohòlic ( $-\text{OH}$ ). El senyal residual al voltant de 3,2 ppm es degut al HOD, la humitat de la mostra que bescanvia un dels seus protons (Figura A1.3).



**Figura A1.3.** Espectre de  $^1\text{H}$ -RMN (Bruker AC 300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de diapocinina

L'espectre de masses del producte va presentar un ió de  $m/z$  329, que es corresponia amb la molècula desprotonada  $[M-H]^+$  (Figura AI.4). Així, les dades són consistents amb la diapocinina.



**Figura AI.4.** Espectre de masses de diapocinina

## **ANNEX II. ESTUDI PRELIMINAR D'ABSORCIÓ D'APOCININA EN RATES AMB CU INDUÏDA PER DSS.**

El present treball es va realitzar al Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica baix la direcció de les professores titulars Dra. M<sup>ª</sup> Carmen Recio Iglesias i Dra. Teresa M<sup>ª</sup> Garrigues Pelufo, i va donar lloc a un treball de fi de Màster titulat: “Estudi de l’absorció d’apocinina, un derivat fenòlic amb activitat antiinflamatòria, en rates amb CU induïda per DSS”. Els resultats obtinguts a l’estudi van ser presentats al sisè Congrés Europeu de Farmacologia (EPHAR 2012), per mitjà d’un pòster titulat “Study of the absorption of apocynin, anti-inflammatory natural product, in rats with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate”.

Amb l’objectiu de determinar la constant d’absorció ( $K_a$ ) d’apocinina en rates Wistar sanes i malaltes de CU es va induir la malaltia per l’administració de DSS a una concentració de 3,4% durant 7 dies en l’aigua de beguda. Finalitzada l’experiència, els animals es van processar per a l’estimació del paràmetre d’absorció d’apocinina per mitjà de la tècnica de perfusió in situ de Doluisio (Doluisio *et al.*, 1969) a l’intestí prim i còlon.

### **– ESTUDI D'ABSORCIÓ D'APOCININA A L'INTESTÍ PRIM DE RATES SANES I MALALTES:**

En condicions normals, l’absorció d’apocinina a l’intestí prim pot considerar-se com lucrativa, ja que la seua semivida d’absorció es situa al voltant dels 5 min (Figura All.1A). Aquest fet suposa que, després de la seua administració oral, la seua absorció es produirà quasi totalment en aquest tram intestinal. Per contra, la presència de la malaltia va suposar

una reducció significativa de l'absorció d'apocinina a l'intestí prim, com es va poder observar per la reducció del valor de  $K_a$  (Figura All.1B).

A)			
t (min)	C romanent apocinina ( $\mu\text{g/mL}$ )		
5	400,94	$K_a$ ( $\text{h}^{-1}$ ) $2,99 \pm 0,64$ $AO$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $528,76 \pm 264,22$ $r$ 0,98	
10	395,03		
15	262,26		
20	208,06		
25	156,14		
30	114,37		

B)			
t (min)	C romanent apocinina ( $\mu\text{g/mL}$ )		
5	437,43	$K_a$ ( $\text{h}^{-1}$ ) $4,33 \pm 0,58^*$ $AO$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $662,72 \pm 226,64$ $r$ 0,99	
10	315,66		
15	211,71		
20	136,49		
25	93,70		
30	67,67		

**Figura All.1. Estudi d'absorció d'apocinina perfosa a l'intestí prim de rates sanes (A) i malaltes per CU induïda per DSS (B).** Les taules a l'esquerra mostren les concentracions romanents d'apocinina mesurades a diferents temps després de la perfusió d'1 mg/mL a l'intestí prim. A la dreta es mostra el valor de la constant d'absorció ( $K_a$ ). Significativament diferent vs  $K_a$  en rates sanes:  $*p < 0,05$  ( $t$  de Student,  $n = 6-8$ ).

– **ESTUDI D'ABSORCIÓ D'APOCININA AL CÒLON DE RATES SANES I MALALTES:**

Curiosament, la influència de la malaltia al còlon va tindre un efecte contrari a aquella de l'intestí prim, ja que l'absorció d'apocinina es va incrementar en un 45 % en rates malaltes respecte a les sanes en aquest tram del tracte intestinal (Figura All.2).

A)			
t (min)	C rmanent apocinina ( $\mu\text{g/mL}$ )		
5	486,53		
10	239,36	$K_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$7,94 \pm 0,71$
15	140,76	$AO$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$934,91 \pm 64,49$
20	73,28	r	0,95
25	40,25		
30	24,49		

B)			
t (min)	C rmanent apocinina ( $\mu\text{g/mL}$ )		
5	446,16		
10	257,26	$K_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$6,84 \pm 0,34^*$
15	147,68	$AO$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$845,38 \pm 62,06$
20	80,81	r	0,99
25	42,69		
30	19,86		

**Figura AII.2. Estudi d'absorció d'apocinina perfosa al còlon de rates sanes (A) i malaltes per CU induïda per DSS (B).** Les taules a l'esquerra mostren les concentracions rmanents d'apocinina mesurades a diferents temps després de la perfusió d'1 mg/mL al còlon. A la dreta es mostra el valor de la constant d'absorció ( $K_a$ ). Significativament diferent de  $K_a$  en rates sanes:  $*p < 0,05$  ( $t$  de Student,  $n = 6-8$ ).



## ANNEX III. CERTIFICAT DEL COMITÉ ÈTIC

VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA  
Vicerectorat d'Investigació i Política Científica

**DR. PEDRO CARRASCO SORLÍ**  
**Presidente del Comité Ético de Experimentación y Bienestar**  
**Animal de la Universitat de València**

CERTIFICA:

Que, reunido el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal el día 9 de febrero de 2009, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal, presentado en el proyecto titulado "Fenoles de origen natural en el tratamiento y prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal. Screening virtual, selección y ensayos farmacológicos", presentado por el Dr. José Luis Rios Cañavate.

En Valencia, a 9 de febrero de 2009.



Carrer: Blasco Ibáñez, 13  
VALÈNCIA 46101

Tel/Mov: (96) 386 41 09  
Fax: (96) 386 42 24  
email: vicerec.investigacio@uv.es





## IX. ARTICLES PUBLICATS



# Protective Effect of Apocynin in a Mouse Model of Chemically-Induced Colitis

## Authors

Marta Marín, Rosa María Giner, José-Luis Ríos, María del Carmen Recio

## Affiliation

Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, València, Spain

## Key words

- apocynin
- dextran sulfate sodium
- inflammatory bowel disease
- ulcerative colitis
- inflammatory cytokines
- *Picrorhiza kurroa*
- Scrophulariaceae

## Abstract

Apocynin, a constituent of *Picrorhiza kurroa*, successfully inhibits NADPH oxidase and shows promise as an anti-inflammatory drug. Now, we report anti-inflammatory effects of apocynin in an experimental colitis model induced by dextran sulfate sodium as well as the effects on the mediators involved in this process. Apocynin reduced the colitis induced in mice by administration of 5% dextran sulfate sodium during 7 days. Mice were fed a control diet or a diet supplemented with 2% of apocynin or 2% of rutin. Sulfasalazine (50 mg/kg, p.o.) was used as a positive control.

Treatment with apocynin and rutin ameliorated the course of colonic inflammation with results similar to those of the reference drug, as could be seen by reductions in the disease activity index scores and colon length. NO and PGE<sub>2</sub> production as well as the iNOS and COX-2 expression were reduced by apocynin and rutin. Moreover, the activation of NF-κB p65 as well as STAT3 in dextran sulfate sodium-treated colon tissues was significantly reduced by apocynin. These results are promising for further experimental studies on treating gastrointestinal diseases and on the potential protective effects of apocynin.

## Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is an idiopathic disease characterized by abdominal pain, severe diarrhea, rectal bleeding, and weight loss, with involved regions of the bowel often exhibiting an intense infiltration of leukocytes, crypt cell hyperplasia, interstitial edema, and mucosal ulcerations. The two major clinically defined forms of IBD, Crohn's disease and ulcerative colitis, can manifest either as chronic remittent or progressive inflammatory conditions. Both are associated with an increased risk for colon cancer [1]. Along with extensive gut inflammation and tissue injury, IBD is characterized by enhanced production of reactive oxygen species (ROS), largely generated by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase), which is present in the plasma membrane of phagocytic cells such as macrophages and polymorphonuclear leukocytes [2]. In IBD patients, nuclear factor (NF)-κB plays a key role in the proinflammatory response, resulting in the strongly enhanced expression of proinflammatory genes and the recruitment of excess inflammatory cells to the intestinal wall [3]. Increased NF-κB expression in mucosal mac-

rophages is accompanied by an increased capacity of these cells to produce and secrete proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, and IL-6 [4]. Although the etiology and pathogenesis of IBD have yet to be determined, various experimental models of enterocolitis have led to a better understanding of the disease. Colitis in mice may be induced by chemicals such as dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water, causing weight loss, diarrhea with blood, and shortening of the colon [5]. Corticosteroids and immunosuppressant drugs constitute the basis of treatment for IBD but, because they do not always assure satisfactory outcomes, better treatment strategies that effectively attenuate the mucosal inflammation with fewer side effects are sorely needed. Thus, dietary phenolics may be an alternative or can be used complementarily to control this disease [6–9]. Recently, we have demonstrated the potential protective effect of a phenolic cocoa extract [10], oleuropein [11], or shikonin [12] in the DSS-induced mice ulcerative colitis. Furthermore, we have established their mechanism of actions that include inhibition of transcription factors such as signal transducer and activator of transcription

received March 8, 2013  
revised July 10, 2013  
accepted July 15, 2013

## Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1350710>  
Published online August 22, 2013  
Planta Med 2013; 79: 1392–1400 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

## Correspondence

Prof. Dra. M. C. Recio  
Departament de Farmacologia  
Facultat de Farmàcia, Universitat de València  
Av. Vicent Andrés Estellés s/n.  
46100 Burjassot, València  
Spain  
Phone: + 34 963 54 32 83  
Fax: + 34 963 54 49 43  
maria.c.recio@uv.es

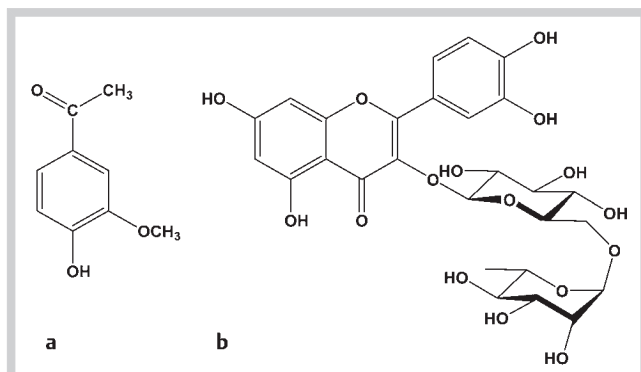


Fig. 1 Chemical structure of apocynin (a) and rutin (b).

(STAT)1 and STAT3 [10], NF- $\kappa$ B [11], or both NF- $\kappa$ B and STAT3 [12]. Vanillic acid is a dietary compound that ameliorates the experimental colitis [13]. Similar to this compound is apocynin or 4-hydroxy-3-methoxyacetophenone (● Fig. 1a), a constituent of the Himalayan herb *Picrorhiza kurroa* Royle (Scrophulariaceae). It is used in experimental pharmacology as an inhibitor of NADPH-oxidase complex [14]. An increasing number of *in vivo* experiments have shown the potential of apocynin as a possible anti-inflammatory drug in experimental arthritis [15] or airway inflammation [16, 17]. The anti-inflammatory effect of apocynin in experimental Crohn's disease has been previously reported by Palmen et al. [18] and Rachmilewitz et al. [19], however this is the first time that apocynin is examined on a model of experimental ulcerative colitis induced by DSS, and the mechanisms involved, different from that of the known antioxidative action, are discussed.

## Results

Five clearly distinguished groups of mice were used in the study. Except for the sham group, which received tap water with no additives, all other groups of mice were given drinking water supplemented with 5% DSS. Two of these groups were given diets supplemented with apocynin or rutin to a final content of 2% (w/w), and the third group received by oral gavage the reference drug sulfasalazine (50 mg/kg). Water consumption and diet were checked every day; no differences among the experimental groups were observed. Mice given 5% DSS in drinking water for 7 days developed signs of severe acute colitis without mortality. Animals in the treatment groups consumed either 4.13 g of apocynin/kg or 4.35 g of rutin/kg daily, which in humans is equivalent to 334 mg/kg and 352 mg/kg, respectively, according to the human equivalent formula [20].

One prominent sign of colitis was a gradual reduction in initial body weight, however, significant recovery from a DSS-induced decrease in body weight was observed in the apocynin group ( $p < 0.001$ ) as well as in the reference group ( $p < 0.05$ ) (● Fig. 2A). The treated groups exhibited an improvement in the appearance of feces and alleviation of bloody stool, which led to a marked decline in DAI values (according to Cooper et al. [21]):  $3.17 \pm 0.08$  (control group) vs.  $1.56 \pm 0.15$  (apocynin group,  $p < 0.001$ ),  $2.14 \pm 0.13$  (rutin group,  $p < 0.01$ ), and  $2.08 \pm 0.19$  (sulfasalazine group,  $p < 0.05$ ). Throughout the study, a group of mice receiving apocynin or rutin alone showed no significant alterations in the body weight and the inflammation score in comparison with sham mice (data not shown). Macroscopic examination of colon specimens after 7 days of DSS treatment revealed significant differences in length reduction (● Fig. 2B). It was significantly lower in the colitis than the normal colons:  $5.29 \pm 0.21$  cm (control group) vs.  $9.18 \pm 0.39$  (sham group,  $p < 0.001$ ). This effect

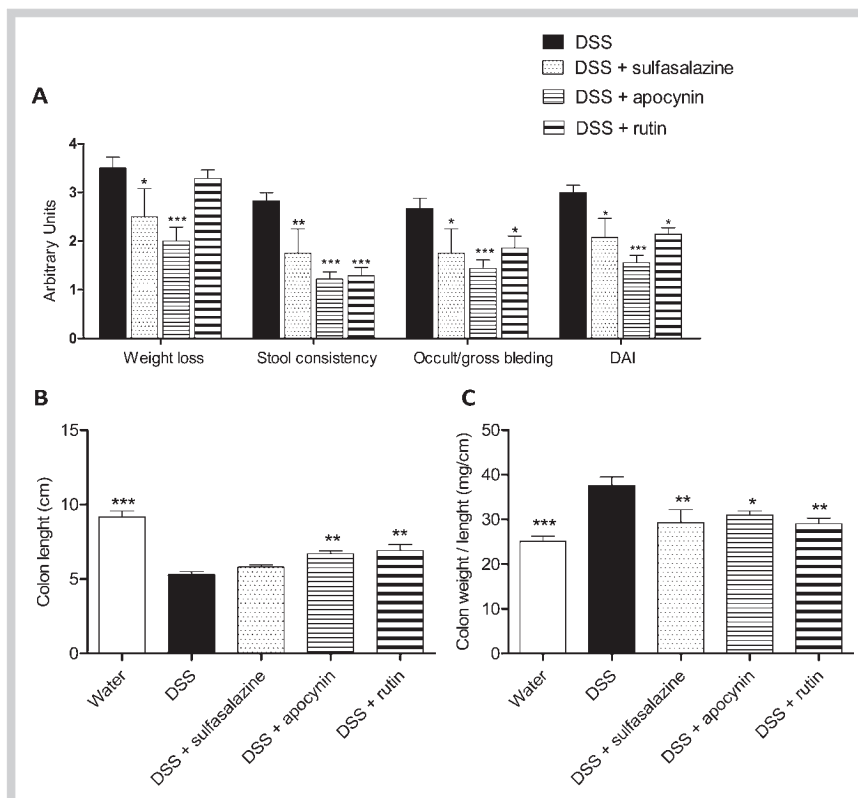
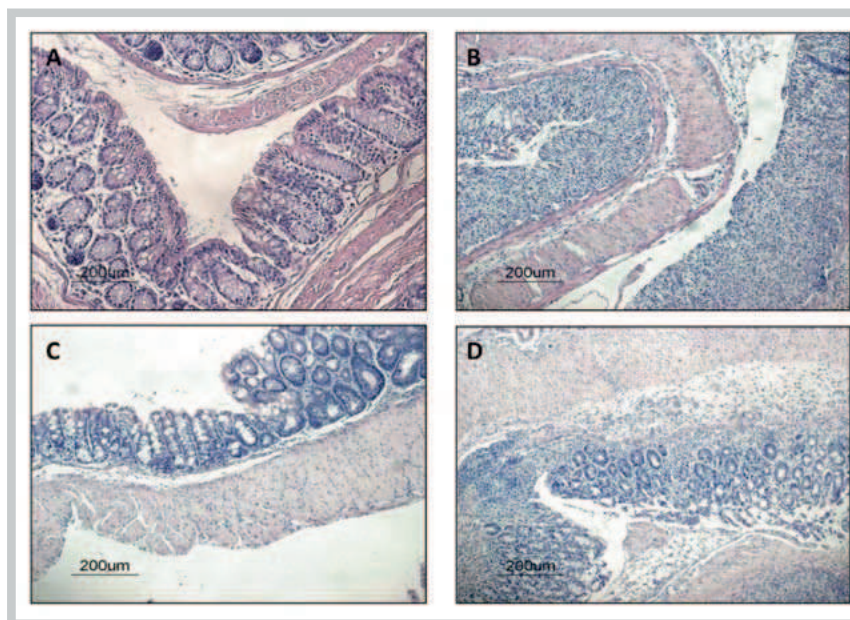


Fig. 2 Effect of apocynin, rutin, and sulfasalazine treatment on acute DSS colitis. Balb/C mice were given water alone, 5% DSS in drinking water, or a combination of 5% DSS in drinking water and standard feed supplemented with apocynin or rutin (2% final content w/w) and sulfasalazine by oral gavage (50 mg/kg in 0.2 mL of water). **A** Total DAI score. The index was scored in accordance with the scoring system in ● Table 1. **B** Colon length. **C** Colon weight-to-length ratio. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; significantly different from the control group ( $n = 6$ ).

Score	Weight loss (%)	Stool consistency	Rectal bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1–5	Soft	Occult
2	5–10	Loose	Slight bleeding
3	10–20		
4	>20	Diarrhea	Gross bleeding

**Table 1** Criteria for scoring the disease activity index. DAI value = the combined scores of weight loss, stool consistency, and bleeding divided by 3. Adapted from Cooper et al. [21].



**Fig. 3** Effect of dietary supplementation with apocynin and rutin on histological parameters in acute DSS-induced colitis in mice. Four representative colonic hematoxylin/eosin sections: mice received either fresh tap water (A), fresh tap water with 5% DSS (B), or fresh tap water with 5% DSS and treatment with apocynin (C) or rutin (D). Original magnification, 200 $\times$ . (Color figure available online only.)

was prevented by apocynin ( $6.70 \pm 0.20$  cm,  $p < 0.05$ ) and rutin ( $6.92 \pm 0.39$  cm,  $p < 0.05$ ). In the sulfasalazine group, we observed a moderate and no statistical significant effect ( $5.80 \pm 0.14$  cm). Significant increase in the colonic weight/length ratio (measured as a marker of tissue edema) was observed in the colitic mice (Fig. 2C):  $37.61 \pm 1.85$  mg/cm (control) vs.  $25.09 \pm 1.02$  (sham group,  $p < 0.001$ ). Apocynin, rutin, and the reference drug significantly decreased this ratio:  $31.00 \pm 0.90$  mg/cm (apocynin,  $p < 0.05$ ),  $29.05 \pm 1.25$  mg/cm (rutin,  $p < 0.01$ ), and  $29.30 \pm 2.88$  mg/cm (sulfasalazine,  $p < 0.01$ ).

Sham mouse colon sections showed the epithelium intact with a well-defined crypt length and no infiltration of edema neutrophils into mucosa or submucosa and no ulcers or erosions (Fig. 3A; day 7). In contrast, colon tissue from DSS-treated mice (control) showed mucosal injury with loss of crypts and epithelial integrity as well as severe inflammatory cell infiltration (Fig. 3B). Morphological alteration associated with DSS treatment was reduced upon dietary supplementation of 2% apocynin (Fig. 3C) keeping the colonic architecture and reducing epithelium loss. After oral rutin treatment, only a slight reduction of inflammatory cells and epithelium loss were observed (Fig. 3D). After 7 days of DSS treatment, MPO activity markedly increased to a level approximately 6 times higher than that observed in the sham group (Fig. 4A). This index of neutrophil infiltration was significantly lower in the apocynin group in comparison with the control group:  $22.93 \pm 2.60$  (control) vs.  $14.10 \pm 1.67$  (apocynin;  $p < 0.05$ ).

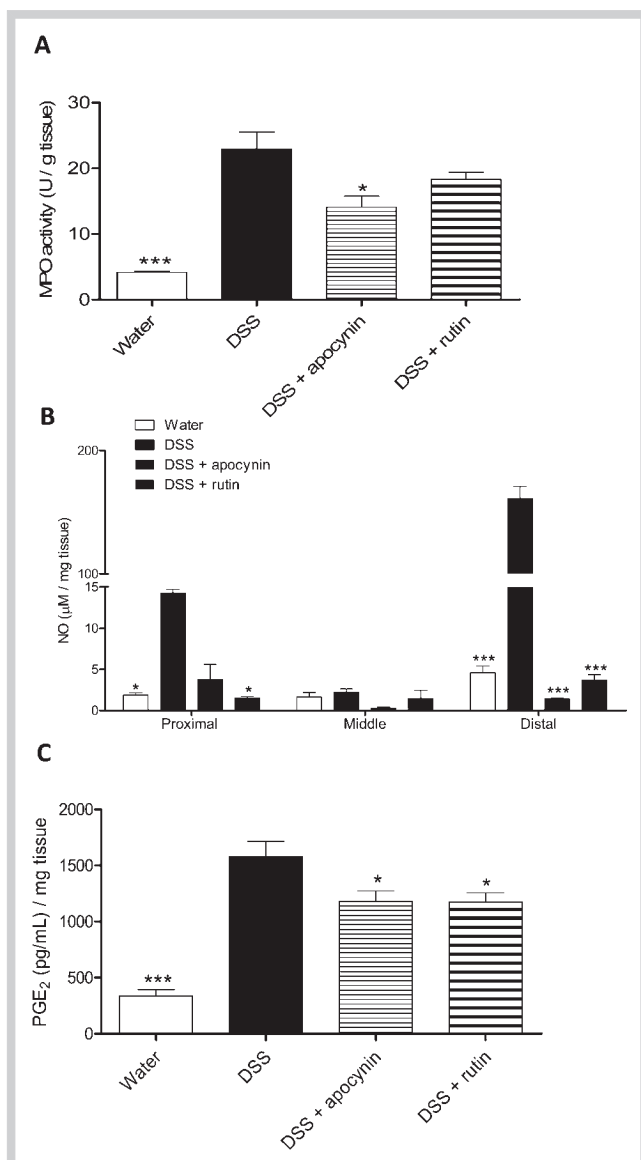
To determine the effect of apocynin and rutin on the production of major inflammatory mediators playing a key role in the pathogenesis of IBD, we analyzed the production of NO, selected cytokines, and PGE<sub>2</sub> in the colonic tissue after 7 days of DSS treatment. The total colonic NO content was about 22 times that of

noncolitic mice, an increase that was mainly observed in the distal colon rather than in the middle or proximal colon. Dietary supplementation with apocynin and rutin significantly and completely inhibited DSS-induced NO production, lowering it to the levels observed in noncolitic mice, especially in the distal area (Fig. 4B):  $161.12 \pm 9.72$   $\mu$ M of NO per mg tissue (control) vs.  $1.42 \pm 0.14$   $\mu$ M of NO per mg tissue (apocynin,  $p < 0.001$ ) and  $3.70 \pm 0.69$   $\mu$ M of NO per mg tissue (rutin,  $p < 0.001$ ).

The PGE<sub>2</sub> levels increased approximately 5-fold ( $p < 0.001$ ) upon DSS administration, but dietary supplementation with apocynin and rutin significantly counteracted PGE<sub>2</sub> production at day 7 (Fig. 4C):  $1581.62 \pm 135.03$  pg/mL PGE<sub>2</sub> per mg tissue (control) vs.  $1180.50 \pm 93.04$  pg/mL PGE<sub>2</sub> per mg tissue (apocynin,  $p < 0.05$ ) and  $1176.54 \pm 81.39$  pg/mL PGE<sub>2</sub> per mg tissue (rutin,  $p < 0.05$ ). The expression of iNOS was found to be remarkably increased in the colons of mice with DSS-induced colitis (Fig. 5A), while apocynin and rutin significantly reduced its expression by 54% and 72%, respectively ( $p < 0.001$ ). Similar results were found for the induction of COX-2 (Fig. 5B). Either apocynin or rutin significantly prevented the upregulation of COX-2 by 49% and 59%, respectively ( $p < 0.05$ ).

The production and the mRNA expression of proinflammatory cytokines in apocynin- and rutin-treated mice with DSS-induced colitis were compared with those of colitic and noncolitic mice. Throughout DSS treatment, production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  was significantly enhanced in the control group vs. the sham group, while treatment with apocynin prevented it (Table 2). To gain further insight into the molecular mechanisms underlying the amelioration of colitis by apocynin and rutin, we measured the mRNA expression levels of these inflammatory cytokines in the colon (Fig. 6A–C). Colonic tissues treated with DSS alone showed elevated IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  mRNA expres-





**Fig. 4** Effect of apocynin and rutin supplemented diet on: **A** MPO activity induced by DSS in mice, **B** NO, and **C** PGE<sub>2</sub> production in colon homogenates after 5% of DSS for 7 days. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three experiments involving six to eight mice per group. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; significantly different from the control group.

sion over basal levels, whereas mice whose diet had been supplemented with apocynin and rutin exhibited considerably reduced colonic mRNA expression of these entities. We also examined the levels of VCAM-1 mRNA and found that apocynin and rutin treatments significantly decreased mucosal VCAM-1 mRNA expression, as shown in **Fig. 6D**. These results suggest that the inhibitory effect of apocynin and rutin on DSS-induced production of proinflammatory cytokines takes place at the transcription level. In our study, we have observed a significant reduction in STAT3 levels in the DSS-treated group (**Fig. 7A**), which indicates increased activity of this transcription factor in the colon tissue of colitic mice as compared to noncolitic mice. After oral treatment with apocynin and rutin, STAT3 was significantly downregulated to normal values ( $p < 0.01$ ). Treatment with apocynin and rutin regulated the activation of NF- $\kappa$ B p65 in the tissues affected by colitis (**Fig. 7B**). After treatment with apocynin and rutin, acti-

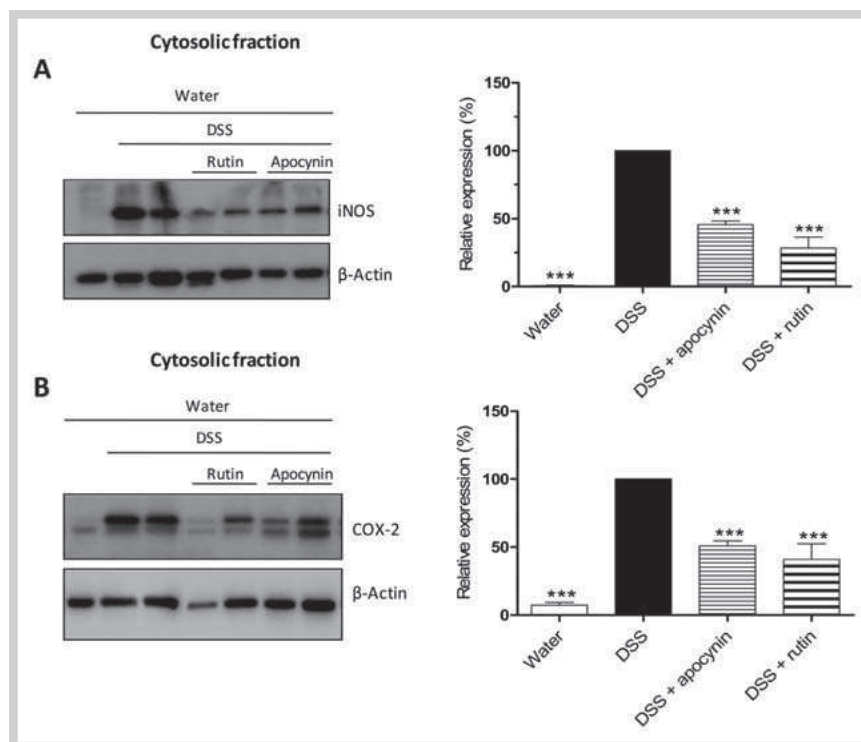
vation was significantly reduced by 52% ( $p < 0.001$ ) and 23% ( $p < 0.05$ ), respectively.

## Discussion

Murine DSS-induced colitis is a recently validated experimental model encompassing both conventional and novel biological therapies currently used to treat IBD patients [22]. Data above shows that first-line treatment with 5-ASA compounds has limited effects on this model. One explanation could be that after oral administration in mice, there is insufficient colonic exposure. Whereas sulfasalazine is used in human chronic disease to prevent relapses as well as in mild to moderately acute disease, it is not generally employed in the treatment of severe acute attacks, for which other treatment drugs are more successful [23]. In this paper, we have found similar results, which suggests that the treatment period was too short for sulfasalazine to be effective. We found that apocynin or rutin incorporated into the normal diet of mice at a final concentration of 2% during seven days attenuated both the macroscopic and histopathological alterations induced in the colon by DSS and generally reduced disease severity. Our results with rutin are in agreement with those of Kwon et al. [24] and are very similar to those of other flavonoids recently reviewed by Hur et al. [25].

Although previous reports have demonstrated the protective effects of apocynin on Crohn's disease through the inhibition of ROS production and the influx of inflammatory cells into the colon [18,19], this is the first time that its effects on DSS-induced colitis have been studied. More recently, published studies have reported its anti-inflammatory activity on an experimental model of acute carrageenan-induced lung inflammation through its ability to reduce infiltration of neutrophils in lung tissues, decrease the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and inhibit the expression of adhesion molecules while reducing the level of NF- $\kappa$ B p65 and iNOS in lung tissues [16]. In this research, the proposed mechanism of action for apocynin as an anti-inflammatory agent involves the inhibition of NADPH oxidase, thereby interfering with ROS production. This is vital, as increased levels of ROS are responsible for MAPK and NF- $\kappa$ B expression as well as the subsequent PARP-mediated endothelial injury and the infiltration of polymorphonuclear cells into the affected tissue, which leads to the release of proinflammatory cytokines and tissue damage. If apocynin does indeed act by blocking ROS production, it may reduce harmful effects to the inflamed tissue in the early stages of the inflammatory process.

Our results are in agreement with this hypothesis, but we also observed decreases in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ Bp65, and iNOS levels in the bowel tissues. Because the role of NADPH-oxidase in DSS-induced ulcerative colitis is less than that of iNOS [2], it seems clear that additional mechanisms must be involved. However, it was also previously reported that blocking both iNOS and NADPH oxidase is more effective in protecting mice from DSS-colitis than blocking either component alone [2]. Several reports have demonstrated that both leukocyte recruitment and mucosal damage in experimental models of colitis are blocked by immune-neutralization of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) [26,27]. Moreover, apocynin and rutin (a known antioxidant agent) were shown to reduce the recruitment of polymorphonuclear cells into the mucosa through their effect on the expression of proteins involved in cell evasion from the bloodstream, such as VCAM-1.



**Fig. 5** Effect of apocynin and rutin supplemented diet on (A) iNOS and (B) COX-2 expression in the colon tissue after 5% of DSS for 7 days. Levels were normalized against  $\beta$ -actin. \*\*\*  $P < 0.001$ ; significantly different from the control group ( $n = 6-10$ ).

**Table 2** Effects of apocynin and rutin on the production of colonic inflammatory cytokines (pg/mg protein) in DSS-induced colitis.

Group	IL-1 $\beta$		IL-6		TNF- $\alpha$		IFN- $\gamma$	
	mean $\pm$ SEM	%I	mean $\pm$ SEM	%I	mean $\pm$ SEM	%I	mean $\pm$ SEM	%I
DSS	151.8 $\pm$ 5.9	–	108.9 $\pm$ 8.0	–	156.8 $\pm$ 9.8	–	55.8 $\pm$ 6.6	–
Water	63.3 $\pm$ 2.6	–	50.1 $\pm$ 2.3	–	69.6 $\pm$ 0.9	–	21.9 $\pm$ 0.3	–
DSS + apocynin	119.8 $\pm$ 6.3*	36	65.5 $\pm$ 8.5*	74	88.6 $\pm$ 26.2*	78	30.0 $\pm$ 3.8*	76
DSS + rutin	121.8 $\pm$ 16.0	34	73.8 $\pm$ 9.9*	60	71.8 $\pm$ 17.4*	97	9.1 $\pm$ 0.2*	100

\* Different ( $p < 0.05$ ) from DSS group;  $n = 6$

Another marker of inflammatory response in the colonic mucosa is MPO activity, which is related to neutrophil infiltration. Leukocyte infiltration is an important source of reactive oxygen and nitrogen species, which contribute to local tissue damage during inflammation. DSS was found to induce a marked increase in colonic MPO activity compared to controls. In our experiments, both apocynin and rutin significantly decreased MPO activity in mice with acute DSS-induced colitis, which is positively correlated with the reduced leukocyte infiltration observed in colon section tissue.

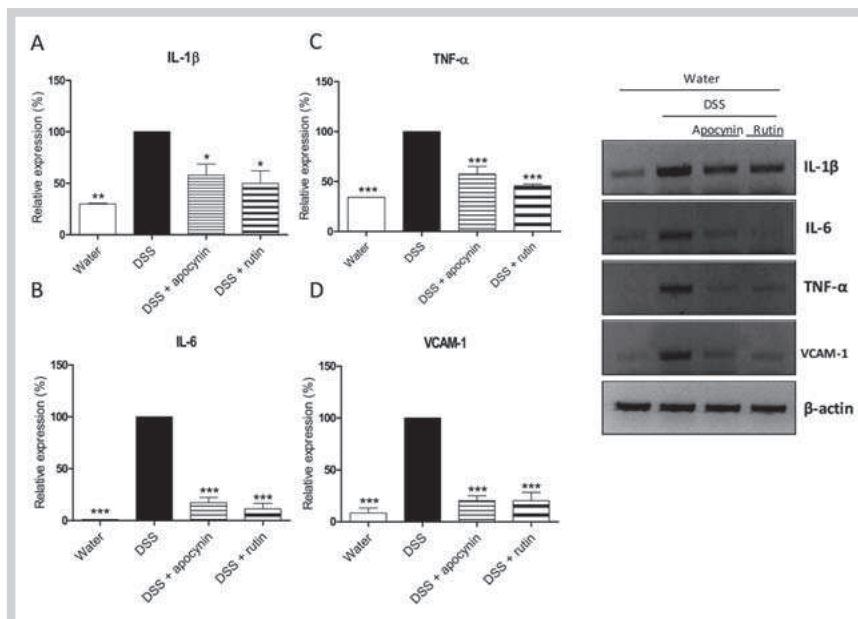
The precise role of NO in the pathophysiology of ulcerative colitis is controversial. Rumi et al. [28] reported that endogenous NO exerts a biphasic influence on DSS-induced colitis, depending on the NOS isoenzyme. The NO produced by inducible NOS (iNOS), for example, has a detrimental effect on the development of colitis. In our results, the enhanced NO release in colon tissue from colitic animals is a toxicity marker, while the significant reduction observed in the treated animals could be due to the protective effect of apocynin and rutin. Similar results have been recorded for other important natural products, for example, curcumin [29].

NF- $\kappa$ B and STATs constitute two important families of transcription factors that are activated in response to a variety of stimuli in order to regulate multiple cellular processes, including the im-

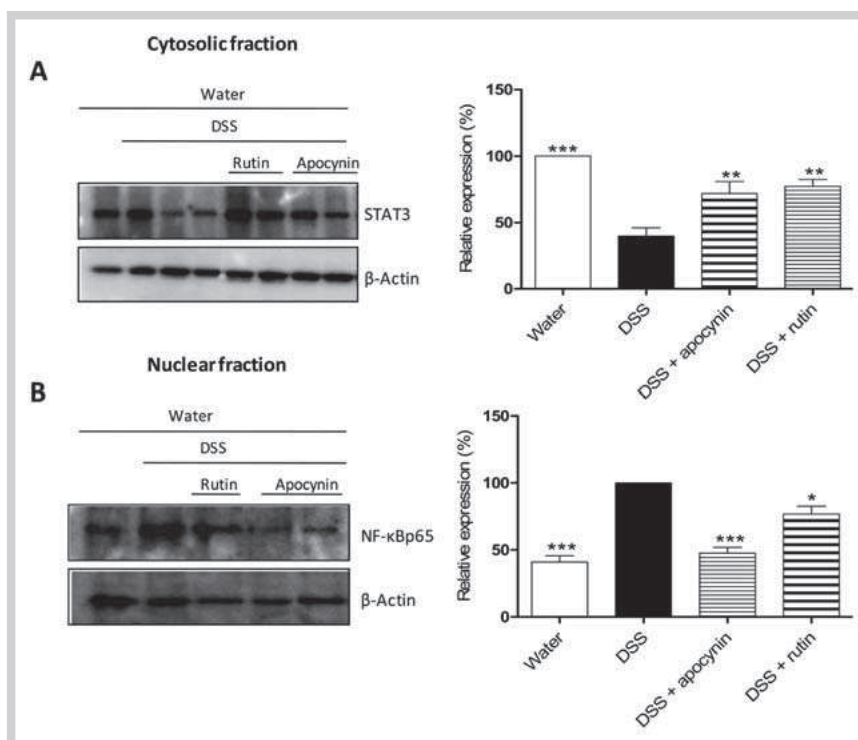
mune response. These transcription factors have distinct and synergistic effects on gene induction [30]. Because the activation of NF- $\kappa$ B p65 is involved in colitis, its inhibition has been suggested as an anti-inflammatory strategy in the disease [31]. We thus studied the effect of apocynin on NF- $\kappa$ B p65 activation and found that it was significantly reduced (52%) after treatment with the compound with respect to the control group. In addition to the role of NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of ulcerative colitis, STAT3 has also been implicated in the development of the disease (through the production of IL-6) as well as in its evolution towards dysplasia and cancer [32]. Indeed, patients with active ulcerative colitis have significantly more IL-6 and phospho-STAT3-positive epithelial cells than either patients with inactive ulcerative colitis or healthy volunteers [33].

STAT3 activation plays a prominent role in promoting inflammation in DSS-induced colitis [34]; therefore, suppression of STAT3 activity may be necessary for the elimination of inflammation in the colon. When we studied the levels of cytosolic STAT3 in the colon tissue of the mice, we observed a significant reduction in the STAT3 levels of the DSS-treated group, which indicates an increased activity of this transcription factor in the colon tissue of colitic mice as compared with that of noncolitic mice. Oral treatment with apocynin significantly downregulated STAT3 to normal values.





**Fig. 6** Changes in the mRNA expression of proinflammatory mediators in mice with DSS-induced colitis. Proinflammatory gene expression levels of **A** IL-1 $\beta$ , **B** IL-6, **C** TNF- $\alpha$ , **D** VCAM-1 to  $\beta$ -actin were measured with densitometry. Representative photographs from six independent experiments with each gene. \*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; significantly different from the control group ( $n = 6$ ).



**Fig. 7** Effect of apocynin and rutin supplemented diet on **A** STAT3 and **B** NF- $\kappa$ B p65 activation in the colon tissue after 5% of DSS for 7 days. Levels were normalized against  $\beta$ -actin antibody. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of each group. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; significantly different from the DSS group ( $n = 6-10$ ).

With regard to similar compounds and their effects on experimental IBD, several studies on vanillic and syringic acids [13, 35] are noteworthy. For example, treatment with the former has been shown to reduce the experimental weight loss and colon shortening caused by DSS, as well as the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and COX-2 at the site of inflammation. Because the levels of these inflammatory mediators are elevated in ulcerative colitis patients, their reduction by vanillic acid was proposed as a potential mechanism of action. Moreover, vanillic acid downregulated NF- $\kappa$ B p65, which led to a considerable reduction in the production of proinflammatory cytokines and inducible enzymes, thus justifying the inhibitory effects of this compound on ulcerative colitis through the regulation of NF- $\kappa$ B p65 activation [13].

The pharmacological potential of apocynin as a specific inhibitor of the phagocytic oxidative burst was discovered in a screening of the roots of *Picrorhiza kurroa*, a plant used in Ayurvedic medicine, for antioxidant principles [36]. Frequently, therapy in IBD patients with anti-inflammatory or immunosuppressant drugs is ineffective or is associated with many well-known adverse effects. According to Wong et al. [37], up to 50% of pediatric IBD patients have used complementary and alternative therapies. Recently, Suskind et al. [38] published the first study on the tolerability of curcumin in pediatric IBD patients. The pilot study suggests that curcumin may be used as an adjuvant, combined with conventional medicine, with no clinically significant adverse effects. In the same fashion, daily oral administration of apocynin showed a good safety profile in asth-

matic humans [39]. The primary aim of the current research was to test the protective properties of apocynin on the development of UC in the DSS-induced colitis in Balb/C mice. Further studies are required to fully assess the use of apocynin as a novel complementary and/or alternative treatment in IBD patients.

## Materials and Methods

### Drugs and chemicals

DSS (MW; 36000–50000) was purchased from MP Biomedical. Signal transducer and activator of transcription (STAT3) and NF- $\kappa$ B p65 polyclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. COX-2 and iNOS polyclonal antibodies were obtained from Millipore Corporation. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IFN- $\gamma$  ELISA kits were purchased from eBioscience. PGE<sub>2</sub> levels were quantified with the aid of an enzyme immunoassay obtained from Cayman Chemicals.  $\beta$ -Actin polyclonal antibody, peroxidase-conjugated secondary antibodies, apocynin (purity 98%), rutin hydrate (purity >94% by HPLC), sulfasalazine (purity >98%), and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

### Animals

Housing conditions and all experiments followed a protocol approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Valencia (N° 108 A1233134999884, 28–01–2009), in accordance with current Spanish legislation (RD1201/2005) and Helsinki declaration. For 7 days before the experiments, six-week-old female Balb/C mice weighing 18–20 g (Harlan Interfauna Iberica) were kept in cages in groups of four or five and maintained under a 12-h light/dark cycle at 22 °C with constant humidity and fed with standard laboratory rodent diet and water *ad libitum*. For administering apocynin and rutin in the diet, we examined previously reported data for curcumin, a natural phenolic used in both the TNBS [40] and DSS [41]-induced models of IBD in mice.

### Induction of DSS colitis and treatments

Acute ulcerative colitis was induced by administering a 5% DSS (w/v) solution, supplied as drinking water for 7 days *ad libitum*. The mice were randomly assigned to one of five groups: sham group (mice received drinking water and control diet, n = 5), DSS group (mice received 5% DSS in drinking water and control diet, n = 10), DSS + apocynin group (mice received 5% DSS in drinking water and diet supplemented with 2% apocynin, n = 8), DSS + rutin group (mice received 5% DSS in drinking water and diet supplemented with 2% rutin, n = 8), and sulfasalazine group (mice received 5% DSS in drinking water and control diet. Sulfasalazine was administered orally at 50 mg/kg since the first day in a volume of 10 mL/kg of drinking water, n = 5). Fresh diets were produced daily as described previously [42], by mixing powdered food with products (2% apocynin and rutin, final content). Then, water and a microwave-melted agar (0.2% final content in the diet, w/w) were both added and mixed well. The food was dried for 24 h and divided into portions based on an estimated consumption of 4 g of dry matter/mouse/day. Body weight and food and drink consumptions were monitored every day for 7 days, after which the animals were sacrificed by means of cervical dislocation. The abdomen was dissected, and the colon was removed. Two additional groups of Balb/C mice were fed either the apocynin- or rutin-supplemented diet without DSS for 7 days in order

to study the effects of both products on healthy mice. Three colon samples were prepared for histological analysis as described later, and the rest were rinsed with cold PBS, blotted dry and weighed, and their length was measured to determine the weight/length ratio. Then, samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at –80 °C until use.

### Disease activity index (DAI)

To assess the severity of colitis, colon length and the colon weight-to-length ratio were measured as indices of macroscopic inflammation. The severity of clinical DSS-induced colitis was analyzed in terms of average disease activity index (DAI), which was calculated by scoring three major clinical signs: body weight reduction, stool consistency, and rectal bleeding. These parameters were each assigned a score according to previously described criteria [21]; the scores were then used to calculate a DAI for each animal (Table 1). Body weight was measured daily after the induction of colitis. Diarrhea and rectal bleeding were evaluated on the last day of the experiment.

### Histological analysis

For microscopic histological evaluation, colon samples were cut longitudinally along the main axis and rolled from distal to mid. They were then fixed in 4% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Sections (4  $\mu$ m) were cut and stained with hematoxylin and eosin. Histological evaluation was carried out by an experienced pathologist blinded to the experimental groups who examined the intensity of mononuclear and polymorphonuclear infiltrates in the *lamina propria* and the extent of crypt dilation, cellular destruction, and mucosal ulceration.

### Assessment of leukocyte involvement

The colonic myeloperoxidase (MPO) activity was measured as a marker of neutrophil infiltration according to the method proposed by Suzuki et al. [43] and described previously [11]. Briefly, frozen colonic tissues (150–200 mg) were thawed and ground to a fine powder in a liquid nitrogen-cooled mortar. A scoop (15–20 mg) of the resulting dry powder was then weighed and homogenized in an 80-mM potassium phosphate buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), an ionic detergent previously shown to solubilize MPO. After homogenization had been achieved, the mixture was frozen-thawed 3 times to release the contents of the primary granules of the polymorphonuclear cells and then subjected to centrifugation at 12000  $\times$  g for 20 min at 4 °C. The supernatants were collected, and MPO activity was assessed by measuring the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride hydrate (TMB). One unit of MPO activity was defined as that degrading 1  $\mu$ mol of hydrogen peroxide per 1 min at 25 °C, expressed per gram of dry powder weight of tissue.

### Colon tissue culture

Tissue from the colons to be cultured were washed with RPMI 1640 (Invitrogen) medium containing 2% fetal bovine serum (FBS), penicillin, and streptomycin before being cut into small pieces. Then, approximately 1 cm of tissue was placed in a 24-well culture plate containing RPMI 1460 medium with 10% FBS and antibiotics and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

### Measurement of cytokines

The concentrations of various proinflammatory cytokines, notably TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , and IL-1 $\beta$ , were measured in the powdered colon homogenate with the aid of an ELISA kit (eBioscience) in accordance with the manufacturer's instructions.

### PGE<sub>2</sub> and NO determination

Nitrite levels in the colonic tissue culture media were determined by means of the Griess reaction assay and presumed to reflect NO levels. Briefly, 100  $\mu$ L supernatant was mixed with 100  $\mu$ L Griess reagent (Sigma-Aldrich). The mixture was then incubated at room temperature for 15 min, after which the absorbance was measured at 540 nm.

PGE<sub>2</sub> levels in the powdered colon tissue samples obtained from each group were determined using an immunoenzymatic method (EIA kit, Cayman Chemical) according to the manufacturer's specifications.

### Isolation of cytosolic and nuclear fractions from mouse colons

Cytoplasmic and nuclear proteins were extracted as described by Andújar et al. [12]. Frozen powdered colonic tissues (150–200 mg) were homogenized in 750  $\mu$ L of ice-cold hypotonic buffer A [10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 1  $\mu$ g/ml aprotinin, leupeptin, and pepstatin, pH 7.9]. Ipegal CA-630 nonionic detergents were added to the homogenates to a final concentration of 0.5%; the homogenates were then incubated for 45 min on ice with shaking. The membrane fraction was precipitated by means of centrifugation at 106  $\times$  g for 10 min at 4°C. The supernatant containing the cytosolic fraction was stored at -80°C until use. The pellet was resuspended in 500  $\mu$ L of buffer B [50 mM HEPES, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, and 10% glycerol, pH 7.8] and kept on ice for 30 min. After additional centrifugation at 20 800  $\times$  g for 5 min, the supernatant containing the nuclear fraction was removed and stored at -80°C until use. After extraction, the presence of proteins in the supernatants was determined with the aid of the Bradford method [44], with bovine serum albumin as the standard. Cell lysates were boiled in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer for 5 min before undergoing electrophoresis (see Western blot assay).

### Western Blot analysis for COX-2, iNOS, NF- $\kappa$ B p65, and STAT3

Equal amounts of protein (30  $\mu$ g) were loaded onto 10% SDS polyacrylamide electrophoresis gel, which was then transferred onto polyvinylidenedifluoride membranes at 350 mA for 120 min. The membranes were blocked for at least 2 h at room temperature in PBS-0.1% Tween-20 (PBS-T) 6% w/v nonfat dry milk and then incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C. For iNOS and COX-2, the membranes were incubated with anti-iNOS (Millipore; 06-573) and anti-COX-2 (Millipore; ABS5118) polyclonal antibodies (1/1000 dilution). For p65, the membranes were incubated with anti-p65 polyclonal antibody (1/500) (Santa Cruz; SC-7151), and for STAT3, they were incubated with anti-STAT3 polyclonal antibody (1/500) (Santa Cruz; SC-8059). After being washed three times with PBS-T, the membranes were incubated with 5% nonfat dry milk and secondary horseradish peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G (1:12 000 dilution; Sigma-Aldrich). To check for equal loading,

the blots were analyzed for  $\beta$ -actin expression with an anti- $\beta$ -actin antibody (1:12 000) (Sigma-Aldrich; A2066). After three washes, the immunoreactive bands were visualized with the aid of an enhanced chemiluminescence system (Millipore). Densitometric data were studied after the blots were normalized to the control.

### RNA extraction and quantification of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and VCAM-1 mRNA

The total RNA from the powdered colon homogenates was isolated with the aid of RNeasy mini spin (50) columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). The concentration of extracted RNA was calculated by measuring the optical density at 260 nm. The ratio of the optical density at 260 nm to that at 280 nm was always higher than 1.8. From each sample, 0.5  $\mu$ g of RNA was transformed to first strand complementary deoxyribonucleic acid (cDNA), and 1  $\mu$ L of the resulting cDNA was mixed with 12.5  $\mu$ L of Red Taq mix and 1  $\mu$ M primers (Invitrogen), and completed to 25  $\mu$ L with RNase-free water with IL-6 (sense: 5'-ATGCTGGTGACAACCACGGCC-3'; antisense 5'-GGCATAACGCACTAGTTTGGCCA-3'), TNF- $\alpha$  (sense: 5'-AGCC-CACGTCGTAGCAAACCAC-3'; antisense: 5'-TAGACGTGCCCG-GACTCCG-3'), IL-1 $\beta$  (sense: 5'-GCTGGAGAGTGTGGATCCCAAG-CA-3'; antisense: 5'-AGCGACTGTCTGGCCGAGG-3'), VCAM-1 (sense: TCGCGTCTTGGGAGCCTCA; antisense: TGACCGTGAC-CGGCTTCCCA) and  $\beta$ -actin (sense: 5'-GCAGAGCAAGAGAGGCA-TCC-3'; antisense: 5'-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3'). The thermocycler (Mastercycler personal) conditions were 94°C for 1 min, with an annealing temperature of 60°C for 1 min and an elongation temperature of 72°C for 1 min for the first 30 cycles, followed by an elongation temperature of 72°C for 10 min. After amplification, the PCR products were size fractionated onto a 2% agarose gel in 1  $\times$  TAE (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA, pH 8.0) and stained with 0.1% ethidium bromide. Detectable fluorescent bands were visualized by using an ultraviolet transilluminator (Millipore). The results were expressed as the ratio of optical density to  $\beta$ -actin.

### Statistical analysis

All results are expressed as arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Data were evaluated with Graph Pad Prism version 5.01 software. Differences among means were tested for statistical significance with a one-way analysis of variance (ANOVA); Dunnett's t-test served as a post hoc significance test with p values < 0.05 being considered statistically significant.

### Acknowledgements

▼ This study was supported by the Spanish government through the Ministerio de Educación y Ciencia (FEDER; SAF2009-10059-C03-01).

### Conflict of Interest

▼ The authors declare no conflict of interest.

### References

- 1 Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 573–621



- 2 Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen, divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001; 194: 1207–1218
- 3 Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Kneuchel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115: 357–369
- 4 Pallone F, Monteleone G. Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 307–312
- 5 Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model, traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*, advance online publication 4 May 2012; DOI: 10.1155/2012/718617
- 6 Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Villegas I, Talero E, de la Lastra CA. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 2010; 633: 78–84
- 7 Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O, Yagi Y, Bamba S, Araki Y, Hata K, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Curcumin prevents the development of dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2993–2998
- 8 Ye Z, Liu Z, Henderson A, Lee K, Hostetter J, Wannemuehler M, Hendrich S. Increased CYP4B1 mRNA is associated with the inhibition of dextran sulfate sodium-induced colitis by caffeic acid in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234: 605–616
- 9 Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice, attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 395–406
- 10 Andújar I, Recio MC, Giner RM, Cienfuegos-Jovellanos E, Laghi S, Mugerza B, Ríos JL. Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 6474–6483
- 11 Giner E, Andújar I, Recio MC, Ríos JL, Cerdá-Nicolás JM, Giner RM. Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 12882–12892
- 12 Andújar I, Ríos JL, Giner RM, Cerdá MJ, Recio MC. Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 271606
- 13 Kim SJ, Kim MC, Um JY, Hong SH. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules* 2010; 15: 7208–7217
- 14 Peters EA, Hiltermann JT, Stolk J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1442–1447
- 15 Pandey A, Kour K, Bani S, Suri KA, Satti NK, Sharma P, Qazi GN. Amelioration of adjuvant induced arthritis by apocynin. *Phytother Res* 2009; 23: 1462–1468
- 16 Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Cuzzocrea S. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochem Pharmacol* 2011; 81: 636–648
- 17 Kim SY, Moon KA, Jo HY, Jeong S, Seon SH, Jung E, Cho YS, Chun E, Lee KY. Anti-inflammatory effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in airway inflammation. *Immunol Cell Biol* 2012; 90: 441–448
- 18 Palmen MJHJ, Beukelman CJ, Mooij RGM, Meuwissen SGM, van Rees EP. Beneficial effect of apocynin, a plant-derived NADPH oxidase antagonist, in TNBS-induced experimental colitis. *Immunol Microbiol Inflamm Disord* 1995; A889
- 19 Rachmilewitz D, Okon E, Karmeli F. Sulphydryl blocker induced small intestinal inflammation in rats: a new model mimicking Crohn's disease. *Gut* 1997; 41: 358–365
- 20 Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22: 659–661
- 21 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69: 238–249
- 22 Sann H, Erichsen JV, Hessmann M, Pahl A, Hoffmeyer A. Efficacy of drugs used in the treatment of IBD and combinations thereof in acute DSS-induced colitis in mice. *Life Sci* 2013; 92: 708–718
- 23 Axelsson LG, Landström E, Bylund-Fellenius AC. Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 925–934
- 24 Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 395–406
- 25 Hur SJ, Kang SH, Jung HS, Kim SC, Jeon HS, Kim IH, Lee JD. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutr Res* 2012; 32: 801–816
- 26 Soriano A, Salas A, Salas A, Sans M, Gironella M, Elena M, Anderson DC, Piqué JM, Panés J. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2000; 80: 1541–1551
- 27 Sans M, Panés J, Ardite E, Elizalde JJ, Arce Y, Elena M, Palacín A, Fernández-Checa JC, Anderson DC, Lobb R, Piqué JM. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 874–883
- 28 Rumi G, Tsubouchi R, Nishio H, Kato S, Mózsik G, Takeuchi K. Dual role of endogenous nitric oxide in development of dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 823–836
- 29 Arafat HM, Hemeida RA, El-Bahrawy AI, Hamada FM. Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1311–1317
- 30 Mäkelä SM, Strengell M, Pietilä TE, Osterlund P, Julkunen I. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 664–672
- 31 Domènech E. Inflammatory bowel disease, current therapeutic options. *Digestion* 2006; 73: 67–76
- 32 Jiang R, Wang H, Deng L, Hou J, Shi R, Yao M, Gao Y, Yao A, Wang X, Yu L, Sun B. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer* 2013; 13: 59
- 33 Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, Xia B, Kuipers EJ, van der Woude CJ. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signaling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut* 2010; 59: 227–235
- 34 Lee MJ, Lee JK, Choi JW, Lee CS, Sim JH, Cho CH, Lee KH, Cho IH, Chung MH, Kim HR, Ye SK. Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis. *PLoS One* 2012; 7: e38801
- 35 Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Kobasashi M, Tamesada M, Yagi K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 1215–1219
- 36 Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van Dijk H, Labadie RP. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 251–258
- 37 Wong AP, Clark AL, Garnett EA, Acree M, Cohen SA, Ferry GD, Heyman MB. Use of complementary medicine in pediatric patients with inflammatory bowel disease: results from a multicenter survey. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48: 55–60
- 38 Suskind DL, Wahbeh G, Burpee T, Cohen M, Christie D, Weber W. Tolerability of curcumin in pediatric inflammatory bowel disease: a forced-dose titration study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56: 277–279
- 39 Peters EA, Hiltermann JT, Stolk J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1442–1447
- 40 Sugimoto K, Hanai H, Tozawa K, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Koide Y. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 1912–1922
- 41 Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O, Yagi Y, Bamba S, Araki Y, Hata K, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Curcumin prevents the development of dextran sulfate Sodium (DSS)-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2993–2998
- 42 Billerey-Larmonier C, Uno JK, Larmonier N, Midura AJ, Timmermann B, Ghishan FK, Kiela PR. Protective effects of dietary curcumin in mouse model of chemically induced colitis are strain dependent. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 780–793
- 43 Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983; 132: 345–352
- 44 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254





# Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis



Marta Marín, Rosa María Giner, José-Luis Ríos, María Carmen Recio\*

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia Avda./Vicent Andrés Estellés sn, 46100 Burjassot-Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 17 April 2013

Received in revised form

15 July 2013

Accepted 10 September 2013

Available online 17 October 2013

### Keywords:

Ellagic acid

Dextran sulfate sodium

Acute ulcerative colitis

Chronic colitis

Balb/C

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** Pomegranate (*Punica granatum* L.; Lythraceae) has traditionally been used for the treatment of various inflammatory diseases, including ulcerative colitis (UC). Because its fruits and extracts are rich in ellagitannins, which release ellagic acid when hydrolyzed, consumption of pomegranate products is currently being widely promoted for their potential health effects, including the prevention of inflammatory diseases and cancer. To evaluate the anti-inflammatory effects of ellagic acid on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute and chronic experimental colitis in two different strains of mice and to elucidate its possible mechanisms of action.

**Materials and methods:** In the acute UC model, female Balb/C mice were treated with DSS (5%) for seven days while concomitantly receiving a dietary supplement of ellagic acid (2%). In the chronic UC model, female C57BL/6 mice received four week-long cycles of DSS (1% and 2%) interspersed with week-long recovery periods along with a diet supplemented with ellagic acid (0.5%).

**Results:** In acute model of UC, ellagic acid ameliorated disease severity slightly as observed both macroscopically and through the profile of inflammatory mediators (IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ). In the chronic UC model, ellagic acid significantly inhibited the progression of the disease, reducing intestinal inflammation and decreasing histological scores. Moreover, mediators such as COX-2 and iNOS were downregulated and the signaling pathways p38 MAPK, NF- $\kappa$ B, and STAT3 were blocked.

**Conclusions:** Our study reinforces the hypothetical use of ellagic acid as an anti-inflammatory complement to conventional UC treatment in chronic UC patients and could be considered in the dietary prevention of intestinal inflammation and related cancer development.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic, relapsing, inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that encompasses two pathologies, namely Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) (Mizoguchi and Mizoguchi, 2008). One of the most serious complications of UC is colorectal cancer, the appearance of which seems to be related with chronic inflammation of the intestinal mucosa (Lewis et al., 1999; Pohl et al., 2000). Among the various pro-inflammatory markers involved in the inflammatory pathways are nuclear factor (NF)- $\kappa$ B and signal transducer and activator of transcription (STAT)-3, which could thus be considered good targets for the disease prevention and therapy (Youn et al., 2009; Mantovani, 2010). This is especially important as the potential adverse events and clinical limitations of the medications currently used to treat IBD call for new therapeutic agents that effectively induce remission and alter the natural course of the disease with few or no side effects (Danese, 2012; Dignass

et al., 2010; Meier and Sturm, 2011). The pathogenesis of the intestinal inflammation in UC arises from the interplay of many factors, with the resulting array of possible triggers and complex immune responses offering many potential therapeutic targets. In an attempt to elucidate the mechanisms responsible for IBD, as well as for their prevention and treatment, a variety of experimental models has been developed, including the dextran sulfate sodium (DSS) model of induced colitis. This is an excellent preclinical model that exhibits many phenotypic features relevant to human UC. Recently, Sann et al. (2013) published a systematic study of the key drugs used in the treatment of IBD and their effects on different colitis parameters; these same authors have also validated the acute DSS-colitis model. In general, acute colitis is induced in mice by administering DSS in the drinking water at a concentration ranging from 1 to 5% for several days. In contrast, exposure to DSS for 1–4 cycles mimics the active and inactive disease, leading to ulceration of the colon mucosa and the establishment of chronic colitis (Clapper et al., 2007; Cooper et al., 1993).

A general increase in the use of complementary and alternative medicine (CAM), particularly herbal therapies, has prompted substantial interest among gastroenterologists and other physicians involved in the treatment of IBD patients (Talero et al., 2012). In fact,

\* Corresponding author. Tel.: +3496 3543 283; fax: +3496 3544 943.

E-mail address: [maria.c.recio@uv.es](mailto:maria.c.recio@uv.es) (M. Carmen Recio).

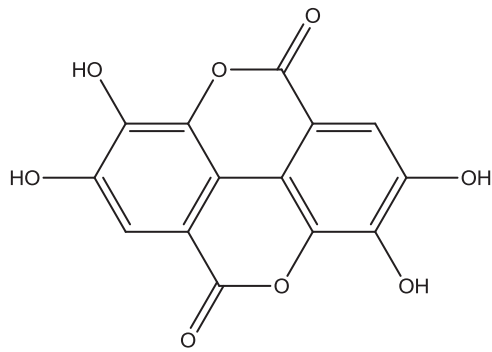


Fig. 1. Chemical structure of ellagic acid.

epidemiological studies have provided convincing evidence on the biological activities of natural dietary compounds that humans regularly consume as food (Miles et al., 2005). For example, a diet rich in polyphenols, which are found in fruits and vegetables, is strongly associated with a reduced risk for developing chronic diseases such as cancer and cardiovascular disease (Zamora-Ros et al., 2011). It stands to reason that one attractive approach for improving health could be the incorporation either of food rich in polyphenols or of supplements with natural products from medicinal plants into therapeutic regimens. One advantage to this approach is that these supplements are widely accepted by patients, in part due to their low toxicity profiles (Riso et al., 2013).

Since ancient times, pomegranate (*Punica granatum* L.) has been used for medicinal purposes. Both basic and clinical evidence show the benefits of particular classes of its bioactive substances, specifically those found in its juice and juice extracts (Longtin, 2003). Dietary supplements made from pomegranate extract have been tested in different animal and cellular models of IBD (Montrose et al., 2011; Rosillo et al., 2012; Singh et al., 2009). Ellagitannins are the bioactive polyphenols present in pomegranate; however, the ellagitannins found in this fruit are not absorbed intact into the blood stream, but are hydrolyzed to ellagic acid over several hours in the intestine (Gil et al., 2000). To date, all results indicate that ellagic acid (Fig. 1) is the principle most likely responsible for the activity of pomegranate-based supplements. As such, this acid has been the subject of numerous reports on the anti-oxidative (Park et al., 2011; Priyadarsini et al., 2002), anti-inflammatory (Beserra et al., 2011), antifibrotic (Devipriya et al., 2007; Kuo et al., 2011), antimutagenic (Berni et al., 2012; Makena and Chung, 2007), and anticarcinogenic (Bell and Hawthorne, 2008; Falsaperla et al., 2005; Glauert et al., 2010) activities, either in its free form as ellagic acid-glycosides or bound as ellagitannins. Rosillo et al. (2011) reported the protective effect of ellagic acid in a murine model of CD induced by intra-colon administration of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). Ellagic acid reduces the damage in this rat model of CD, probably through mitogen-activated protein kinases (MAPK) and NF- $\kappa$ B signaling pathways.

The aim of this study is to gain a better understanding of the effects of dietary supplementation with ellagic acid on both an acute and a chronic model of colitis induced by DSS in different mice strains in order to identify and validate new therapies for the treatment of IBD.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and diets

Female Balb/C and C57BL/6 mice (6–8 weeks old) with weights ranging from 18 to 20 g were provided by Harlan Interfauna Iberica (Barcelona, Spain). For 7 days before the experiments, the mice were acclimatized under a 12 h light/dark cycle at 22 °C and 60%

humidity and fed with a standard laboratory rodent diet and water ad libitum. Our experimental design is unique in that the mice were fed with standard feed supplemented with the product under study. Fresh diets were prepared daily according to Giner et al. (2011) by mixing powdered food with ellagic acid (purity  $\geq$  95%), which was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). When the mixture was completely homogeneous, water (0.65 mL/g of diet) and microwave-melted agar (0.2% final content in the diet) were added and mixed well. The food was dried for 24 h and divided into portions based on an estimated intake of 5 g of dry matter/mouse/day. The final content of ellagic acid in the diet was based on previous data on ellagic acid and its metabolites which had been administered orally in various in vivo inflammatory or carcinogenic experimental models (Chao et al., 2009, 2010; González-Sarráas et al., 2010; Päiväranta et al., 2006). All experiments followed a protocol approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Valencia (No 108 A1233134999884, 28-01-2009), in accordance with current Spanish legislation (RD1201/2005) and Helsinki declaration.

### 2.2. DSS-induced acute colitis

Acute colitis was induced by adding 5% DSS to the drinking water of Balb/C mice for 7 days (Fig. 2A). Animals were randomly assigned to three groups ( $n=7-10$  mice per group) distributed as follows: (a) water group: fed with standard feed and given free access to drinking water; (b) DSS group: fed with standard feed and given free access to drinking water containing 5% DSS; (c) DSS-ellagic acid group: fed with standard feed supplemented with ellagic acid (2% final content, w/w) and given free access to drinking water containing 5% DSS. Because of the severity of this DSS-induced acute colitis model, a higher number of mice were used in the DSS group in order to avoid problems of having dead mice at the end of the treatment. Since the amount of food was prepared based on an average intake of 5 g of feed per mouse daily, the amount of ellagic acid administered daily per mouse was 100 mg.

### 2.3. DSS-induced chronic colitis

C57BL/6 mice were divided into three dietary groups with 7–10 mice each. Chronic colitis was induced by repeated administration of two 7-day cycles of 1% DSS followed by two 7-day cycles of 2% DSS (in drinking water) (Fig. 2B). The DSS phases were interrupted by 1-week periods of free access to drinking water without DSS. The water group was allowed free access to drinking water

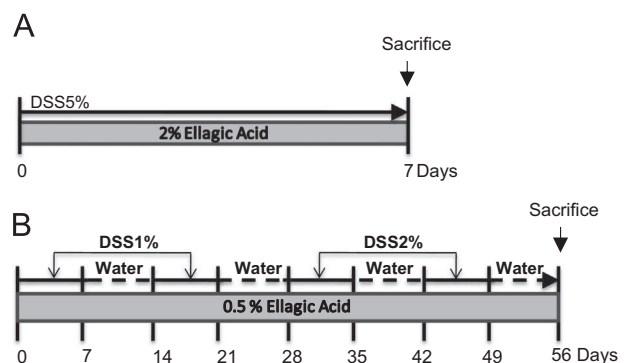


Fig. 2. Overview of experimental protocols in the experimental animal models of acute and chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC). (A) Acute UC was induced by the administration of drinking water supplemented by 5% DSS during 7 days ad libitum. (B) Chronic UC was induced by the repeated administration of 2 cycles of 1% DSS followed by 2 cycles of 2% DSS. Each cycle consisted of 7 days of DSS followed by 7 days of ordinary tap water.



without DSS throughout the entire experiment. For 56 days, all mice were fed with standard feed; in the case of the treatment group, this was supplemented with ellagic acid (0.5% final content, w/w). The dose ellagic acid assayed was 25 mg daily per mouse, which is equivalent to approximately 100 mg/kg/day in humans (7 g ellagic acid daily in a 70-kg person), according to the human equivalent dose formula (Reagan-Shaw et al., 2008).

#### 2.4. Assessment of colitis

Animal body weights, consumed water volume and food, and occurrence of diarrhea were recorded daily throughout all the experiments. Animals were sacrificed at the end of treatment by cervical dislocation. DSS intake did not differ between different groups of mice (data not shown). To assess the DSS-induced acute and chronic colitis, colon tissue from the ileocecal junction to the anal verge was removed from the dead animals, washed with phosphate-buffered saline (PBS) to remove fecal residues, blotted on filter paper, and each specimen was weighted, and its length was measured. Each colon was scored for macroscopically visible damage on a 0–4 scale, according to criteria reported previously by Cooper et al. (1993). The disease activity index (DAI) was determined according to the parameters outlined in Table 1. Colon samples used for histopathology and immunohistochemistry were opened longitudinally along the main axis, swiss-rolled from distal to proximal and fixed with 4% formaldehyde. Colon samples used for biochemical determinations or for RNA isolation were immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and subsequently grounded to a fine powder using a liquid-nitrogen-cooled mortar.

#### 2.5. Histopathology and immunohistochemical analysis

Large intestine specimens were fixed in freshly prepared 4% formaldehyde in PBS buffer (pH 7.2), embedded in paraffin, and sectioned at  $4\ \mu\text{m}$ . Colon sections were stained with hematoxylin and eosin for histopathological analysis; they were also stained immunohistochemically to determine the expression of phospho-STAT3 (pTyr<sup>705</sup>). Briefly, paraffin-embedded slides were deparaffinized and rehydrated, which was followed by antigen retrieval in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) for 20 min in the microwave. Sections were blocked with 10% normal goat serum and 0.1% Triton and incubated overnight with anti-phospho-STAT3 (pTyr<sup>705</sup>) immunoglobulin G (diluted to 1:100) in a humidified chamber. After the endogenous peroxidase activity was quenched with 3% hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), immunoreactivity was determined with the aid of HRP-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit, 1:200 dilution) for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . The chromogenic reaction was developed with 3,3'-diamine benzidine (DAB) solution, with a positive signal being defined as a brown color under a light microscope. Negative control sections were processed similarly with the omission of the primary antibodies. All images were taken at  $20\times$  magnification and amplified with an Eclipse E800 microscope and ACT-1 software (Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands).

**Table 1**  
Scoring system to calculate the disease activity index (DAI\*).

Score	Weight loss	Stool consistency	Visible blood in feces
0	None	Normal	None
1	1–5%		
2	6–10%	Loose	Slight bleeding
3	11–20%		
4	<20%	Diarrhea	Gross bleeding

\* The DAI value is calculated as the sum of scores of weight loss, stool consistency, and blood feces.

#### 2.6. Determination of myeloperoxidase (MPO) activity

In the model of acute colitis, neutrophil infiltration into the colon was assessed indirectly by measuring myeloperoxidase (MPO) activity following the method elaborated by Bradley et al. (1982). A portion of dry, powdered colon samples was weighed and homogenized (1.5%, w/v) in 80 mM potassium phosphate buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide (HTAB). The samples were sonicated and centrifuged at  $11000\times g$  for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The MPO activity of the supernatant was then assessed in 96-well plates by measuring the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dependent oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The enzyme activity was determined spectrophotometrically at 450 nm. Values are expressed as MPO units per mg of dry powder weight of tissue.

#### 2.7. Colon cytokine levels

TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , and IL-1 $\beta$  concentrations in the colon tissue of mice with acute colitis were measured with the aid of an ELISA kit used according to the manufacturer's instructions. Briefly, a scoop of dry powdered tissue was dissolved (20%, w/v) in ice-cold PBS buffer containing 0.1% Igepal CA-630, as described in a previous study (Rosengren et al., 2003) and a complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail was added. Tissues were sonicated for 10 s and shaken over ice for 45 min. The homogenates were then centrifuged and the supernatants were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Protein concentrations in the supernatants were determined with the aid of the Bradford colorimetric method (Bradford, 1976). The concentrations of cytokines were determined through duplication and were expressed as pg/mg protein.

#### 2.8. cDNA synthesis and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for colon inflammation-related cytokine gene expression

Total RNA from a portion of the powdered colon tissue of mice with chronic DSS-induced colitis was extracted with the aid of RNeasy mini spin (50) columns (Qiagen, Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA). The concentration of isolated RNA was calculated by measuring the optical density at 260 nm. The ratio of the optical density at 260 nm to that at 280 nm was always higher than 1.8. From each sample,  $0.5\ \mu\text{g}$  of purified RNA was used for RT-PCR for cDNA synthesis using M-MLV RT, 0.5 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), and a random hexamer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). To analyze the expression levels of genes, the oligonucleotide primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) designed from mouse for IL-6 were 5'-ATGCTGGTGACAACCACGGCC-3' (forward) and 5'-GCATAACGCACTAGTTTGCCGA-3' (reverse). The oligonucleotide primers for  $\beta$ -actin used as a house-keeping gene designed from mouse were, 5'-GCAGAGCAAGAGGCATCC-3' (forward), 5'-CTGTGGTGAAGCTGTAG-3' (reverse). PCR products were analyzed on 2% agarose gel and visualized with the aid of 0.1% ethidium bromide staining. Detectable fluorescent bands were visualized by means of an ultraviolet transilluminator. The results were expressed as the ratio of optical density to  $\beta$ -actin.

#### 2.9. Isolation of cytosolic and nuclear fractions from mouse colons

The cellular subfractionation of proteins was performed following the method described by Giner et al. (2011). After extraction, protein concentration in the supernatants was determined following Bradford colorimetric method (Bradford et al., 1976) with bovine serum albumin as the standard.



### 2.10. Analysis of COX-2, iNOS, NF- $\kappa$ B p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ , STAT3, p38 MAPK, and phospho-p38 MAPK by Western blot assays

Aliquots of supernatants containing equal amounts of protein (10  $\mu$ g) were boiled in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer for 5 min, separated by means of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and then electrophoretically transferred onto polyvinylidenedifluoride membranes at 350 mA for 120 min. After blocking the membranes, they were then incubated with specific primary polyclonal antibodies overnight at 4 °C (Millipore). Each filter was washed three times for 15 min and incubated with the corresponding secondary HRP-linked antibody (Sigma-Aldrich). To prove equal loading, the blots were analyzed for  $\beta$ -actin expression using an anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma-Aldrich). The immunoreactive bands were visualized through an enhanced chemiluminescence system (Millipore). Densitometric data were studied following normalization to the control.

### 2.11. Statistical analysis

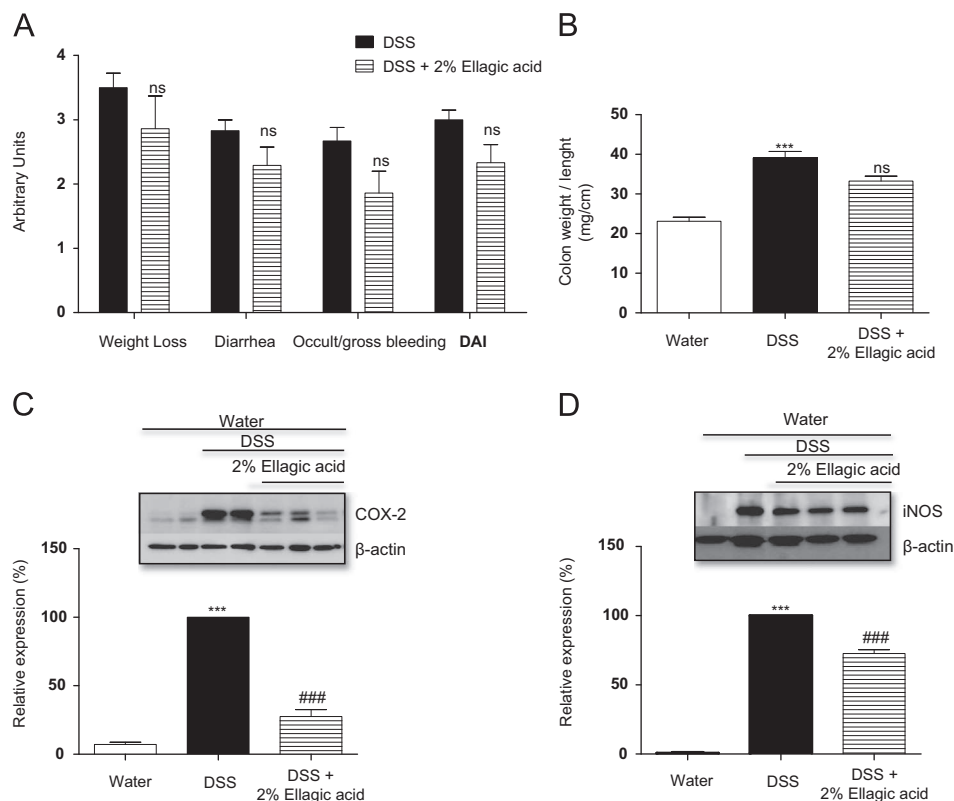
All values are expressed as arithmetic means  $\pm$  standard error (S.E.M.). Data were evaluated with Graph Pad Prism Version 5.01 Software (La Jolla, San Diego, CA, USA). Statistically significant differences between the groups were assessed by means of a one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's *t*-test. Images for all Western blot and RT-PCR experiments were acquired with the image analysis system LAS-3000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan). Digital images were processed and band density measurements were made with the aid of a Multi Gauge V3.0 software package (Fujifilm).

## 3. Results

### 3.1. Ellagic acid attenuated the severity of acute DSS-induced colitis in Balb/C mice

In the acute disease model, exposure of Balb/C mice to DSS in their drinking water induced marked IBD symptoms, including weight loss and the production of loose, bloody stools as indicated by the disease activity index (DAI) score (Fig. 3A). Concomitant treatment with 2% ellagic acid slightly reduced the intensity of these manifestations of IBD on the last day of treatment, although the effect was not statistically significant. On day 7, the inflammatory changes in the intestinal tract were associated with a significant increase in the weight/length ratio of the mouse colons ( $23.14 \pm 1.02$  mg/cm in the water group vs.  $39.10 \pm 1.64$  mg/cm in the DSS group,  $P < 0.001$ ). This morphological parameter, useful for assessing colon inflammation, showed no significant improvement with dietary intake of ellagic acid ( $33.28 \pm 1.24$  mg/cm vs. DSS) (Fig. 3B). It should be noted that this acute model produces IBD symptoms rapidly and dramatically, making it a highly stringent assay for drug testing.

MPO activity, measured as an indicator of colon infiltration, was highly elevated in animals receiving DSS without ellagic supplementation in comparison to water controls ( $P < 0.001$ ). As is shown in Table 2, the increase in MPO activity was not attenuated in mice receiving daily ellagic acid in the diet. Acute colitis injury induced by DSS administration was also characterized by an increase of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ , ( $P < 0.001$  for each). However, after administration of an



**Fig. 3.** Effect of 2% ellagic acid supplemented diet on DSS-induced acute colitis in female Balb/C mice. (A) Total DAI score; and, (B) Colon weight-to-length ratio resulting from DSS (5%) administration and ellagic acid treatment was scored upon termination of the experiment as indicated in Section 2. After 7 days of DSS, colons were harvested and protein lysates were prepared for immunoblotting analysis of (C) COX-2; and, (D) iNOS protein expression by Western blotting techniques using COX-2 and iNOS polyclonal antibodies.  $\beta$ -Actin was used as an internal control. The relative intensity was calculated using imaging software and considering the DSS group as having 100% expression. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments;  $n = 7-10$ . The statistical significance between values for each group was assessed by Dunnett's *t*-test. \*\*\* $P < 0.001$  vs. water group; ### $P < 0.001$ ,  $^{ns}P > 0.05$  vs. DSS group.

**Table 2**  
Myeloperoxidase activity and cytokine levels (pg/mg protein) in the colon of mice with acute DSS-induced colitis.

Group	MPO	TNF- $\alpha$	IL-6	IFN- $\gamma$	IL-1 $\beta$
Water	11.50 $\pm$ 1.84	10.71 $\pm$ 1.02	50.1 $\pm$ 2.27	21.89 $\pm$ 0.30	63.29 $\pm$ 2.60
DSS	25.75 $\pm$ 2.12***	42.95 $\pm$ 4.14***	108.92 $\pm$ 8.05***	55.78 $\pm$ 6.57**	151.82 $\pm$ 5.88***
DSS + 2% ellagic acid	23.80 $\pm$ 3.43	23.69 $\pm$ 1.94 <sup>b</sup>	59.04 $\pm$ 11.24 <sup>b</sup>	26.57 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	135.18 $\pm$ 7.77

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

\*\*\*  $P < 0.001$ , significantly different from the water group.

<sup>a</sup>  $P < 0.05$ , significantly different from the DSS group.

<sup>b</sup>  $P < 0.01$ , significantly different from the DSS group.

ellagic acid-enriched diet, the levels of IL-6, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  were significantly reduced by 35%, 86%, and 55%, respectively (Table 2).

As a final measure of the effects of dietary intake of ellagic acid in this acute model, levels of cytosolic COX-2 and iNOS expression were evaluated with the aid of Western blot analysis. Exposure of mice to 5% DSS led to a strong expression of COX-2 and iNOS ( $P < 0.001$  for both), indicating that the expression of these proteins may be induced in the acute stages of colon lesion caused by DSS. However, oral administration of ellagic acid was able to reduce significantly the upregulation of both COX-2 and iNOS expression by 78% (Fig. 3C) and 31% (Fig. 3D), respectively.

### 3.2. Protective effect of dietary supplementation of ellagic acid on an experimental model of chronic DSS-induced colitis

A 56-day model of IBD was used to evaluate the effectiveness of dietary supplementation with ellagic acid in mice subjected to multiple cycles of DSS-induced inflammation. This chronic model is similar to the acute model, except that DSS concentration in the drinking water was lower, with the animals receiving only periodic exposure to DSS. Throughout the experiment, the treatment group received 0.5% ellagic acid supplemented in the diet. The body weight of the mice was monitored every three days as was their intake of food and drink. The DAI was scored at the end of the experiment, but only took into account the presence of gross blood in the feces and stool consistence, since the mice showed no body weight loss in this model of disease. In fact, mouse body weight actually increased and was similar for all groups (data not shown). While exposure of mice to DSS in drinking water caused an increase in the DAI index, treatment with 0.5% ellagic acid supplemented in the diet significantly lowered this increase ( $P < 0.05$  on day 56) by 24% (Fig. 4A). Macroscopic inspection of the colon of DSS-treated mice showed evidence of bowel wall thickening, inflammation, and ulcers, as well as an increase in the colon weight/length ratio compared to mice receiving only water (49.98  $\pm$  1.79 mg/cm vs. 26.33  $\pm$  4.62 mg/cm,  $P < 0.001$ ). In contrast, daily ellagic acid treatment significantly improved colon architecture, lowering the weight/length ratio by 48% compared to that of untreated mice (41.38  $\pm$  1.89 mg/cm,  $P < 0.05$  vs. DSS) (Fig. 4B).

### 3.3. Ellagic acid inhibited COX-2 and iNOS expression in C57BL/6 mice with chronic DSS-induced colitis

COX-2 and iNOS expression in the colons of mice with chronic DSS-induced colitis were assayed in the same manner as described above for the acute model. The results were similar to those obtained in the acute model, with elevated COX-2 and iNOS expression in mice treated with DSS alone compared to water controls. Ellagic acid (0.5%) supplemented in the diet resulted in a significant reduction of the expression of these enzymes by 84% and 66% (Fig. 4C and D), respectively ( $P < 0.001$ ).

### 3.4. Ellagic acid suppressed histological changes in C57BL/6 mice with chronic DSS-induced colitis

Results from the histopathological scores for all groups of mice in the chronic model are shown in Fig. 5. Water-treated mice had morphologically normal colons with no inflammation or ulceration (Fig. 5A). After the fourth DSS cycle, a high degree of chronic inflammation, characterized by crypt abscess and inflammatory cell infiltration along with ulceration and *muscularis mucosa* affection, especially in distal sections, was evident in the colons of DSS-treated mice (Fig. 5B). Dietary supplementation with 0.5% ellagic acid elicited a profound reduction in the degree of mucosal ulceration. As shown in Fig. 5C, the colons of mice receiving ellagic acid exhibited only minimal areas of epithelial damage with less crypt loss.

### 3.5. Ellagic acid prevented p38 MAPK phosphorylation in colon mucosa of C57BL/6 mice with chronic DSS-induced colitis

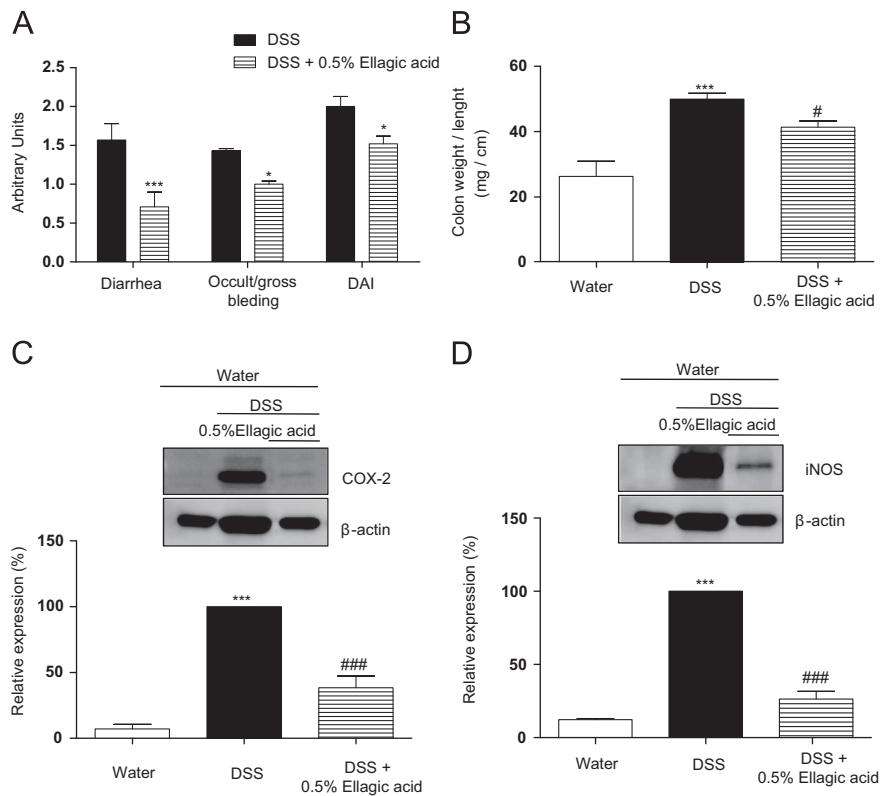
The expression and activation of p38 MAPK, determined by Western blot analysis, was examined using phosphospecific MAPK antibodies. Administration of DSS resulted in a significant increase in the phosphorylation of p38 protein ( $P < 0.05$ ), indicating that its activation may be induced in the chronic stage of colon lesion caused by DSS. However, dietary ellagic acid treatment was able to diminish p38 MAPK protein activation by 67% ( $P < 0.01$ ) (Fig. 6).

### 3.6. Ellagic acid inhibited NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional activation and I $\kappa$ B $\alpha$ degradation in colon mucosa of C57BL/6 mice with chronic DSS-induced colitis

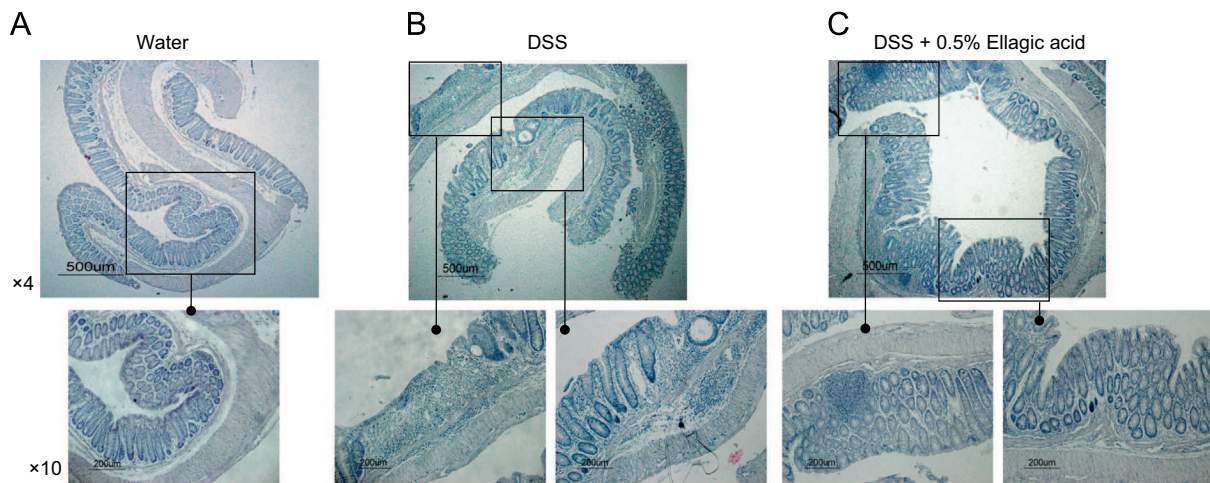
Transcriptional factor NF- $\kappa$ B is one of the most important mediators in the key proinflammatory signaling pathways involved in colitis (Arulampalam and Pettersson, 2002; Vitor et al., 2009). In order to evaluate whether ellagic acid also has an effect on NF- $\kappa$ B activation in our animal model of intestinal inflammation, we used Western blot analysis to investigate levels of I $\kappa$ B $\alpha$  protein and its phosphorylated form (phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ ) as well as the nuclear translocation of p65 protein. We found a statistically significant peak of I $\kappa$ B $\alpha$ -phosphorylation at the end of the DSS administration period ( $P < 0.01$ ) (Fig. 7A). Dietary supplementation with ellagic acid significantly inhibited the DSS-induced increase of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional activation, assessed through analysis of p65 nuclear translocation levels in colon mucosa ( $P < 0.001$ ) (Fig. 7B). These results indicate that ellagic acid is not only specific for p38 MAPK, but that it also targets other elements involved in NF- $\kappa$ B activation.

### 3.7. Ellagic acid affected the IL-6-STAT3 signaling cascade in colon mucosa of C57BL/6 mice with chronic DSS-induced colitis

Chronic inflammation is a driving force for the initiation and progression of tumors in many tissues. In fact, the IL-6-STAT3



**Fig. 4.** Effect of dietary supplementation of 0.5% ellagic acid on DSS-induced chronic colitis in female C57BL/6 mice. (A) Total disease activity index (DAI) score evaluated at the end of the treatment; (B) Colon weight-to-length ratio. Western blot representing the expression of (C) COX-2; and, (D) iNOS enzymes in the colon tissue of mice with DSS-induced chronic colitis. Graphs showing the ratio of the relative density of the bands for both enzymes.  $\beta$ -Actin was used as an internal control. The relative intensity was calculated using imaging software and considering the DSS group as having 100% expression. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments;  $n=7-10$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. water group. # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  vs. DSS group; significances between values for each group were determined using ANOVA and Dunnett's post hoc test.

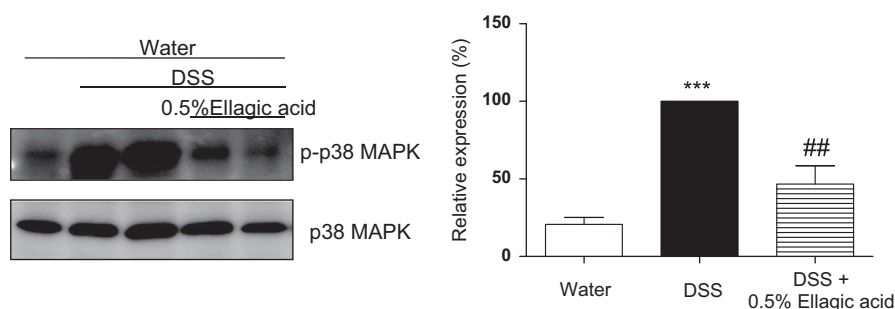


**Fig. 5.** Effects of ellagic acid on distal colorectal histology in mice with DSS-induced chronic colitis. Histological changes were determined by hematoxylin and eosin staining. The microscopic photographs are the representative case of groups. (A) Water group showing normal histology of mice colon; (B) Mucosal injury produced after DSS administration with distortion of crypts, erosions of the epithelial, loss of goblet cells as well as severe mononuclear cell infiltration in *lamina propria*; (C) DSS+ellagic acid samples showing a reduction in the morphological alteration associated to DSS treatment. Dietary ellagic acid (0.5%) treatment keeps colonic architecture and reduce epithelium loss. For this assay 3 mice per group were used.

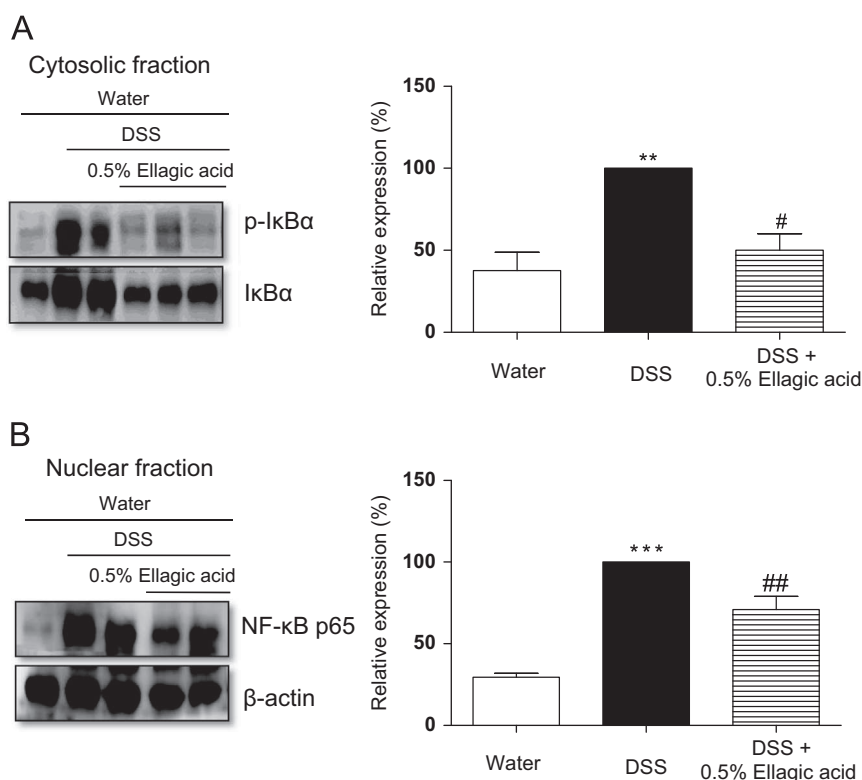
signaling cascade has been shown to be a key regulator of the proliferation and survival of tumor-initiating epithelial cells.

With this in mind, we determined the mRNA expression level of the inflammatory cytokine IL-6 in the colon homogenate tissue. Colon tissues treated with DSS alone showed elevated IL-6 mRNA expression over basal levels whereas dietary supplementation with ellagic acid considerably reduced colon mRNA expression of

IL-6 (Fig. 8A), the levels of which have been correlated with disease severity. We then set out to determine whether this effect could be mediated through the STAT3 pathway. Western blot analysis showed that ellagic acid exerted a significant inhibitory effect on DSS-induced phosphorylation of STAT3 at Tyr705 (Fig. 8B). Likewise, immunohistochemistry staining of phosphorylated STAT3 revealed that DSS-induced STAT3 phosphorylation



**Fig. 6.** Effect of ellagic acid (0.5%) supplemented diets on the activation of p38 MAPK using specific phospho-MAPK antibodies in the colon tissue after DSS-induced chronic ulcerative colitis for 56 days. Left showing western blot analysis of phospho-p38 and total p38 MAPK cytosolic expression. Graphs showing the ratio of the relative density of the bands for both enzymes. Data are expressed as the means  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. \*\*\* $P$  < 0.001 vs. water group; ## $P$  < 0.01 vs. DSS group.



**Fig. 7.** The effects of ellagic acid (0.5%) on DSS-induced changes in IκBα phosphorylation and NF-κB p65 translocation in C57BL/6 mice with chronic DSS-induced colitis. (A) Western blot of phospho-IκBα and total IκBα cytosolic expression; and, (B) Nuclear expression of NF-κB p65. Band intensities were quantified as described in Section 2. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments;  $n$  = 7–10. \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. water group. # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 vs. DSS group.

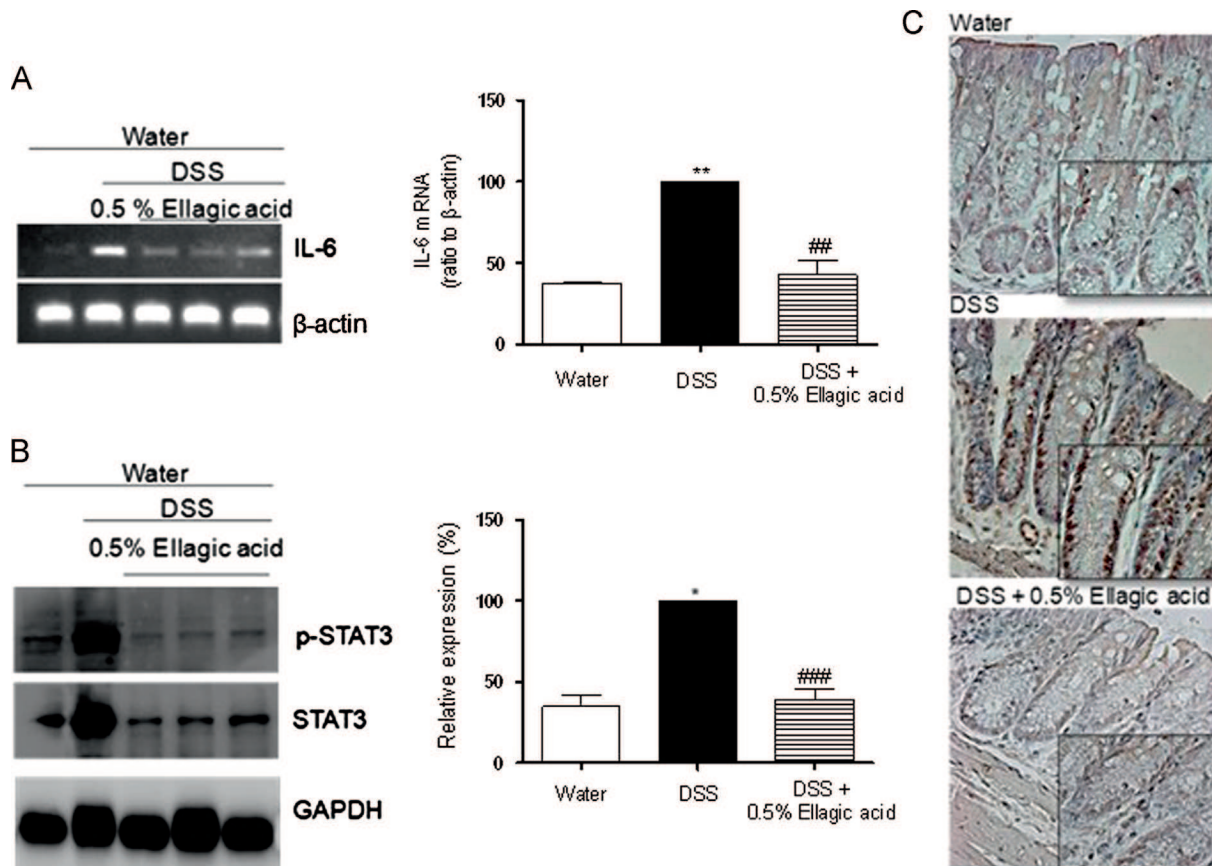
appears predominately in the nuclei of the colonocytes (Fig. 8C). Ellagic acid was able to abolish its expression as compared with the DSS-treated group.

#### 4. Discussion

In the present study, administration of DSS resulted in the development of colitis assessed macroscopically, histopathologically, and in terms of DAI. Treatment with ellagic acid incorporated into the normal diet (0.5%) of mice significantly protected against alterations to the colon induced by repeated administration of DSS. However, in the acute model of UC, ellagic acid led only to a very slight amelioration of several disease activity parameters. This modest effect of treatment with ellagic acid on the clinical signs of the disease included decreases in COX-2 and iNOS protein expression as well as a reduction in the levels of pro-inflammatory

cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  in the colon mucosa of Balb/C mice suffering from this acute inflammatory condition. In the chronic model, colitis was achieved by the cyclic administration of a lower dose of DSS, resulting in a milder inflammation than that of the acute model. In this model, the effects of dietary ellagic acid on the reduction of the extension of colitis were significant, accompanied by a significant decrease in the weight/length ratio of the colon after 56 days of treatment. Ellagic acid was effective at even lower doses when the DSS concentration was reduced and it was administered over a longer period. Two possible factors may be responsible for this difference. First, our findings suggest that the treatment period in the acute model of colitis was too short for the drug to be effective. Second, oral administration is not the best strategy for ellagic acid. Soh et al. (2009), for example, observed that the activity of orally administered ellagic acid (1 g/kg/day) in a 4-day malaria treatment was poor compared with a lower dose administered intraperitoneally.





**Fig. 8.** Effect of daily dietary supplementation of 0.5% ellagic acid on IL-6 expression, and STAT3 activation in the colon tissue of mice with DSS-induced chronic colitis. (A) Colonic IL-6 pro-inflammatory cytokine mRNA expression was analyzed by conventional reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays.  $\beta$ -Actin was used as an internal control. The relative intensity was calculated using imaging software and considering the DSS group as having 100% expression; (B) Western blot representing the cytosolic protein expression of phospho-STAT3 (pTyr705) and total STAT3. Right graphs showing the ratio of the relative density of the bands for both enzymes; (C) Phospho-STAT3 (pTyr705) in colon sections on day 56 from mice treated with cyclic DSS was determined by immunohistochemistry. Representative images of four mice per group. Original magnification  $\times 20$ . Positive staining is more intensive brown colored. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.;  $n=7-10$ . The statistical significance between values for each group was assessed by Dunnett's *t*-test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. water group, \*\*\* $P < 0.01$  vs. DSS group.

In contrast, Singh et al. (2009) reported a protective effect for the hydroalcohol extract of the flowers of pomegranate and its ellagic acid-rich fraction (100 and 200 mg/kg, p.o.) in DSS-induced colitis in mice, while Ogawa et al. (2002) demonstrated that oral administration of microspheres of ellagic acid protects against DSS-induced UC in rats. Lei et al. (2003) studied the pharmacokinetics of ellagic acid in rats after oral administration of pomegranate extract. These results indicated that ellagic acid has poor absorption and undergoes rapid elimination after oral administration.

Ellagic acid is a weak acid, which is ionized at physiological pH and is poorly water soluble (water solubility of ellagic acid  $\approx 9.7 \mu\text{g/mL}$ ) (Bala et al., 2006). It should be noted that non-water soluble compounds are often difficult to process into dosage forms that afford adequate oral bioavailability for clinical studies and commercialization. In our study, 5 g/kg/day was not sufficient for preventing acute inflammation, but when ellagic acid was administered daily throughout the 56 days of disease progression in the model of chronic colitis, it was more effective. To this fact should be added the dramatically high dose of DSS used in the study as well as variations in the susceptibilities of the different mouse strains used in both models; in a severe inflammation model, the beneficial effects would be more difficult to observe, with the genetic backgrounds of the different strains of mice leading to significant susceptibility variations between them (Mähler et al., 1998). In fact, the different results obtained in Balb/C and C57BL/6 mice in response to DSS administration have been previously reported (Melgar et al., 2005), with the

establishment of a suitable mouse strain for each inflammation model studied.

We have demonstrated that daily treatment with dietary ellagic acid significantly reduces COX-2 and iNOS expression in colon tissue in a chronic model of DSS-induced colitis. These data are consistent with those of other studies conducted by Rosillo et al. (2011), in which ellagic acid administration reduced the expression of both COX-2 and iNOS in a model of CD induced by administration of TNBS in rats.

MAPK transmits extracellular inflammatory signals to intracellular responses. These are components of the signaling cascades in which various extracellular stimuli converge to initiate inflammation. In particular, p38 MAPK mediates phosphorylation of transcription factors, thereby regulating gene expression and the induction of cytokine production to participate in intestinal inflammation, cytokine production, and T cell activation in IBD. The activity of p38 MAPK has been shown to be higher than normal in patients suffering from IBD (Feng and Li, 2011). Indeed, Hollenbach et al. (2004) found that the p38 MAPK inhibitor SB203580 ameliorated histological alterations and improved the clinical score of mice in a DSS-induced experimental model of colitis. Blockade of p38 phosphorylation with SB203580 also decreased the expression of adhesion molecules and secretion of chemokines. Despite the obvious side effects of p38 MAPK inhibitors, which limit their application, it is clear that p38 MAPK is activated in patients with UC and that its inhibition can effectively suppress the production of pro-inflammatory cytokines

and extenuated intestinal inflammation. We observed dramatic activation of p38 MAPK during the development of chronic colitis. As expected, treatment with ellagic acid resulted in a strong inhibition of phospho-p38 MAPK expression, in agreement with a study conducted by Rosillo et al. (2012), who reported a reduction in the activation of p38 by ellagic acid in an experimental murine model of CD. In more recent research, after carrying out a genome gene expression meta-analysis of the colon mucosa of IBD patients, Van Beelen Granlund et al. (2013) demonstrated that there is a similarity between the gene expressions in the inflamed mucosa of UC and CD patients. This suggests that once established, the inflammatory mechanisms at the mucosal level are largely the same for both diseases.

A key regulator of inflammation is NF- $\kappa$ B, a transcription factor that is normally sequestered in the cytoplasm (Campbell and Perkins, 2006). When activated, NF- $\kappa$ B translocates into the nucleus where it regulates the expression of a multitude of genes related to pro-inflammatory mediators such as cytokines, chemokines, and adhesion molecules, which in turn mediate the recruitment and activation of immune cells (Karrasch and Jobin, 2008). NF- $\kappa$ B plays a critical role in the pathophysiology of IBD. It is markedly activated in the inflamed gut, especially in macrophages and epithelial cells, to the point that the degree of NF- $\kappa$ B activation correlates with the severity of intestinal inflammation (Rogler et al., 1998). Given its strategic position in the inflammatory process of IBD, NF- $\kappa$ B is considered an excellent target for the development of pharmacological agents for IBD (Atreya et al., 2008). In the DSS-induced model of chronic colitis, we found detectable quantities of translocated NF- $\kappa$ B p65 in the nuclear extracts whereas the translocation of the p65 subunit into the nucleus was inhibited by ellagic acid. This can be attributed to its ability to prevent I $\kappa$ B $\alpha$  degradation.

One of the main cytokines involved in the chronic phase of colitis is IL-6, which is produced mainly by lamina propria CD11b+ macrophages and CD4+ T cells. Functionally, IL-6 has been identified as a major regulator of disease activity because it directly stimulates the survival and proliferation of intestinal epithelial cells in the inflammation setting, thereby promoting tumor formation (Becker et al., 2004). In a study conducted by Sánchez de Medina et al. (2010), the authors hypothesized, that downregulation of the gene expression of this cytokine could be a potential therapeutic strategy to contribute to the resolution of colitis. Previously, an experiment blocking the IL-6 receptor demonstrated that IL-6 plays an important role in the development of colitis by activating the STAT3 signaling pathway (Atreya et al., 2006). This IL-6-dependent transcription factor is believed to be involved in the progression rather than in the initiation of the disease and it has been shown to mediate apoptosis resistance in chronic intestinal inflammation (Atreya, 2000). Thus, a growing body of evidence indicates that strategies targeting the IL-6/STAT3 cytokine signaling pathway have the greatest potential for effectively treating IBD. Our data confirm the results of other studies in which ellagic acid treatment inhibited the production of IL-6 (Umesalma and Sudhandiran, 2010). Furthermore, our results provide evidence that this inhibition takes place at the transcription level. As expected, the expression of phosphorylated colon STAT3 was also drastically reduced in ellagic acid-treated mice exposed to DSS.

Numerous agents isolated from natural sources have shown anti-inflammatory activity by blocking NF- $\kappa$ B (Nam, 2006). Some of them, such as curcumin (Zhou et al., 2011) or shikonin (Andújar et al., 2012), also suppress the STAT3 pathway, which suggests that they have multiple targets. Ellagic acid, which targets both NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways, has been shown to be quite safe and should thus be considered a good candidate as an anti-inflammatory complement to conventional UC treatment. Indeed, it may serve as

a starting point for the development of drugs not just for prevention, but also for treatment of human IBD (Holt et al., 2005).

In conclusion, our results support the hypothesis that even at the very low concentrations achieved in the gut through oral administration, ellagic acid is able to exert anti-inflammatory effects on the intestine and contribute to the prevention of the development of chronic UC.

## Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Government (SAF2009-13059-C03-01).

## References

- Andújar, I., Ríos, J.L., Giner, R.M., Cerdá, J.M., Recio, M.C., 2012. Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in Balb/C mice. Evidence-Based Complement. Altern. Med., 15, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/271606>. (Article ID 271606).
- Arulampalam, V., Pettersson, S., 2002. Uncoupling the p38 MAPK kinase in IBD: a double edged sword? Gut 50, 446–447.
- Atreya, R., Atreya, I., Neurath, M.F., 2006. Novel signal transduction pathways: analysis of STAT-3 and Rac-1 signaling in inflammatory bowel disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1072, 98–113.
- Atreya, I., Atreya, R., Neurath, M.F., 2008. NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease. J. Intern. Med. 263, 591–596.
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, H.A., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J.F., Lehr, H.A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P.R., Rose-John, S., Neurath, M.F., 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. Nat. Med. 6, 583–588.
- Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Kumar, M.N., 2006. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 206–210.
- Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P.R., Blessing, M., Rose-John, S., Neurath, M.F., 2004. TGF- $\beta$  suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. Immunity 21, 491–501.
- Bell, C., Hawthorne, S., 2008. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer—a mini review. J. Pharm. Pharmacol. 60, 139–144.
- Berni, A., Grossi, M.R., Pepe, G., Filippi, S., Muthukumar, S., Papeschi, C., Natarajan, A.T., Palitti, F., 2012. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in vitro assays and in vivo. Mutat. Res. 746, 60–65.
- Beserra, A.M., Calegari, P.I., Souza Mdo, C., Dos Santos, R.A., Lima, J.C., Silva, R.M., Balogun, S.O., Martins, D.T., 2011. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. J. Agric. Food Chem. 59, 6957–6965.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J. Invest. Dermatol. 78, 206–209.
- Campbell, K.J., Perkins, N.D., 2006. Regulation of NF- $\kappa$ B function. Biochem. Soc. Symp., 165–180.
- Chao, P.C., Hsu, C.C., Yin, M.C., 2009. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. Nutr. Metab. 6, 33.
- Chao, C.Y., Mong, M.C., Chan, K.C., Yin, M.C., 2010. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. Mol. Nutr. Food Res. 54, 388–395.
- Clapper, M.L., Cooper, H.S., Chang, W.C., 2007. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. Acta Pharmacol. Sin. 28, 1450–1459.
- Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., Sedergran, D.J., 1993. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab. Invest. 69, 238–249.
- Danese, S., 2012. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. Gut 61, 918–932.
- Devipriya, N., Sudheer, A.R., Srinivasan, M., Menon, V.P., 2007. Effect of ellagic acid, a plant polyphenol, on fibrotic markers (MMPs and TIMPs) during alcohol-induced hepatotoxicity. Toxicol. Mech. Methods 17, 349–356.
- Dignass, A., Van Assche, G., Lindsay, J.O., Lémann, M., Söderholm, J., Colombel, J.F., Danese, S., D'Hoore, A., Gassull, M., Gomollón, F., Hommes, D.W., Michetti, P., O'Morain, C., Oresland, T., Windsor, A., Stange, E.F., Travis, S.P., 2010. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO), 2010. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. J. Crohn's Colitis 4, 28–62.

- Falsaperla, M., Morgia, G., Tartarone, A., Ardito, R., Romano, G., 2005. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. *Eur. Urol.* 47, 449–454. (discussion 454–455).
- Feng, Y.J., Li, Y.Y., 2011. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J. Dig. Dis.* 12, 327–332.
- Gil, M.I., Tomàs-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agricult. Food Chem.* 48, 4581–4589.
- Giner, E., Andújar, I., Recio, M.C., Ríos, J.L., Cerdá-Nicolás, J.M., Giner, R.M., 2011. Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *J. Agricult. Food Chem.* 59, 12882–12892.
- Glauert, H.P., Calfee-Mason, K., Stemm, D.N., Tharappel, J.C., Spear, B.T., 2010. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: a review. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 875–896.
- González-Sarráas, A., Giménez-Bastida, J.A., García-Conesa, M.T., Gómez-Sánchez, M.B., García-Talavera, N.V., Gil-Izquierdo, A., Sánchez-Alvarez, C., Fontana-Compiano, L.O., Morga-Egea, J.P., Pastor-Quirante, F.A., Martínez-Díaz, F., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2010. 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.* 54, 311–322.
- Hollenbach, E., Neumann, M., Vieth, M., Roessner, A., Malfrather, P., Naumann, M., 2004. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF- $\kappa$ B-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J.* 18, 1550–1552.
- Holt, P.R., Katz, S., Kirshoff, R., 2005. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. *Dig. Dis. Sci.* 50, 2191–2193.
- Karrasch, T., Jobin, C., 2008. NF- $\kappa$ B and the intestine: friend or foe? *Inflammatory Bowel Dis.* 14, 114–124.
- Kuo, M.Y., Ou, H.C., Lee, W.J., Kuo, W.W., Hwang, L.L., Song, T.Y., Huang, C.Y., Chiu, T. H., Tsai, K.L., Tsai, C.S., Sheu, W.H., 2011. Ellagic acid inhibits oxidized low-density lipoprotein (OxLDL)-induced metalloproteinase (MMP) expression by modulating the protein kinase C- $\alpha$ /extracellular signal-regulated kinase/peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ /nuclear factor- $\kappa$ B (PKC- $\alpha$ /ERK/PPAR- $\gamma$ /NF- $\kappa$ B) signaling pathway in endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5100–5108.
- Lei, F., Xing, D.M., Xiang, L., Zhao, Y.N., Wang, W., Zhang, L.J., Du, L.D., 2003. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *J. Chromatogr. B* 796, 189–194.
- Lewis, J.D., Deren, J.J., Lichtenstein, G.R., 1999. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 28, 459–477. (x).
- Longtin, R., 2003. The pomegranate: Nature's power fruit? *J. Nat. Cancer Inst.* 95, 346–348.
- Mähler, M., Bristol, I.J., Leiter, E.H., Workman, A.E., Birkenmeier, E.H., Elson, C.O., Sundberg, J.P., 1998. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am. J. Physiol.* 274, G544–G551.
- Makela, P.S., Chung, K.T., 2007. Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzdine-induced mutagenicity. *Food. Chem. Toxicol.* 45, 1899–1909.
- Mantovani, A., 2010. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr. Mol. Med.* 10, 369–373.
- Meier, J., Sturm, A., 2011. Current treatment of ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 17, 3204–3212.
- Melgar, S., Karlsson, A., Michaelsson, E., 2005. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G1328–G1338.
- Miles, E.A., Zoubouli, P., Calder, P.C., 2005. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 21, 389–394.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., 2008. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J. Gastroenterol.* 43, 1–17.
- Montrose, D.C., Horelik, N.A., Madigan, J.P., Stoner, G.D., Wang, L.S., Bruno, R.S., Park, H.J., Giardina, C., Rosenberg, D.W., 2011. Anti-inflammatory effects of freeze-dried black raspberry powder in ulcerative colitis. *Carcinogenesis* 32, 343–350.
- Nam, N.H., 2006. Naturally occurring NF- $\kappa$ B inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.* 6, 945–951.
- Ogawa, Y., Kanatsu, K., Iino, T., Kato, S., Jeong, Y.I., Shibata, N., Takada, K., Takeuchi, K., 2002. Protection against dextran sulfate sodium-induced colitis by microspheres of ellagic acid in rats. *Life Sci.* 71, 827–839.
- Päivärinta, E., Pajari, A.M., Törrönen, R., Mutanen, M., 2006. Ellagic acid and natural sources of ellagitannins as possible chemopreventive agents against intestinal tumorigenesis in the Min mouse. *Nutr. Cancer* 54, 79–83.
- Park, S.H., Kim, J.L., Lee, E.S., Han, S.Y., Gong, J.H., Kang, M.K., Kang, Y.H., 2011. Dietary ellagic acid attenuates oxidized LDL uptake and stimulates cholesterol efflux in murine macrophages. *J. Nutr.* 141, 1931–1937.
- Pohl, C., Hombach, A., Kruis, W., 2000. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology* 47, 57–70.
- Priyadarsini, K.I., Khopde, S.M., Kumar, S.S., Mohan, H., 2002. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J. Agricult. Food Chem.* 50, 2200–2206.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22, 659–661.
- Riso, P., Klimis-Zacas, D., Del Bo, C., Martini, D., Campolo, J., Vendrame, S., Möller, P., Loft, S., De Maria, R., Porrini, M., 2013. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *Eur. J. Nutr.* 52, 949–961.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P.A., Schölmerich, J., Gross, V., 1998. Nuclear factor  $\kappa$ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115, 357–369.
- Rosengren, S., Firestein, G.S., Boyle, D.L., 2003. Measurement of inflammatory biomarkers in synovial tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 1002–1010.
- Rosillo, M.A., Sánchez-Hidalgo, M., Cardeno, A., Alarcón de la Lastra, C., 2011. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochem. Pharmacol.* 82, 737–745.
- Rosillo, M.A., Sanchez-Hidalgo, M., Cardeno, A., Aparicio-Soto, M., Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., de la Lastra, C.A., 2012. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colon inflammation in rats. *Pharmacol. Res.* 66, 235–242.
- Sánchez de Medina, F., Daddaoua, A., Requena, P., Capitán-Cañadas, F., Zarzuelo, A., Suárez, M.D., Martínez-Augustín, O., 2010. New insights into the immunological effects of food bioactive peptides in animal models of intestinal inflammation. *Proc. Nutr. Soc.* 69, 454–462.
- Sann, H., von Erichsen, J., Hessmann, M., Pahl, A., Hoffmeyer, A., 2013. Efficacy of drugs used in the treatment of IBD and combinations thereof in acute DSS-induced colitis in mice. *Life Sci.* 92, 708–718.
- Singh, K., Jaggi, A.S., Singh, N., 2009. Exploring the ameliorative potential of *Punica granatum* in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Phytother. Res.* 23, 1565–1574.
- Soh, P.N., Witkowski, B., Olagnier, D., Nicolau, M.L., García-Alvarez, M.C., Berry, A., Benoit-Vical, F., 2009. In vitro and in vivo properties of ellagic acid in malaria treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1100–1106.
- Talero, E., Ávila-Roman, J., Motilva, V., 2012. Chemoprevention with phytonutrients and microalgae products in chronic inflammation and colon cancer. *Curr. Pharm. Des.* 18, 3939–3965.
- Umesalma, S., Sudhandiran, G., 2010. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- $\kappa$ B, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107, 650–655.
- Van Beelen Granlund, A., Ostvik, A.E., Brenna, O., Torp, S.H., Gustafsson, B.I., Sandvik, A.K., 2013. REG gene expression in inflamed and healthy colon mucosa explored by in situ hybridisation. *Cell Tissue Res.* , <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-013-1592-z>.
- Vitor, C.E., Figueiredo, C.P., Hara, D.B., Bento, A.F., Mazzuco, T.L., Calixto, J.B., 2009. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin, in a mouse model of colitis. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1034–1044.
- Youn, J., Lee, J.S., Na, H.K., Kundu, J.K., Surh, Y.J., 2009. Resveratrol and piceatannol inhibit iNOS expression and NF- $\kappa$ B activation in dextran sulfate sodium-induced mouse colitis. *Nutr. Cancer* 61, 847–854.
- Zamora-Ros, R., Knaze, V., Luján-Barroso, L., Slimani, N., Romieu, I., Fedirko, V., de Magistris, M.S., et al., 2011. Estimated dietary intakes of flavonols, flavanones and flavones in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) 24 h dietary recall cohort. *Br. J. Nutr.* 106, 1915–1925.
- Zhou, H., Beevers, C.S., Huang, S., 2011. The targets of curcumin. *Curr. Drug Targets* 12, 332–347.