



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

Tesis Doctoral:

**“EFECTO PROTECTOR DE OLEUROPEINA EN INFLAMACIÓN
INTESTINAL”**

Elisa Giner Ventura

Valencia, 2015

Directoras de la Tesis Doctoral:

Prof^a. Dra. Rosa Maria Giner Pons

Prof^a. Dra. M^a Carmen Recio Iglesias



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

Rosa Maria Giner Pons y M^a Carmen Recio Iglesias, Profesoras del Departament de Farmacologia de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado per la Licenciada D^a **Elisa Giner Ventura**, titulado “**Efecto protector de oleuropeina en inflamación intestinal**” ha sido realizado en la Unidad Docente de “Farmacognòsia i Farmacodinàmia del Departament de Farmacologia de la Universitat de València”, bajo la nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizan la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

En Burjassot, a 30 de Noviembre de 2015

Rosa M^a Giner Pons

M^a Carmen Recio Iglesias

La presente tesis doctoral ha sido financiada por el proyecto SAF-2009-13059-C03-01 concedido por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación (MICINN) junto al fondo Europeo de Desarrollo Regional y la ayuda concedida por la Universitat de València (UV-INV-AE14-265774).

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias al contrato predoctoral VLC-Campus d'Atracció al talent, concedida por la Universitat de València

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

ARTÍCULOS

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.

Giner E, Recio MC, Ríos JL, Giner RM. Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. *J Nat Prod.* 2013; 76:1113-1120.

Giner E, Recio MC, Ríos JL, Cerdá-Nicolás JM, Giner RM. Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in C57BL/6 mice. *Mol Nutr Food Res.* 2015. doi: 10.1002/mnfr.201500605. [Epub ahead of print].

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Giner-Ventura E; Marín M; Recio MC; Ríos JL; Giner-Pons RM Anti-inflammatory effects of the secoiridoid oleuropein in a murine model of colitis: XXXII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología, León, España. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010; 66:S1-S135. **COMUNICACIÓN ORAL**

Giner-Ventura E; Recio MC; Ríos JL; Giner-Pons RM. Suppressive effects on pro-inflammatory mediators by Oleuropein and hydroxytyrosol in BALB/c peritoneal macrophages. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología, Málaga, España. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011; 66:S1-S135. **COMUNICACIÓN ORAL**

E Giner-Ventura; MC Recio; JL Ríos; RM Giner-Pons The Effect of Oleuropein on chronic intestinal inflammation in C57BL/6 mice. 6th European Congress of Pharmacology Granada, España. *British Journal of Pharmacology.* 2012; P136. **POSTER**

Giner-Pons RM, Giner-Ventura E, Ríos JL, Recio MC. Oleuropeina reduce la aparición de cáncer colorectal asociado a colitis en ratones C57BL/6. XXXIV congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Murcia, España. **POSTER**

Rios JL; Giner E; Recio MC; Giner RM. Oleuropein Inhibits Key Pathways involved in Colon Cancer and Supresses Associated Colitis-ColoRectal Cancer in C57BL/6 mice. International Congress and Anual meeting of the Society for Medical Plants and Natural Products research. Guimaraes, Portugal, 2014. **POSTER**

Rios JL; Giner E; Recio MC; Giner RM. Oleuropein inhibited Th17 response and reduced intestinal IL-17 and IFN- γ reléase in dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis. International Congress and Anual meeting of the Society for Medical Plants and Natural Products research. Budapest, Hungría, 2015. **POSTER**

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
II.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	9
II.1.1. Concepto y generalidades.....	9
II.1.2. Factores implicados en la EII.....	11
II.1.2.1. Factores genéticos	11
II.1.2.2. Factores ambientales y cambios en la microbiota intestinal.....	12
II.1.2.3. Barrera epitelial intestinal.....	13
II.1.2.4. Factores inmunológicos	14
II.1.3. Farmacoterapia de la EII	15
II.1.3.1. Aminosalicilatos.....	16
II.1.3.2. Glucocorticoides	17
II.1.3.3. Tiopurinas	18
II.1.3.4. Antagonistas del ácido fólico	20
II.1.3.5. Inhibidores de calcineurina	21
II.1.3.6. Anticuerpos anti-TNF- α	22
II.1.3.7. Antagonistas de integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$	24
II.1.3.8. Otros nuevos tratamientos	25
II.2. CCR ASOCIADO A CU	26
II.2.1. Factores de riesgo.....	26
II.2.2. Tratamiento.....	27
II.2.2.1. Quimioprevención	28
II.3. TERAPIAS ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO DE LA EII Y CCR .	30
II.3.1. Productos de origen natural	30
II.3.1.1. Curcumina	31

II.3.1.2. Resveratrol	33
II.3.1.3. Polifenoles del té verde	35
II.3.1.4. Otros productos y extractos de plantas	37
II.4. OLEUROPEINA	40
II.4.1. Generalidades.....	40
II.4.2. Absorción y metabolismo	41
II.4.3. Propiedades farmacológicas	41
II.4.3.1. Actividad antioxidante	41
II.4.3.2. Actividad antiinflamatoria	43
II.4.3.3. Actividad antitumoral	45
II.4.3.4. Efecto cardioprotector.....	48
II.4.3.5. Efectos neuroprotectores	51
II.4.3.6. Actividad hepatoprotectora.....	53
II.4.3.7. Actividad hipoglucemiante	54
II.4.3.8. Otras propiedades farmacológicas.....	55
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
III.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OLEUROPEINA A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO.....	59
III.2. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS IN VIVO	60
III.2.1. Animales de experimentación	60
III.2.2. Dieta estándar suplementada con oleuropeina al 1%.....	61
III.2.3. Protocolos experimentales	62
III.2.3.1. Inflamación intestinal aguda inducida por DSS al 5% 62	
III.2.3.2. Inflamación intestinal aguda inducida por DSS al 3% 65	
III.2.3.3. Inflamación intestinal crónica inducida por DSS	70
III.2.3.4. CCR asociado a CU inducido por AOM y DSS.....	71
III.2.4. Índice de actividad de la enfermedad (IAE).....	73

III.2.5. Análisis histológico e inmunohistoquímico	75
III.2.5.1. Tinción hematoxilina-eosina	75
III.2.5.2. Inmunohistoquímica de Ki-67	76
III.2.6. Determinaciones bioquímicas y moleculares.....	77
III.2.6.1. Determinación de la infiltración celular en colon: infiltración neutrofílica, eosinofílica y de macrófagos.....	77
III.2.6.2. Determinación de citocinas mediante inmunoensayo	82
III.2.6.3. Extracción proteica citosólica y nuclear	84
III.2.6.4. Cuantificación de proteínas	85
III.2.6.5. Determinación de la expresión proteica mediante western blot.....	86
III.2.6.6. Estudio de la expresión génica: extracción de ARN y RT-PCR semicuantitativa	88
III.3. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS IN VITRO.....	92
III.3.1. Tipos celulares utilizados	92
III.3.1.1. Obtención de macrófagos peritoneales de ratón Balb/C.....	92
III.3.1.2. Línea celular IEC-18.....	96
III.3.2. Procedimientos experimentales	97
III.3.2.1. Macrófagos peritoneales de ratón Balb/C	97
III.3.2.2. Línea celular IEC-18.....	105
III.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	110
IV.RESULTADOS	111
IV.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE OLEUROPEINA	113
IV.2. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA IN VIVO	114
IV.2.1. Efecto sobre la CU inducida por DSS al 5% en ratones Balb/C.....	114

IV.2.1.1. Estudio macroscópico.....	114
IV.2.1.2. Determinación de nitritos y TNF- α en cultivo Intestinal ex vivo	118
IV.2.1.3. Análisis histológico	119
IV.2.1.4. Infiltración neutrofílica	120
IV.2.1.5. Liberación de citocinas	121
IV.2.1.6. Expresión de COX-2, iNOS y MMP-9	123
IV.2.1.7. Efecto sobre las vías NF- κ B, p38 MAPK y STAT3	124
IV.2.1.8. Expresión génica de anexina A1.....	126
IV.2.2. Efecto sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3% en ratones C57BL/6	127
IV.2.2.1. Estudio macroscópico.....	127
IV.2.2.2. Modulación de la respuesta Th17.....	129
IV.2.2.3. Liberación de IL-17A y IFN- γ	131
IV.2.3. Efecto sobre la colitis crónica inducida por DSS en ratones C57BL/6	133
IV.2.3.1. Estudio macroscópico.....	133
IV.2.3.2. Análisis histológico	134
IV.2.3.3. Infiltración neutrofílica, eosinofílica y de macrófagos.....	135
IV.2.3.4. Producción de citocinas	136
IV.2.3.5. Expresión de COX-2 e iNOS.....	138
IV.2.3.6. Activación de Nrf-2, p38 MAPK, β -catenina y NF- κ B.....	138
IV.2.3.7. Expresión génica de anexina A1.....	141
IV.2.4. Efecto sobre el CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS en ratones C57BL/6	142
IV.2.4.1. Estudio macroscópico.....	142

IV.2.4.2. Incidencia de tumores	145
IV.2.4.3. Análisis histológico	146
IV.2.4.4. Expresión de Ki-67 en el epitelio intestinal	147
IV.2.4.5. Liberación de IL-6, TNF- α , IL-17 e IFN- γ	149
IV.2.4.6. Expresión de COX-2, Bax y Bcl-2.....	150
IV.2.4.7. Activación de NF- κ B, Wnt/ β -catenina, STAT3 y PI3K/Akt	152
IV.3. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA IN VITRO	156
IV.3.1. Efecto sobre macrófagos primarios peritoneales de ratón Balb/C.....	156
IV.3.1.1. Producción de nitritos	156
IV.3.1.2. Activación de STAT3.....	157
IV.3.1.3. Activación de NF- κ B.....	158
IV.3.1.4. Expresión génica y liberación de citocinas	159
IV.3.1.5. Expresión de COX-2 e iNOS.....	161
IV.3.2. Efecto cicatrizante sobre IEC-18	163
IV.3.2.1. Expresión de COX-2	166
IV.3.2.2. Activación de p38 MAPK.....	166
IV.3.2.3. Expresión génica de anexina A1.....	167
V. DISCUSIÓN	169
VI. CONCLUSIONES	189
VII. BIBLIOGRAFIA.....	193
VIII. ANEXOS	227
IX. SUMMARY	239
X.CONCLUSIONS	253
XI.PUBLISHED ARTICLES.....	257

LISTADO DE FIGURAS

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estructura química de los aminosalicilatos.....	16
Figura 2. Estructura química de oleuropeina.....	40

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 3. Esquema de extracción de oleuropeina.....	59
Figura 4. Esquema del protocolo de colitis aguda inducida por DSS al 5%.....	63
Figura 5. Esquema de protocolo de colitis aguda inducida por DSS al 3%.....	66
Figura 6. Esquema de protocolo de colitis crónica inducida por DSS.	71
Figura 7. Esquema del protocolo de inducción de CCR inducido por AOM/DSS.	73
Figura 8. Intestino enrollado o rollo "swiss".	75
Figura 9. Ilustración del mecanismo de la reacción MPO.	78
Figura 10. Ilustración del mecanismo de la reacción EPO.	80
Figura 11. Ilustración del mecanismo de la reacción NAG.....	81
Figura 12. Macrófagos primarios peritoneales de ratón tras 24 h de cultivo.....	93
Figura 13. Esquema del protocolo de extracción de macrófagos peritoneales.....	96
Figura 14. Cultivo celular IEC-18.	97
Figura 15. Esquema del protocolo de MTT.	98
Figura 16. Esquema del protocolo de cicatrización celular.	107

IV. RESULTADOS

Figura 17. Espectros de A) RMN- ¹ H y B) RMN- ¹³ C de oleuropeina	113
--	-----

IV.2.1. Efecto sobre la CU inducida por DSS al 5% en ratones Balb/C

Figura 18. Aspecto de los animales.....	115
Figura 19. Efecto de oleuropeina (O) en CU inducida por DSS al 5%.....	117
Figura 20. Efecto de oleuropeina (O) sobre el IAE en CU inducida por DSS al 5%.....	118
Figura 21. Efecto de oleuropeina (O) sobre los niveles de (A) nitritos y de (B) TNF- α en cultivo <i>ex vivo</i> de colon en CU inducida por DSS al 5%.	119
Figura 22. Imágenes representativas del análisis histológico de CU inducida por DSS al 5%.....	120
Figura 23. Efecto de oleuropeina (O) sobre la actividad MPO en CU inducida por DSS al 5%.	121
Figura 24. Efecto de oleuropeina (O) sobre los niveles de citocinas en CU inducida por DSS al 5%.	122
Figura 25. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión de (A) COX-2, (B) iNOS y (C) MMP-9 en CU inducida por DSS al 5%.....	123

Figura 26. Efecto de oleuropeina (O) sobre la translocación nuclear de la subunidad p65 NF- κ B en CU inducida por DSS al 5%.	124
Figura 27. Efecto de oleuropeina (O) sobre la fosforilación de p38 MAPK en CU inducida por DSS al 5%.	125
Figura 28. Efecto de oleuropeina (O) sobre la fosforilación de STAT3 en CU inducida por DSS al 5%.	126
Figura 29. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión génica de anexina A1 en CU inducida por DSS al 5%.	127

IV.2.2. Efecto sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3% en ratones C57BL/6

Figura 30. Efecto de oleuropeina (O) en CU inducida por DSS al 3%.	128
Figura 31. Efecto de oleuropeina (O) sobre IAE en CU inducida por DSS al 3%.	129
Figura 32. Efecto de oleuropeina (O) sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3%.	130
Figura 33. Efecto de oleuropeina (O) sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3%.	131
Figura 34. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de citocinas en CU inducida por DSS al 3%	132

IV.2.3. Efecto sobre la colitis crónica inducida por DSS en ratones C57BL/6

Figura 35. Efecto de oleuropeina (O) sobre la colitis crónica inducida por DSS.	134
Figura 36. Imágenes representativas del análisis histológico en colitis crónica inducida por DSS.	135
Figura 37. Efecto de oleuropeina (O) sobre la infiltración leucocitaria en colitis crónica inducida por DSS.	136
Figura 38. Efecto de oleuropeina (O) sobre los niveles de citocinas en colitis crónica inducida por DSS.	137
Figura 39. Efecto de oleuropeina sobre (O) la expresión de (A) COX-2 e (B) iNOS en colitis crónica inducida por DSS.	138
Figura 40. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión de (A) Nrf-2 nuclear y (B) la forma fosforilada de p38 MAPK citosólica en colitis crónica inducida por DSS.	139
Figura 41. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión de (A) β -catenina y (B) p65 nuclear en colitis crónica inducida por DSS.	140
Figura 42. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión génica de anexina A1 en colitis crónica inducida por DSS.	141

IV.2.4. Efecto sobre el CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS en ratones C57BL/6

Figura 43. Efecto de oleuropeina (O) sobre el IAE en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	143
Figura 44. Efecto de oleuropeina (O) sobre la longitud de colon y edema en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	144

Figura 45. Efecto de oleuropeina (O) sobre la incidencia de tumores en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.....	145
Figura 46. Imágenes representativas del análisis histológico de CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS (4x)..	146
Figura 47. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión epitelial de Ki-67 en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	148
Figura 48. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de citocinas en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.....	150
Figura 49. Efecto de oleuropeina (O) sobre COX-2 en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	151
Figura 50. Efecto de oleuropeina sobre (A) Bax y (B) Bcl-2 en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	152
Figura 51. Efecto de oleuropeina (O) sobre la activación nuclear de (A) p65 NF- κ B y de (B) β -catenina en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.....	154
Figura 52. Efecto de oleuropeina (O) sobre la fosforilación en el citosol de (A) STAT3 y (B) Akt en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	155
IV.3.1. Efecto sobre macrófagos primarios peritoneales de ratón Balb/C	
Figura 53. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la liberación de NO en macrófagos peritoneales.	157
Figura 54. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales.....	158
Figura 55. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la translocación al núcleo de la subunidad p65 NF- κ B en macrófagos peritoneales.	159
Figura 56. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la expresión génica de citocinas en macrófagos peritoneales.....	160
Figura 57. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la liberación de citocinas por macrófagos peritoneales.....	161
Figura 58. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la expresión de (A) COX-2 e (B) iNOS en macrófagos peritoneales.....	162
IV.3.2. Efecto cicatrizante sobre IEC-18	
Figura 59. Efecto de oleuropeina (O) sobre la proliferación y cicatrización de IEC-18.....	164
Figura 60. Efecto de oleuropeina (O) sobre la cicatrización de IEC-18 por migración celular.	165
Figura 61. Efecto de oleuropeina (O) sobre COX-2 en IEC-18.....	166
Figura 62. Efecto de oleuropeina (O) sobre la fosforilación de p38 MAPK en IEC-18.	167
Figura 63. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión génica de anexina A1 en IEC-18..	168

LISTA DE TABLAS

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1. Ensayos clínicos de extractos y productos derivados de plantas en el tratamiento de la EII .38

Tabla 2. Ensayos clínicos de extractos y productos derivados de plantas en el tratamiento del CCR .39

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3. Evaluación del IAE 74

Tabla 4. Instrucciones del kit ELISA. 83

Tabla 5. Pasos a seguir para la extracción de ARNm. 89

Tabla 6. Lista de cebadores para RT-PCR..... 91

Tabla 7. Protocolo de tratamiento celular de los macrófagos peritoneales de ratones Balb/C..... 99

Tabla 8. Proteínas detectadas mediante western blot en macrófagos peritoneales de Balb/C. 102

Tabla 9. Protocolo de tratamiento celular de IEC-18. 108

IV.2.1. Efecto sobre la CU inducida por DSS al 5% en ratones Balb/C

Tabla 10. Efecto de oleuropeina (O) en CU inducida por DSS al 5%. 116

Tabla 11. Efecto de oleuropeina (O) sobre el IAE en CU inducida por DSS al 5%. 117

Tabla 12. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de nitritos y de TNF- α en cultivo *ex vivo* de colon..... 119

Tabla 13. Efecto de oleuropeina (O) sobre la actividad MPO en CU inducida por DSS al 5%. 121

Tabla 14. Efecto de oleuropeina (O) sobre los niveles de citocinas en CU inducida por DSS al 5%.
..... 122

IV.2.2. Efecto sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3% en ratones C57BL/6

Tabla 15. Efecto de oleuropeina (O) en CU inducida por DSS al 3%. 128

Tabla 16. Efecto de oleuropeina (O) sobre IAE en CU inducida por DSS al 3%. 129

Tabla 17. Efecto de oleuropeina (O) sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3%. .. 130

Tabla 18. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de citocinas en CU inducida por DSS al 3%.
..... 132

IV.2.3. Efecto sobre la colitis crónica inducida por DSS en ratones C57BL/6

Tabla 19. Efecto de oleuropeina (O) sobre la colitis crónica inducida por DSS. 134

Tabla 20. Efecto de oleuropeina (O) sobre la infiltración leucocitaria en colitis crónica inducida por DSS. 136

Tabla 21. Efecto de oleuropeina (O) sobre los niveles de citocinas en colitis crónica inducida por DSS.	137
IV.2.4. Efecto sobre el CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS en ratones C57BL/6	
Tabla 22. Efecto de oleuropeina (O) sobre el IAE en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	143
Tabla 23. Efecto de oleuropeina (O) sobre la longitud de colon y edema en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	144
Tabla 24. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión epitelial de Ki-67 en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	148
Tabla 25. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de citocinas en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS.	149
IV.3.1. Efecto sobre macrófagos primarios peritoneales de ratón Balb/C	
Tabla 26. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la liberación de NO en macrófagos peritoneales..	157
Tabla 27. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la liberación de citocinas por macrófagos peritoneales.....	161
IV.3.2. Efecto cicatrizante sobre IEC-18	
Tabla 28. Efecto de oleuropeina (O) sobre la proliferación y cicatrización de IEC-18.	164

ABREVIATURAS

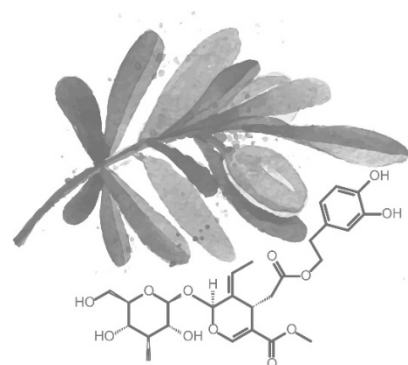
4-HNE	4-Hidroxinonenal
5-ASA	5-Aminosalicílico
5-FU	5-Fluorouracilo
5-LO	5-Lipooxigenasa
6-MP	6-Mercaptopurina
6-TG	6-Tioguanina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
AOM	Azoximetano
AP-1	Proteína activadora-1
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
Aβ	Proteína amiloide
BSA	Albúmina sérica bovina
CCR	Cáncer colorrectal
CEP	Colangitis esclerosante primaria
CMH	Células madre hematopoyéticas
CMM	Células madre mesenquimales
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CPSP	Células polimorfonucleares de sangre periférica
CU	Colitis ulcerosa
DAB	3'3-Diaminobencidina

DMEM	Medio Eagle modificado por <i>Dulbecco</i> (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DPPH	2,2-Difenilo-1-picrilhidracilo
DSS	Dextrano sulfato sódico
DTT	Ditiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EGCG	Galato de epigallocatequina
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPO	Eosinofilperoxidasa
ERK	Proteínas cinasas reguladoras de señales extracelulares
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell sorting</i>
FCA	Focos de criptas aberrantes
HCIO	Ácido hipocloroso
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HIF	Factor inducible por hipoxia
HO-1	Hemooxigenasa-1
IAE	Índice de actividad de la enfermedad
ICAM	Moléculas de adhesión intercelulares
IEC	Células epiteliales intestinales
IFN	Interferón

IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK	Proteínas cinasas c-Jun N-terminal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
MadCAM	Moléculas de adhesión vasculares de mucosa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MPO	Mieloperoxidasa
MMP	Metaloproteinasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NAG	N-acetilglucosaminidasa
NFAT	Factor nuclear activador de células T
NF-κB	Factor Nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOD2	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2
Nrf-2	Factor nuclear eritrocítico
PARP	Polimerasa Poli-ADP ribosa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PMA	Acetato de forbol miristato
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Transcripción inversa

SCSIE	Servicios Centrales de Soporte a la Investigación Experimental
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción-3
TcR	Receptor de antígenos en linfocitos T
Th	Células T colaboradoras o <i>helpers</i>
TLR	Receptor <i>Toll like</i>
TMB	Tetrametilbencidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
UV	Ultravioleta
VCAM	Moléculas de adhesión vasculares
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Introducción





El organismo está diseñado para protegerse frente a agentes externos mediante un complejo sistema de defensa, el sistema inmunológico. Tras su activación, se desencadena una respuesta inflamatoria, que consiste en una serie de procesos dirigidos a eliminar cuerpos extraños y reparar el daño producido. La respuesta inflamatoria es un mecanismo fisiológico y autolimitante, pero en determinadas ocasiones el organismo es incapaz de solventar esta situación, y se produce un desequilibrio entre los mecanismos efectores y reparadores, que, si se alarga en el tiempo, da lugar a una serie de patologías asociadas a la inflamación, como las alergias, la artritis reumatoide, la dermatitis atópica o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Este tipo de enfermedades se desencadena debido a la confluencia de distintos factores ambientales y genéticos, que junto con un desorden de tipo inmunológico induce una inflamación extensa e incontrolada, provocando un daño tisular. En el caso de la EII, su origen es desconocido, pero la teoría más aceptada es la de la sensibilización del sistema inmunológico frente a la microbiota y antígenos intraluminales. Esta respuesta resulta en una hiperreactividad linfocitaria y liberación de mediadores inflamatorios, que perpetúa la respuesta en el tiempo, condicionando el carácter crónico y recurrente de esta enfermedad (Xavier y Podolsky, 2007). Las principales manifestaciones de la EII son la enfermedad de Crohn (EC), donde puede verse afectada cualquier parte del sistema gastrointestinal y la colitis ulcerosa (CU), en la que la lesión se sitúa principalmente en el intestino grueso. Además, se ha comprobado que los pacientes que sufren CU tienen un mayor riesgo de sufrir cáncer colorrectal (CCR), ya que el daño y la inflamación continuada crea un ambiente propicio para el desarrollo de neoplasias en el colon (Tang y cols., 2012). De acuerdo con recientes estudios, la incidencia anual de CU es de 19,2-24,3 casos por



100.000 habitantes en Europa y Estados Unidos, mientras que para EC es de 12,7-20 casos por 100.000 habitantes. En el continente asiático los valores se reducen, 6,3 por cada 100.000 en CU y 5 casos por 100.000 en EC, aunque estas cifras van en aumento (Molodecky y cols., 2012).

Actualmente se están realizando numerosos avances en la terapia de la EII, sin embargo, el desconocimiento de su etiología limita el desarrollo de fármacos que reviertan de forma definitiva estas patologías. Los tratamientos se centran en paliar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Entre los fármacos de referencia se encuentran los glucocorticoides o los antagonistas de citocinas proinflamatorias para tratar los brotes agudos e inducir la remisión, los aminosalicilatos y las tiopurinas para mantener el periodo de remisión y evitar la aparición de nuevos brotes (Bousoño y Ramos, 2006; Mowat y cols., 2011). Pero muchos pacientes son refractarios a los tratamientos y no están exentos de efectos adversos, siendo algunos de ellos muy graves. En este contexto, la medicina complementaria y alternativa (CAM) ha resurgido en los últimos años, principalmente entre aquellas personas con enfermedades crónicas. El objetivo es reducir los síntomas asociados a la enfermedad y/o los efectos adversos que generan los tratamientos (Humpel y Jones, 2006; Shen y cols., 2002). Entre las distintas terapias que abarca la CAM, se encuentra el uso de productos naturales, bien mediante el empleo de las plantas medicinales o de los extractos que los contienen, bien de los principios puros (Biasi y cols., 2011; Frontela y cols., 2010; Romier y cols., 2009; Shapiro y cols., 2007).

Nuestro grupo de investigación tiene una dilatada experiencia en el estudio de la actividad antiinflamatoria de productos naturales (Recio y



cols., 1995; Cuéllar y cols., 2001; Sala y cols., 2002; Recio y cols., 2004; Hernández y cols., 2005; Escandell y cols., 2007; Prieto y cols., 2008; Andújar y cols., 2010; Giner y cols., 2011) habiéndose centrado en los últimos años en la búsqueda de compuestos fenólicos como potenciales agentes útiles en el tratamiento de la EII (Andújar y cols., 2011; Andújar y cols., 2012; Marín y cols., 2013).

El aceite de oliva virgen es un componente básico de la dieta mediterránea. Uno de los productos responsable de sus propiedades cardioprotectoras, presente también en los frutos y extractos de las hojas del olivo (*Olea europaea* L., Oleaceae) es la oleuropeina, un secoiridoide fenólico con marcada actividad antiinflamatoria y antitumoral. Distintos estudios demuestran que una dieta enriquecida en los polifenoles del aceite de oliva, entre ellos oleuropeina, protege frente a la colitis crónica inducida por DSS (Sánchez-Fidalgo y cols., 2013). Este compuesto también previene la inflamación en ratas ovariectomizadas (Puel y cols., 2004) y reduce los niveles de interleucina (IL)-1 β y factor de necrosis tumoral (TNF)- α en la pleuritis inducida por carragenina (Impellizzeri y cols., 2011). Además, se ha visto que oleuropeina detiene el crecimiento e incrementa la apoptosis en células de cáncer de colon HT-29 mediante la activación de la vía p53 (Cárdeno y cols., 2013), reduce la fosforilación de Akt en una línea celular cancerosa prostática (Acquaviva y cols., 2012), e incrementa la expresión de caspasa 3 y Bax, mientras que reduce Bcl-2 y survivina en células de cáncer de mama estrógeno-resistentes (Elamin y cols., 2013).

Aunque no existe un modelo experimental ideal para el estudio de la EII, la administración del agente químico dextrano sulfato sódico (DSS) a ratones desencadena una inflamación intestinal con características



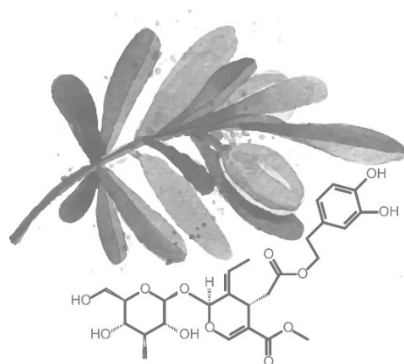
fisiopatológicas similares a la CU en humanos, siendo un método bastante recurrido para evaluar nuevos fármacos activos en EII. La administración de DSS durante 5-7 días al 3-5% induce una inflamación intestinal aguda, mientras que ciclos repetidos de DSS al 1-2% y alternados con periodos de agua, provoca una inflamación crónica. Este protocolo puede desencadenar de forma esporádica CCR, pero su baja reproducibilidad lleva al empleo del agente carcinogénico azoximetano (AOM), con tropismo por el intestino que provoca metilaciones en el ADN, que junto con la administración repetida de DSS aseguran el 100% de incidencia de CCR en ratones (Clapper y cols., 2007).

El principal objetivo de esta Tesis doctoral es demostrar la potencialidad de la oleuropeina como agente antiinflamatorio y protector frente a la EII, más concretamente CU. Para ello se procederá al:

- Estudio de la actividad *in vivo* de la oleuropeina en un modelo de colitis aguda inducida por DSS.
- Desarrollo de un protocolo experimental de aislamiento de linfocitos T de la *lamina propria* así como el estudio de la actividad moduladora de oleuropeina sobre la respuesta Th17.
- Estudio del efecto antiinflamatorio de oleuropeina en un modelo de colitis crónica inducida por DSS.
- Desarrollo de un modelo de CCR asociado a colitis inducido por AOM y DSS y evaluación del efecto quimiopreventivo *in vivo* de oleuropeina.
- Evaluación del efecto de oleuropeina sobre cultivos primarios de macrófagos y una línea de células epiteliales de intestino de rata.

Revisión

Bibliográfica





II.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

II.1.1. Concepto y generalidades

La EII se conoce como una disfunción crónica y de carácter inflamatorio del aparato digestivo, cuya patología se acompaña de brotes agudos alternados con periodos de remisión, y que resulta de la interacción de factores genéticos, inmunológicos, ambientales y cambios relacionados con la microbiota intestinal. Su etiología es desconocida, pero la hipótesis más aceptada es que factores ambientales e infecciones alteran el epitelio intestinal y se desencadena una pérdida de tolerancia inmunológica a los antígenos de la microbiota. Este fenómeno provoca una activación de las células dendríticas, que migran a los nódulos linfáticos y promueven la diferenciación de los linfocitos T a células colaboradoras o T *helpers* (Th)¹, Th2 y Th17 o linfocitos T reguladores (Treg) (Kaistha y cols., 2014). Las dos manifestaciones más importantes de EII son la CU y la EC, patologías con rasgos clínicos y patológicos que coinciden pero también otros que los diferencian (Podolsky, 1991). La CU consiste en una inflamación continua de la mucosa del colon, que aparece generalmente en el recto, y que puede limitarse a esa zona, o bien, extenderse a todo el colon, pero siempre restringida al intestino grueso. La EC, en cambio, es un desorden inflamatorio transmural y segmental, que puede desarrollarse en cualquier parte del sistema gastrointestinal (Silverberg y cols., 2005; Sarlos y cols., 2014). Un estudio sistemático que recopiló información epidemiológica sobre la EII a nivel mundial entre los años 1920 a 2010, determinó que la incidencia anual de CU era 24,3:100.000 habitantes en Europa; 19,2:100.000 en Norte América y 6,3:100.000 en el continente asiático. En



el caso de la EC, la incidencia anual se cifró 12,7:100.000 en Europa; 20,2:100.000 en el continente norteamericano, y al igual que en la CU, la incidencia en Asia fue más baja, 5,0:100.000, posiblemente debido a los diferentes niveles de industrialización (Molodecky y cols., 2012).

En cuanto a la histopatología y los síntomas clínicos, la CU afecta a la mucosa y submucosa del colon, aunque cuando es severa puede verse involucrada la parte muscular. En los casos más leves, la membrana de la mucosa sufre una pérdida del patrón vascular normal, presentándose eritematosa, fina y frágil. Los exudados purulentos con grandes ulceraciones corresponden a los casos más graves. Los pacientes se aquejan de diarrea sanguinolenta, numerosas deposiciones y dolores abdominales. Si el colon proximal se ve afectado, los espasmos intestinales son bastante frecuentes, así como heces con sangre y calambre severos (Danese y Fiocchi, 2011). La EC, desde un punto de vista histológico, empieza con una inflamación en las criptas y abscesos, provocando úlceras que van incrementando su tamaño, y que, al asociarse con el edema de la mucosa, se desencadena una apariencia adoquinada del intestino. La inflamación extensa puede provocar hipertrofia y fibrosis en la capa *muscularis mucosae*, pudiendo generar obstrucción intestinal. Los abscesos son comunes y las fístulas pueden penetrar en tejidos adyacentes. Cuando se afecta el intestino delgado, los síntomas que aparecen son diarrea no sanguinolenta, calambres abdominales, dolor, pérdida de peso y anorexia. Si predomina la afectación del colon, dolor abdominal difuso y heces con sangre y moco son los principales síntomas, indistinguibles de pacientes con CU. Si en cambio, es la parte gastroduodenal la que se ve afectada, se



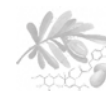
presentan náuseas y vómitos, además de anorexia (Nikolaus y Schreiber, 2007; Wilkins y cols., 2011).

II.1.2. Factores implicados en la EII

Tal y como se ha citado anteriormente, existen diferentes factores que predisponen la aparición de esta enfermedad: genéticos, ambientales, inmunológicos y aquellos relacionados con la integridad epitelial y la microbiota intestinal. A continuación se describen algunos de ellos.

II.1.2.1. Factores genéticos

Es indiscutible la participación de la genética en la EII. El descubrimiento de que determinadas variantes génicas de NOD2/CARD5 y de IL-23R están implicadas en el desarrollo de la enfermedad (Hugot y cols., 2001; Duerr y cols., 2006), ha permitido el desarrollo de una línea de investigación que relaciona el código genético con la EII. El gen NOD2 codifica para el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2 (NOD2), una proteína intracelular esencial para iniciar la respuesta inmunológica innata tras una exposición a péptidoglicanos, en concreto a dipéptido muramil, activando numerosas vías de señalización celular (Philpott y cols., 2014). Se ha descubierto también que, junto con polimorfismos en el gen ATG16L1 (Hampe y cols., 2007; Rioux y cols., 2007) desempeña un importante papel en la inducción de la autofagia (capacidad para eliminar tanto lisosomas de bacterias intracelulares como los propios orgánulos celulares). Por tanto, su mutación está asociada a una deficiente regulación del sistema inmune innato y un desequilibrio en el reconocimiento de bacterias comensales y patógenas. Además, se compromete la eliminación de bacterias intracelulares,



afectando a la respuesta inmune adaptativa y favoreciendo la cronificación de la inflamación intestinal. Mutaciones en NOD2 son específicas de pacientes con EC (Corridonia y cols., 2014). La vía IL-23/IL-12 determina la diferenciación de linfocitos T a linfocitos efectores Th1 o Th17, y variantes en el gen que codifica para el receptor de IL-23 (IL-23R) se relacionan con un aumento de la incidencia de EC y CU. (Duerr y cols., 2006). Actualmente se conocen unas 163 variantes genéticas, 23 están asociadas a CU, 30 a la EC y 110 a ambas. Sin embargo, estas 163 variantes sólo representan un 25% de los casos de EII, incluso aunque se encuentren nuevas asociaciones, este porcentaje no aumenta. Con otras palabras, el factor genético protagoniza una importante carga en la patogenia de la EII, pero como único elemento no es suficiente para explicar la incidencia de la enfermedad. Es por eso, que las interacciones entre gen-gen o gen-ambiente han de ser estudiadas para comprender la patogénesis de la EII.

II.1.2.2. Factores ambientales y cambios en la microbiota intestinal

Entre los factores ambientales, destacan: (1) el tipo de dieta, donde el estilo occidental aumenta el riesgo de sufrir EII, (2) medicamentos como algunos antibióticos, que modifican la microbiota intestinal, o el daño gastrointestinal producido por determinados antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) incrementan la probabilidad de desarrollar EII, (3) el tabaco, con efecto protector sobre la CU y agravante en el caso de la EC, (4) estrés y (5) la cantidad y calidad de la microbiota intestinal (Corridonia y cols., 2014). Los pacientes con EII presentan una disbiosis en el intestino, con una menor diversidad en el microbioma intestinal con respecto a individuos sanos. De hecho, en pacientes con EC se observa una reducción de la subpoblación de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y un incremento en



Enterobacteria; el patrón difiere ligeramente en pacientes con CU, donde se observa una disminución de *Clostridium spp* y un aumento de *Escherichia coli* (Frank y cols., 2007; Eckburg y Relman, 2007). Además, se ha descubierto la presencia de una cepa de *E. coli* adherente-invasiva en la mucosa del colon e íleon de pacientes con EC, sugiriendo un posible papel patogénico también en esta forma de EII (Barnich y Darfeuille-Michaud, 2007).

II.1.2.3. Barrera epitelial intestinal

La barrera epitelial intestinal protege al huésped frente a la entrada de sustancias nocivas y organismos patógenos desde el contenido intestinal, y a la vez, permite el paso de nutrientes al organismo. El elemento central que divide el lumen del ambiente interno es la capa epitelial, integrada principalmente por células intestinales epiteliales (IEC) y células secretoras de moco o caliciformes. Las IEC forman un perfecto entramado mediante uniones específicas intercelulares, e intercaladas entre ellas, se encuentran las células caliciformes. Ambas constituyen la primera línea de defensa física de la barrera epitelial, y custodian la parte externa de la barrera mediante la segregación de moco y liberación al lumen de péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas. Sin embargo, las IEC también son capaces de modular la respuesta inmunológica, ya que expresan receptores de reconocimiento de patrones, por lo que al interactuar con las bacterias, se activan diferentes vías de señalización celular y se expresan y liberan numerosos mediadores inflamatorios como ciclooxigenasa (COX)-2, citocinas o fosfatasa alcalina, encargada de neutralizar el lipopolisacárido (LPS). Así mismo, son capaces de activar la respuesta adaptativa, ya que actúan como células presentadoras de antígenos a las células inmunes que



se encuentran en la parte interna de la barrera, y que modulan la respuesta inflamatoria intestinal (Coskun, 2014).

Tanto en pacientes con CU como EC se observa una disrupción del epitelio y un aumento de la permeabilidad intestinal, pero, no está claro si es una causa o una consecuencia de la inflamación crónica (Salim y Söderholm, 2011). Se ha descubierto que determinados defectos en la barrera epitelial representan un mecanismo primario de patogénesis. Específicamente, se ha asociado la susceptibilidad de padecer CU con polimorfismos en genes que codifican para proteínas relacionadas con las uniones intercelulares, como la E-cadherina o laminina (Anderson y cols., 2011).

II.1.2.4. Factores inmunológicos

La combinación de los factores genéticos, ambientales y/o fisiopatológicos hacen que el sistema inmunológico de la mucosa intestinal se active de manera descontrolada, creándose un ambiente inflamatorio que se perpetúa a lo largo del tiempo, y provoca una inflamación intestinal crónica.

La *lamina propria* se caracteriza por la presencia de numerosos tipos celulares de carácter inmunológico, que mantienen un estado de inflamación fisiológico controlado frente a la gran variedad de bacterias y sustancias que se encuentran en el lumen, con la finalidad de combatir el daño producido por la microbiota, dieta y otros agentes extraños. Entre las células inmunológicas se encuentran neutrófilos, macrófagos, mastocitos, células innatas linfoides y linfocitos T y B.



Tradicionalmente, la EC se asocia con una respuesta inmune atípica de carácter Th1, estimulada por la acción de IL-18 e IL-12, y una mayor producción de IL-2 e interferón- γ (IFN- γ) con respecto a la mucosa de pacientes con CU (Breese y cols., 1993). En cambio, la CU se relaciona con una respuesta asociada a Th2, con una excesiva producción de IL-3 e IL-5. Sin embargo, en estudios recientes se han observado distintos perfiles de citocinas en la mucosa tanto de pacientes con CU como de EC a los previamente establecidos, haciendo reconsiderar el paradigma Th1/Th2 en la EII (Geremia y cols., 2014). Asimismo, se ha relacionado la participación de una nueva estirpe de linfocitos T en la patogénesis de la EII. Estas respuestas se conocen como Th17 y Th1/Th17, y se encargan de liberar principalmente IL-17A, IL-17F, IL-22 e IFN- γ . Se han encontrado altos niveles de IL-17A tanto en tejido intestinal de pacientes con CU como de EC en comparación con tejido de individuos sanos. Además, se observa un incremento de células Th17 y Th1/Th17 en la mucosa de pacientes con EII (Rovedatti y cols., 2009).

II.1.3. Farmacoterapia de la EII

Actualmente, la EII no dispone de una cura farmacológica eficaz debido a la falta de conocimientos sobre su etiología, por lo que el tratamiento está enfocado a reducir los brotes agudos y promover la cicatrización de la mucosa intestinal, mejorando así la calidad de vida de los pacientes. No obstante, muchos de ellos son refractarios a los medicamentos actuales, incluyendo las terapias convencionales y biológicas, inconveniente al que se le suma los numerosos efectos adversos que presentan, provocando, en algunos casos, la falta de adherencia al tratamiento. Las opciones terapéuticas más utilizadas para la EII son los



aminosalicilatos, glucocorticoides, tiopurinas, antagonistas del ácido fólico, inhibidores de la calcineurina, anticuerpos anti-TNF- α y antagonistas de integrinas, como $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$.

II.1.3.1. Aminosalicilatos

Los aminosalicilatos se caracterizan por contener en su estructura el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), un potente agente antiinflamatorio con numerosos efectos a nivel intestinal. El 5-ASA inhibe importantes vías de señalización celular implicadas en la EII, como la proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) o el factor de transcripción nuclear (NF)- κ B, debido en parte a que interfiere en la unión con TNF- α (Kaiser y cols., 1999). También activa el receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR- γ), que se encarga de antagonizar los mediadores inflamatorios producidos por la activación de las vías del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT)3 o la proteína activadora (AP)-1 (Dubuquoy y cols., 2006; Sales-Campos y cols., 2015). Los aminosalicilatos más frecuentes por orden de uso son mesalazina (5-ASA), sulfasalazina (Figura 1), olsalazina y balsalazida. La mesalazina corresponde a la molécula de 5-ASA propiamente, mientras que el resto, son profármacos que, al metabolizarse por la microbiota intestinal liberan la molécula de 5-ASA al lumen.

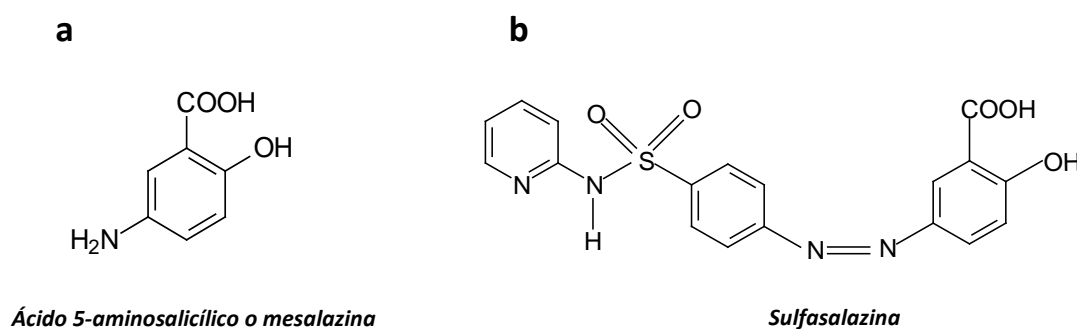


Figura 1. Estructura química de los aminosalicilatos



Los aminosalicilatos son el tratamiento de primera línea para la remisión y mantenimiento de la CU activa moderada, sin embargo, pueden ser refractarios en muchos casos y poseen numerosos efectos adversos, por lo que suponen un retraso en la utilización de estas moléculas como base terapéutica. En el caso de la EC, la evidencia de tratamiento no es tan fuerte como en la UC, y se necesitan más estudios clínicos para determinar su eficacia en esta patología.

II.1.3.2. Glucocorticoides

Los corticosteroides son uno de los tratamientos más utilizados para el manejo de la EII. Los glucocorticoides son hormonas esteroideas liberadas de forma natural por el organismo. Estas moléculas se unen a receptores citosólicos, que migran al núcleo e interfieren en la transcripción de diversos genes, relacionados principalmente con la respuesta inflamatoria (por ejemplo, NF- κ B). Inhiben la producción de citocinas, moléculas de adhesión o enzimas proinflamatorias (óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y COX-2) (Adcock y cols., 2004). Muchos pacientes con CU y EC activa responden de manera satisfactoria al tratamiento con glucocorticoides por vía oral, reservándose la vía intravenosa para casos más graves. Sin embargo, el uso prolongado de estos medicamentos provoca serios efectos adversos, tales como osteoporosis, síndrome metabólico, problemas cardiovasculares o inmunosupresión y además, algunos pacientes pueden presentar resistencia al tratamiento con estos medicamentos, fenómeno llamado *dependencia esteroide* (Kandror y Mayer, 2014). A diferencia de lo que se podría suponer, parece que la vía glucocorticoide no está involucrada en este proceso, ya que diferentes estudios clínicos relacionan este suceso con un agravamiento de la actividad de la enfermedad (Wine y



cols., 2013). Asimismo, pacientes con polimorfismos en determinados genes son más propensos a desarrollar esta resistencia (De Iudibus y cols., 2011). Debido a sus múltiples efectos adversos, se han diseñado formulaciones tópicas en forma de enemas y espumas, con una efectividad elevada y mínimas complicaciones, pero esta forma de administración es a veces limitada, debido a la dificultad de posología, retención y dispersión a nivel proximal. Los corticosteroides de segunda generación como budesonida son los más utilizados, ya que producen un potente efecto antiinflamatorio a nivel intestinal. Además, budesonida presenta un metabolismo hepático de primer paso del 90%, por lo que se reducen considerablemente los efectos secundarios, y administrada por vía rectal presenta una alta eficacia en la inducción de la remisión en CU (Sandborn y cols., 2015). Otras alternativas terapéuticas son la combinación de glucocorticoides con aminosalicilatos (Mulder y cols., 1996) o con inmunosupresores (Markowitz y cols., 2000), demostrando una efectividad superior a la monoterapia, además de reducir las dosis de glucocorticoides y con ello, sus efectos no deseados.

II.1.3.3. Tiopurinas

Este grupo de medicamentos incluye azatioprina y 6-mercaptopurina (6-MP), y representa una de las opciones terapéuticas utilizadas en el tratamiento de la EII, siendo de elección sobretodo en pacientes con EC corticodependiente. La azatioprina se metaboliza en el organismo a 6-MP, y ésta finalmente se transforma en 6-tioguanina (6-TG). El mecanismo de acción de las tiopurinas no se conoce exactamente, pero sus efectos muestran una inhibición de la síntesis de nucleótidos y proteínas y un bloqueo de la vía de señalización TcR (receptor para antígenos de los



linfocitos), desencadenando la apoptosis en linfocitos T (Sales-Campos y cols., 2015). Otras acciones se asocian con una reducción de la inflamación, debido a un bloqueo de la expresión de moléculas proinflamatorias, generalmente relacionadas con la acción de los metabolitos de 6-TG. Sin embargo, la utilización de las tiopurinas en según qué fase de la EII es un tema de controversia. Una de las características principales de estos medicamentos es que el efecto terapéutico aparece a partir de los 3-6 meses de tratamiento. Se ha comprobado que la administración de tiopurinas durante el periodo de remisión de la enfermedad, es eficaz tanto en pacientes con CU como EC protegiendo frente a la aparición de brotes agudos (Fraser y cols, 2002; Dassopoulos y cols., 2013), pero los resultados no son tan evidentes en la inducción de la remisión de la EII. En el caso de la CU, parece no tener ningún efecto positivo sobre los relapsos, pudiendo ser debido a que el inicio de acción de este tipo de fármacos es lento (Chaparro y Gisbert, 2011); en el caso de la EC activa, necesita de la combinación con otros tratamientos, como corticosteroides o agentes anti-TNF- α , hasta alcanzar la fase de remisión (Chande y cols., 2013).

Entre las ventajas de las tiopurinas, su uso es seguro durante el embarazo y no aumenta el riesgo de complicaciones perioperatorias en EII (Martínez-Montiel y cols., 2015). Además, se ha visto que en algunos pacientes que no responden bien a azatioprina, generalmente debido a los efectos secundarios que posee, se puede considerar el uso de 6-MP, ya que la mitad de los pacientes refractarios o intolerantes a azatioprina, no lo son a 6-MP (Hindorf y cols., 2009). En cuanto a los efectos adversos, son menores que los producidos por los glucocorticoides, pero cabe destacar las múltiples infecciones debido a su carácter inmunosupresor y la posible



aparición de algunos tipos de linfoma, generalmente asociado a la infección del virus de Epstein-Barr en pacientes seropositivos con EII. También se ha relacionado un aumento del riesgo de cáncer cutáneo del tipo no-melanoma en pacientes tratados con tiopurinas (Martínez-Montiel y cols., 2015). Otras complicaciones relacionadas con los metabolitos de las tiopurinas son hepatitis, leucopenia o pancreatitis (Kandror y Mayer, 2014).

II.1.3.4. Antagonistas del ácido fólico

El metotrexato es el antagonista del ácido fólico más utilizado para tratar las enfermedades autoinmunes. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la síntesis de purina y pirimidina, aumentando la concentración de adenosina, una molécula con propiedades antiinflamatorias (Cronstein y cols., 1993). Reduce también la producción de citocinas proinflamatorias y activa la apoptosis de linfocitos (Kandror y Mayer, 2014). Representa el tratamiento de segunda línea en el caso de pacientes refractarios o intolerantes a las tiopurinas, y generalmente está indicado para el tratamiento de la EC. La administración parenteral de metotrexato es la más eficaz tanto en la fase activa como en el mantenimiento de EC, mientras que la vía oral se restringe a la fase de remisión, y siempre a dosis altas (Swaminath y cols., 2014). En el caso de la CU, su uso no está completamente establecido, ya que algunos estudios clínicos evidencian que no es efectivo, al menos en la fase aguda de la enfermedad, aunque puede reducir la dosis de corticoides en pacientes en remisión (Bryant y cols., 2015).

La hepatotoxicidad es un efecto secundario bastante grave asociado al metotrexato, además de ser teratogénico, por lo que su uso está



contraindicado en el embarazo (Dignass y cols., 2010). No es un medicamento adecuado para tratamientos a largo plazo, ya que se reduce su eficacia y es necesario un aumento de las dosis.

II.1.3.5. Inhibidores de calcineurina

Para el manejo de la EII, destacan dentro de este grupo ciclosporina y tacrolimus. Corresponden al tratamiento de segunda línea en el caso de CU severa en pacientes que no responden a corticoides. Su mecanismo de acción se basa en la inmunosupresión, actuando específicamente sobre los linfocitos T. Mediante la formación de un complejo con unas inmunofilinas intracelulares llamadas ciclofilinas, inhiben la actividad de la calcineurina-fosfatasa, una enzima imprescindible para la fosforilación del factor nuclear activador de células T (NFAT). Este efecto impide que NFAT pase al núcleo y promueva la transcripción de IL-2, citocina relacionada con la activación de linfocitos T (Amor y cols., 2010).

Los estudios demuestran la eficacia de ciclosporina en CU activa severa, administrada principalmente por vía intravenosa, a una dosis de 4 mg/kg/día. Sin embargo, en la práctica clínica se utiliza a 2 mg/kg/día, ya que se ha demostrado que ambas dosis tienen el mismo efecto terapéutico y además, la mitad de la dosis ofrece la ventaja de reducir los efectos adversos (Martínez-Montiel y cols., 2015). Las principales limitaciones de la ciclosporina son su estrecho margen terapéutico, que obliga a controlar de manera exhaustiva los niveles plasmáticos, y los numerosos efectos adversos, que son dosis-dependientes, tales como infecciones oportunistas, nefropatías, problemas cardiovasculares, e incluso riesgo de muerte. Estos problemas provocan que un porcentaje alto de pacientes se



niegue a recibir este tratamiento, por lo que se reduce la evidencia de eficacia terapéutica al no poseer suficientes datos clínicos. En cuanto a la EC, la incongruencia de los resultados obtenidos en varios ensayos clínicos, conlleva a que su uso en la remisión de la enfermedad se encuentre en debate, y en principio, no se recomienda el uso de ciclosporina en pacientes de EC refractarios a corticoides (Dignass y cols., 2012).

El mecanismo de acción de tacrolimus es similar a ciclosporina, pero sus efectos adversos son más predecibles. Algunos estudios reflejan un beneficio significativo con respecto a placebo en CU (Ogata y cols., 2006), por lo que se podría considerar su uso en determinados casos de CU refractaria (Farkas y cols., 2014). En el tratamiento de EC, la experiencia clínica de tacrolimus es muy limitada, y se necesitan muchos más ensayos clínicos aleatorizados y controlados para determinar su eficacia (McSharry y cols., 2011).

II.1.3.6. Anticuerpos anti-TNF- α

Los agentes anti-TNF- α se desarrollan como una nueva alternativa terapéutica para aquellos pacientes refractarios o intolerantes a los tratamientos anteriores. Mediante el bloqueo de la citocina TNF- α , estos fármacos han mostrado resultados prometedores en el mantenimiento de la remisión de EC, en sus formas moderada y severa. Los agentes más utilizados son infliximab, adalimumab, certolizumab y golimumab.

Infliximab fue el primer anticuerpo contra TNF- α aprobado para el uso en EII. Se administra por vía intravenosa, y su mecanismo de acción consiste en el bloqueo tanto de TNF- α soluble como el unido a membrana. Numerosos ensayos clínicos han demostrado la eficacia frente a placebo en



el mantenimiento de la remisión de la EC, mejorando también la cicatrización de fístulas y reduciendo el número de hospitalizaciones. Además, en estos mismos estudios se optimizan las dosis y la posología (Hanauer y cols., 2002; Sands y cols., 2004). En cuanto a su uso en CU, se ha visto que el tratamiento con infliximab mejora la inducción y el mantenimiento de la remisión en CU refractaria a los tratamientos estándar (Rutgeerts y cols., 2005). Sin embargo, aunque generalmente suele ser efectivo, en un porcentaje de pacientes aparece una resistencia al infliximab, y podría relacionarse con la producción de anticuerpos anti-infliximab por los pacientes (Sales-Campos y cols., 2015). Además, sus efectos secundarios son numerosos, algunos incluso muy graves, limitando su uso.

El anticuerpo adalimumab tiene la ventaja de administrarse vía subcutánea. En diversos ensayos clínicos se ha observado el beneficio de adalimumab con respecto a placebo en la remisión de EC activa, mantenimiento a largo plazo y respuesta al tratamiento en pacientes no sensibles a infliximab (Hanauer y cols., 2006; Sandborn y cols., 2007a; Sandborn y cols., 2007b; Colombel y cols., 2007; Rutgeerts y cols., 2012). En pacientes con CU refractaria a corticosteroides, el tratamiento con adalimumab muestra una eficacia superior en la inducción y mantenimiento de la remisión de la enfermedad (Reinisch y cols., 2011; Sandborn y cols., 2012).

La principal característica de certolizumab-pegol es que no es un anticuerpo completo, sino que carece de la parte Fc y forma un complejo Fab'-pegolizado (Nesbitt y cols., 2007). Distintos estudios controlados con certolizumab, demuestran que es activo por vía subcutánea frente a la



inducción y mantenimiento de EC moderada a severa y que no ha sido controlada con otros agentes anti-TNF- α (Feagan y cols., 2009). Golimumab, en cambio, es uno de los anticuerpos aprobado especialmente para el tratamiento de la CU severa, con una mejora de la fase activa y del mantenimiento de la enfermedad, así como un incremento de la cicatrización intestinal con respecto a placebo (Sandborn y cols., 2014).

En cuanto a la eficacia comparada de estos anticuerpos en la EC, infliximab muestra mejores resultados en la remisión, mientras que adalimumab parece ser más efectivo en la terapia de mantenimiento. En el caso de la CU, no existen diferencias entre los tratamientos, por lo que la elección de uno u otro depende de los costes, seguridad, vía de administración y preferencias del paciente (Martínez-Montiel y cols., 2015).

II.1.3.7. Antagonistas de integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$

La terapia biológica ha permitido el desarrollo de nuevas alternativas farmacológicas centradas en la inhibición de la infiltración leucocitaria, como los antagonistas de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$, que al unirse a las moléculas de adhesión vasculares (VCAM) y vasculares de mucosa (MadCAM), median la interacción entre células endoteliales y linfocitos T.

Natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$, y ha dado resultados prometedores en la remisión y mantenimiento en EC, sobretodo en pacientes con altos niveles de proteína C reactiva. Sin embargo, su uso incrementa el riesgo de padecer una leucoencefalopatía múltiple progresiva, debido a la reactivación del poliomavirus (virus JC) en pacientes seropositivos, por lo que se utiliza como tratamiento de segunda



línea, una vez considerada incluso la terapia anti-TNF- α (Chandar y cols., 2015).

Recientemente, la aprobación de un nuevo antagonista específico de la integrina $\alpha 4\beta 7$, vedolizumab (MNL0002), ha supuesto un avance en el tratamiento tanto de la EC como de la CU, ya que proporciona un efecto beneficioso en la inducción de la remisión de ambas enfermedades. Este fármaco solamente interactúa con MadCAM-1, por lo que su acción sólo se limita al intestino. No obstante, se necesitan estudios a largo plazo para examinar la eficacia en la EII (Chandar y cols., 2015).

II.1.3.8. Otros nuevos tratamientos

- Terapia celular

Existen dos tipos de terapias celulares en estudio para el tratamiento de la EII: el trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas (CMH) y de células madre mesenquimales (CMM). Recientemente se ha publicado un ensayo clínico que indica que el trasplante de CMH parece ser efectivo en EC, induciendo la cicatrización intestinal y cuyo efecto se mantuvo durante un año (Hawkey y cols., 2013). Por otra parte, las CMM poseen características regeneradoras e inmunomoduladoras, propiedades potencialmente beneficiosas para el tratamiento de la EII. Estudios en humanos han demostrado que la inyección de CMM en fístulas secundarias a la EC estimula el proceso de cicatrización de heridas (Ciccocioppo y cols., 2011) y presenta una tendencia a reducir la población total de CD4⁺ y aumentar la de los CD4⁺ CD27⁺ reguladores (Duijvestein y cols., 2010). Estas terapias parecen ser prometedoras, pero se necesitan un número más elevado de ensayos clínicos para establecer su eficacia y su seguridad.



- **Ustekinumab**

El ustekinumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea la actividad de IL-12 e IL-23. Actualmente se encuentra en fase de ensayo clínico III, y en anteriores estudios ha demostrado una mejora en la inducción de la remisión de la EII, y la seguridad parece ser similar a los demás agentes biológicos (Benson y cols., 2011).

II.2. CCR ASOCIADO A CU

El descubrimiento de Crohn y Rosenberg en 1925 (Crohn, 1925) del primer caso de adenocarcinoma asociado a CU conlleva a la aceptación actual de que los pacientes con EII a largo plazo tienen un mayor riesgo de sufrir CCR (Grivennikov, 2013). Aunque el porcentaje de CCR asociado a CU representa una pequeña proporción respecto a los casos totales de CCR, este tipo de cáncer es muy agresivo, con una alta morbilidad y mortalidad. La inflamación crónica juega un importante papel en algunos tumores, siendo un factor clave en el CCR asociado a colitis, el cual aparece tras una progresión del epitelio inflamado no neoplásico a displasia y finalmente se convierte a carcinoma.

II.2.1. Factores de riesgo

El conocimiento de los factores de riesgo para CCR asociado a CU es importante para seleccionar aquellos pacientes con EII que necesitan un especial control. A continuación se citan los más relevantes:

- *Duración de la enfermedad.* El aumento de la probabilidad de padecer CCR y el tiempo que transcurre desde el comienzo de la CU es directamente proporcional (Eaden y cols., 2001). Sin embargo, estudios



más recientes en diferentes países europeos (Rutter y cols., 2006; Söderlund y cols., 2009), muestran que la incidencia de CCR está decreciendo en los últimos años debido a un mejor control de la enfermedad, con tratamientos más efectivos, un mayor número de colonoscopias de seguimiento e incluso cirugías en casos necesarios.

- *Extensión y localización de la enfermedad.* La incidencia de CCR en pacientes con pancolitis, una colitis de carácter extenso, es superior al total de pacientes con CU. Además, se ha observado que la colitis localizada en la parte izquierda presenta un riesgo moderado, y los pacientes con proctitis y sigmoiditis tienen un riesgo similar a los pacientes sanos (Eaden y cols., 2001; Söderlund y cols., 2009; Jess y cols., 2012).
- *Colangitis esclerosante primaria (CEP).* En pacientes con EII que sufren CEP, una enfermedad hepática colestática crónica, el riesgo de sufrir CCR es 4,8 veces superior a los pacientes con CU sin CEP (Soetikno y cols., 2002).
- *Otros factores.* La inflamación continua y repetida provoca cambios en la mucosa intestinal, que pueden derivar en lesiones cancerosas. El estrés oxidativo, o las variaciones en la composición de la microbiota intestinal, también incrementan el riesgo de sufrir a la larga CCR (Hussain y cols., 2003; Hofseth y cols., 2003; Westbrook y cols., 2009). Otros estudios poblacionales han relacionado el riesgo de CCR con el estilo de vida (Poullis y cols., 2004; Mawdsley y Rampton, 2005; Huxley y cols., 2009).

II.2.2. Tratamiento

El tratamiento del CCR asociado a CU sigue el mismo protocolo que el CCR asociado a otras causas. La cirugía es siempre la primera opción.



Dependiendo del estadio, se realiza una escisión simple en el caso de un estadio 0, o ya una resección y anastomosis a partir de los estadios I al IV (Nagtegaal, 2015). En el estadio II se considera la introducción de la quimioterapia. Los fármacos antineoplásicos utilizados son 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecan, capecitabina y oxiplatino, administrados solos o en combinación (FOLFOX CAPOX), además de terapia biológica (Stintzing, 2014). Actualmente se está planteando el uso de tratamiento neoadyuvante anterior a la cirugía (Nussbaum y Altomare, 2015). En todos los casos se utiliza terapia paliativa para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

II.2.2.1. Quimioprevención

Las terapias que pueden ser usadas para la prevención de CCR son medicamentos que inhiben la inflamación. De esta manera, el uso de fármacos antiinflamatorios en pacientes con EII no solo trata la enfermedad en su forma crónica, sino que también podría prevenir el desarrollo de CCR asociado a colitis. Sin embargo, aunque algunos estudios apoyan este concepto, la evidencia es contradictoria, debido a las diferentes formas de diseño de los estudios.

- Aminosalicilatos

El uso de los aminosalicilatos es una parte integral de la terapia farmacológica de la EII, puesto que es un tratamiento barato y seguro. Además, distintos estudios han demostrado que el uso de mesalazina o sulfasalazina reduce la aparición de CCR en pacientes con EII tras años de tratamiento (Eaden, 2003), resultados apoyados con estudios con animales, donde la administración de 5-ASA inhibe el desarrollo de tumores



intestinales (Clapper y cols., 2008). Aunque algunos trabajos no son capaces de reproducir estos efectos, la mayoría de los estudios encuentran que al menos, mesalazina, presenta este efecto protector, lo que podría indicar un posible tratamiento para la prevención del CCR asociado a CU.

- **Ácido ursodesoxicólico**

Este fármaco se utiliza para el tratamiento de las manifestaciones hepáticas en la CEP, pero se ha visto que en pacientes con CU podría prevenir la aparición de CCR asociado a colitis, al compararse con pacientes que no están siendo tratados con ácido ursodesoxicólico. El mecanismo por el cual presenta este efecto es desconocido, pero parece ser que actúa como un agente antioxidante (Pardi y cols., 2003; Ikegami y Matsuzaki, 2008). Aun así, son necesarios más estudios para determinar el efecto beneficioso de este fármaco (Eaton y cols., 2011).

- **Glucocorticoides**

El uso de corticoides como tratamiento preventivo de CCR asociado a colitis está muy poco estudiado, debido a que el uso prolongado de éstos se asocia a la aparición de numerosos efectos adversos. Algunos autores demuestran que el uso combinado de corticoides e inmunosupresores reduce la aparición de CCR en pacientes con CU, pero se necesita nuevos estudios para evaluar su efecto protector.

- **Agentes biológicos**

Desafortunadamente, no existen datos sólidos sobre las propiedades preventivas de los anticuerpos neutralizantes frente a CCR asociado a colitis. Algunos estudios en animales muestran que infliximab reduce la



aparición de tumores en un modelo de ciclos repetidos de DSS (Lopetuso y cols., 2013), y observan en un estudio retrospectivo, que el número de pacientes con EII tratados con infliximab que desarrollaron CCR fue menor al que se esperaba (Biancone y cols., 2007). Otros posibles candidatos, tocilizumab o bevacizumab, se han incorporado recientemente al mercado para el tratamiento de EII, lo que hace imposible disponer de datos epidemiológicos que avalen este efecto protector.

II.3. TERAPIAS ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO DE LA EII Y CCR

Tal y como se ha explicado anteriormente, existe una gran variedad de tratamientos para el manejo de la EII, pero en muchas ocasiones los pacientes son refractarios o sufren efectos adversos asociados a estos fármacos. Este hecho ha provocado un incremento en el uso de opciones terapéuticas alternativas o coadyuvantes. Los tratamientos basados en productos naturales representan una parte de estas terapias, y han cobrado especial relevancia en los últimos años debido a su alta seguridad y su eficacia comprobada en un gran número de ensayos clínicos.

II.3.1. Productos de origen natural

Existe un gran número de artículos enfocados a la recopilación del uso de los productos de origen natural en el tratamiento de la EII y CCR (Recio y cols., 2012; Triantafyllidi y cols., 2015; Langhorst y cols., 2015). En la presente revisión se detallarán los últimos estudios clínicos en los que se determina el efecto antiinflamatorio y antitumoral de los compuestos más utilizados como terapia alternativa en estas patologías.



II.3.1.1. Curcumina

Curcumina es un compuesto polifenólico (diferuloilmetano) presente en las raíces de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), responsable de la coloración amarillenta de la cúrcuma, especie ampliamente utilizada como colorante y para la preparación de especias. Este compuesto ha cobrado especial importancia en los últimos años debido a sus beneficiosas propiedades. El efecto antiinflamatorio de curcumina se ha demostrado en numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Jian y cols., 2005; Camacho-Barquero y cols., 2007; Sánchez-Muñoz y cols., 2008; Larmonier y cols., 2008; Epstein y cols., 2010; Liu y cols., 2013), actuando sobre diversos mecanismos implicados en la respuesta inflamatoria, por lo que se ha propuesto como un agente terapéutico en numerosas enfermedades inflamatorias, como la EII. Actualmente, se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos con curcumina (Vecchi Brumatti y cols., 2014), y se ha publicado un reciente ensayo multicéntrico, doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo donde se ha investigado la eficacia de curcumina en la inducción de remisión en pacientes con CU activa moderada. Se eligieron 50 pacientes que no respondieron a dos semanas de tratamiento a la dosis máxima de mesalazina o terapia biológica. Los tratamientos consistieron en placebo o una dosis diaria de 3 g de curcumina encapsulada durante un mes, más el tratamiento continuado de mesalazina. El objetivo primario fue la remisión a nivel endoscópico y una reducción de los síntomas en cuatro semanas. De los pacientes tratados con curcumina, 14 (56%) mostraron una remisión clínica en la cuarta semana, en comparación con ninguno de los pacientes que recibieron placebo. La respuesta clínica se observó en 17 pacientes tratados con curcumina, frente



a tres de los tratados con placebo. La remisión endoscópica se identificó en ocho de los 22 pacientes tratados con curcumina, mientras que los tratados con placebo no presentaron ninguna mejora. Los efectos adversos fueron poco frecuentes y comparables entre ambos grupos. Por tanto, los investigadores concluyeron que la adición de curcumina junto con el tratamiento con mesalazina mejora la remisión en pacientes con CU activa moderada, y se presenta como una opción terapéutica segura y efectiva en el tratamiento de la CU (Lang y cols., 2015).

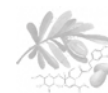
La actividad antitumoral de curcumina está perfectamente establecida en modelos animales de distintos tipos de cáncer: CCR, pancreático, de pulmón, entre muchos otros. Además, curcumina se presenta como un potencial compuesto para el tratamiento antineoplásico debido a la habilidad que posee de eliminar las células cancerígenas de forma selectiva, sin apenas toxicidad para el resto de células (Ravindran y cols., 2009), y sus efectos adversos son mínimos tanto en animales como en humanos. De hecho, se han realizado distintos estudios piloto a diferentes dosis de curcumina, determinando tanto las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de este compuesto, así como su carácter protector en el desarrollo de CCR. (Sharma y cols., 2001, 2004; Garcea y cols., 2005; Cruz-Correa y cols., 2006). Estudios clínicos más recientes han observado que en pacientes fumadores, curcumina reduce la aparición de focos de criptas aberrantes, (FCA) precursores de pólipos colorrectales. En este ensayo, 44 pacientes fumadores tomaron curcumina 2 y 4 g/día durante 30 días. La dosis superior del tratamiento redujo la formación de FCA, sin embargo, el mecanismo por el cual curcumina ejerce este efecto es desconocido, por lo que se necesitan más estudios para



evidenciar la actividad anticancerígena a este nivel (Carroll y cols., 2011). Se ha publicado otro ensayo donde curcumina se administró a pacientes con CCR diagnosticado pero antes de la cirugía. La dosis elegida fue 360 mg en cápsula tomada tres veces al día durante 10-30 días. Curcumina incrementó el peso, redujo los niveles de TNF- α en suero y aumentó el número de células apoptóticas así como la expresión de p53 en el tejido. Los autores de este estudio concluyeron que curcumina puede mejorar la salud en general de los pacientes con CCR vía la activación de p53 (He y cols., 2011). Actualmente se está llevando a cabo un nuevo estudio en que se combina el tratamiento de curcumina con quimioterapia (5-FU, oxiplatino y ácido folínico) en pacientes con CCR que presentan una metástasis hepática inoperable. Este ensayo clínico se divide en dos fases, la fase I, donde se determina la dosis aceptable de curcumina, seguido por la fase II, donde se realizará un estudio abierto controlado y aleatorizado para determinar la eficacia de la combinación en este tipo de cáncer metastásico (Irving y cols., 2015).

II.3.1.2. Resveratrol

A la fitoalexina polifenólica resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-*trans*-estilbeno), presente en los cacahuetes, uvas y vino tinto, se le atribuyen numerosas propiedades farmacológicas. Resveratrol actúa como agente antiinflamatorio en numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* (Jang y cols., 1997; De la Lastra y Villegas, 2005; Birrell y cols., 2005; Martín y cols., 2006). Se ha comprobado el efecto protector de resveratrol sobre la mucosa intestinal, a través de numerosos estudios en cultivos celulares relacionados directamente con la respuesta inflamatoria y el epitelio intestinal y en diferentes modelos de inflamación intestinal, convirtiéndolo



en un prometedor candidato en el tratamiento de la EII en humanos (Singh y cols., 2012). Sin embargo, hasta el momento sólo se ha realizado un ensayo clínico doble ciego, controlado con placebo y aleatorizado, donde se ha determinado el efecto de resveratrol en pacientes con CU activa leve a moderada. Para ello, 50 pacientes se distribuyeron en dos grupos, unos se suplementaron con una cápsula al día de 500 mg de resveratrol por vía oral, otros con placebo, durante seis semanas. Tanto al inicio como al final del experimento, se registraron marcadores séricos inflamatorios, la activación de NF- κ B en células polimorfonucleares de sangre periférica (CPSP) y la calidad de vida de los pacientes sujetos al estudio. Los resultados mostraron que resveratrol reduce los niveles de TNF- α y proteína C reactiva de alta sensibilidad de forma significativa e inhibe la vía NF- κ B en CPSP, mientras que estos cambios no se han observado en el grupo placebo. A su vez, el IAE en el grupo tratado con resveratrol disminuye con respecto al placebo, concluyendo que el suplemento con resveratrol aumenta la calidad de vida y reduce la inflamación en pacientes con CU (Samsami-Kor y cols., 2015).

Resveratrol ha demostrado también efectos anticancerígenos en estudios *in vitro* e *in vivo* (Núñez-Sánchez y cols., 2015). El mecanismo por el cual resveratrol tiene actividad anticancerígena *in vivo* incluye la regulación de la señalización apoptótica, del ciclo celular, marcadores inflamatorios y vías de señalización. Sin embargo, se han llevado a cabo muy pocos ensayos que demuestren el efecto de resveratrol en humanos, algunos de ellos, además, no son estudios aleatorizados y/o controlados (Nguyen y cols., 2009; Patel y cols., 2010). Hay un ensayo clínico donde se observó el efecto de una formulación micronizada de resveratrol en



pacientes con metástasis hepática de CCR. Este estudio sí fue aleatorizado y controlado con placebo. Previamente a la operación, se administró a 52 pacientes 5 g de esta formulación o placebo. Se observó un aumento de caspasa-3 activa en tejido tumoral hepático, pero sin cambios en otros marcadores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), prostaglandina (PG)E₂, survivina, Bcl-2 o Bax, entre otros. Tampoco se observaron efectos adversos (Howells y cols., 2011).

II.3.1.3. Polifenoles del té verde

El té verde o *Camellia sinensis* (L. Kuntze) (Theaceae) es una planta de origen asiático cuya hoja se utiliza desde la antigüedad por sus efectos beneficiosos para la salud, generalmente en forma de infusión. El extracto de la hoja de té verde contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, que incluyen flavonoles, flavandioles y ácidos fenólicos. Las catequinas son las responsables de las numerosas propiedades que se le atribuyen a la hoja de té, siendo las cuatro principales epicatequina, epigalocatequina, galato de 3-epicatequina y galato de 3-epigalocatequina (EGCG) (Singh y cols., 2010). Esta última es la más abundante, y ha demostrado actividad antiinflamatoria y anticancerígena en numerosos modelos celulares y animales (Singh y cols., 2010; Jin y cols., 2013; Oh y cols., 2014).

El efecto antiinflamatorio tanto del extracto de té verde, como de EGCG ha sido comprobado en modelos animales de inflamación intestinal. Sin embargo, se postula que este efecto protector sólo se presenta en dosis bajas, ya que a dosis altas, ambos pueden agravar la situación y exacerbar la colitis en animales (Martin y Bolling, 2015). Además, los ensayos clínicos llevados a cabo con el objetivo de extrapolar estos resultados a humanos



son escasos. Se realizó un estudio caso-control multicéntrico en China con 1308 pacientes con CU, en el que se observó que el consumo de té protegía frente a la inflamación intestinal (Wang y cols., 2013). Recientemente se ha publicado un estudio piloto doble ciego controlado con placebo, en el que durante 56 días, 20 pacientes con CU moderada tomaron diariamente en varias dosis Polyphenon E, correspondiente a 400 o 800 mg de EGCG, o placebo. Al final del tratamiento, la remisión de los síntomas de la CU activa fue del 53% en el grupo tratado respecto al grupo placebo, indicando un beneficio terapéutico de Polyphenon E en pacientes refractarios a 5-ASA o azatioprina (Dryden y cols., 2013).

El efecto antitumoral de EGCG se ha descrito en varios trabajos (Khan y Mukhtar, 2010), sin embargo, en estudios clínicos no hay una evidencia epidemiológica demostrada entre el hábito de tomar té y la prevención de cáncer en humanos. Algunos estudios señalan que no existe una relación estadísticamente significativa entre ambos (Lee y cols., 2007; Suzuki y cols., 2009), de hecho, un estudio clínico asocia un incremento del riesgo de CCR con el consumo de té en varones (Sun y cols., 2007), pero por otra parte, otras publicaciones confirman la reducción del riesgo de CCR mediante el consumo de té. Entre estos últimos, se encuentra un reciente estudio cohorte que investigó la asociación de consumo de té con la incidencia de cánceres a nivel digestivo en 69.310 mujeres chinas no fumadoras, no bebedoras y de mediana-alta edad. Se observó una relación inversa en CCR, de estómago y de esófago (Nechuta y cols., 2012).

La inconsistencia de resultados en el tratamiento con EGCG es debida probablemente a varios factores que inducen a confusión, como el tiempo, la calidad y cantidad de té consumido, la presencia de otros compuestos



como la cafeína que pueden enmascarar resultados, y la pobre biodisponibilidad de EGCG, ya que la concentración alcanzada en plasma es muy inferior a la utilizada en cultivos celulares (Nagle y cols., 2006). Por eso, una manera de minimizar todas estas limitaciones es mediante el uso de estudios de intervención clínica más controlados, así como la utilización de un extracto de té verde mejorado y completamente estandarizado. Es el caso de un estudio clínico llevado a cabo por Stingl y cols. (2011) de carácter multicéntrico, controlado por placebo, aleatorizado y de una duración de tres años. En este, 2.534 pacientes de CCR a los que se les iba a realizar una polipectomía recibieron un extracto descafeinado de té verde que contiene exactamente 150 mg de EGCG dos veces al día, o placebo. El tratamiento empezó un mes antes de la intervención, y al final del experimento se compararon las diferencias entre ambos grupos en cuanto a la incidencia, el número y la histología de los adenomas. Hasta el momento, no hay constancia de la publicación de los resultados obtenidos en este ensayo.

II.3.1.4. Otros productos y extractos de plantas

Además de productos aislados, extractos de plantas han sido también estudiados en el tratamiento de la EII y CCR. Algunos de ellos se recogen en distintas revisiones (Recio y cols., 2012; Triantafyllidi y cols., 2015; Langhorst y cols., 2015). En las siguientes tablas se resumen los estudios en humanos más recientes llevados a cabo con algunos de productos derivados de plantas para el tratamiento de estas patologías:



Tabla 1. Ensayos clínicos de extractos y productos derivados de plantas en el tratamiento de la EI

PLANTA	PRODUCTO	ENSAYO CLÍNICO	RESULTADOS
<i>Artemisia absinthium</i> L. (Asteraceae)	Extracto seco estandarizado de hojas y tallos	Grupo controlado con placebo y aleatorizado con 20 pacientes con EC tomaron 750 mg de extracto tres veces al día durante 6 semanas (Krebs y cols., 2010)	Reducción de los niveles de TNF- α , remisión de los síntomas y mejora de la calidad de vida de los pacientes
<i>Boswellia serrata</i> Roxb. ex Colebr. (Burseraceae)	Extracto PS0201Bo	Doble ciego, controlado con placebo, aleatorizado y paralelo en 22 centros de Alemania. 108 pacientes con EC, la mitad de ellos recibieron 400 mg tres veces al día durante 52 semanas (Holtmeier y cols., 2011)	Sin diferencias significativas entre los dos grupos
<i>Pistacia lenticus</i> L. (Anacardiaceae)	Resina	Estudio con 10 pacientes con EC y 8 controles que tomaron 6 capsulas al día (0,67 g/capsula) (Kaliora y cols., 2007a)	Reducción de IAE y los niveles de IL-6 y proteína C reactiva en plasma
		Estudio con 10 pacientes con EC y 8 controles que tomaron 6 capsulas al día (0,67 g/capsula) (Kaliora y cols., 2007b)	Reducción de TNF- α y aumento del factor de inhibición de migración de macrófagos en plasma
<i>Tripterygium wilfordii</i> H. (Celastraceae)	Extracto poliglicósido	Estudio con 45 pacientes con EC controlado con mesalazina y aleatorizado durante 12 meses (Tao y cols., 2009)	No se observaron diferencias en cuanto a la aparición de relapsos entre ambos grupos
		Estudio con 39 pacientes con EC enterocolostomizados, controlado con sulfasalazina y aleatorizado durante 52 semanas (Liao y cols., 2009)	Prevención de recurrencias en pacientes con EC postoperados



Tabla 2. Ensayos clínicos de extractos y productos derivados de plantas en el tratamiento del CCR

PLANTA	PRODUCTO	ENSAYO CLÍNICO	RESULTADOS
Bayas de <i>Rubus idaeus</i> L. (Rosaceae)	Extracto rico en antocianidinas de frambuesas negras	Estudio con 20 pacientes con CCR tomaron 60 g/día de un extracto de frambuesas durante 9 semanas (Wang y cols., 2011)	Desmetilación de genes y reducción de otros marcadores tumorales
		Estudio aleatorizado donde 24 pacientes con CCR recibieron 20 g de extracto tres veces al día durante 9 semanas (Mentor-Marcel y cols., 2012)	Reducción de IL-8, GM-CSF y de marcadores de proliferación.
	Preparado oral y supositorio de extracto de frambuesa negra	Estudio aleatorizado controlado con placebo. Durante 9 meses, 14 pacientes tomaron el extracto: vía rectal, y vía oral y rectal (Wang y cols., 2014)	Reducen los pólipos en pacientes con poliposis adenomatosa familiar
<i>Zingiber officinale</i> Rosc. (Zingiberaceae)	Extracto del rizoma	Estudio aleatorizado, controlado con placebo de 20 voluntarios sanos con riesgo normal y alto de CCR. Tratamiento: 2 g de extracto durante 28 días (Jiang y cols., 2013)	Reducción de la expresión de COX-1 en pacientes con alto riesgo
		Estudio aleatorizado, controlado con placebo de 20 voluntarios sanos con riesgo normal y alto de CCR. Tratamiento: 2 g de extracto durante 28 días (Citronberg y cols., 2013)	Reducción de la telomerasa transcriptasa inversa humana en pacientes tratados



II.4. OLEUROPEINA

II.4.1. Generalidades

Oleuropeina es un secoiridoide fenólico glucosilado del éster del ácido elenólico con 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol). Es el compuesto fenólico más abundante en las hojas del olivo y, aunque se encuentra también en sus frutos, su concentración varía según la fase de maduración. Se distinguen tres fases de maduración del fruto: la fase de crecimiento, en la que la concentración de oleuropeina puede ser máxima, alcanzando el 14% de materia seca; la fase de maduración verde, donde la cantidad de clorofila y oleuropeina va disminuyendo; y finalmente, la fase de maduración negra, que se caracteriza por la aparición de antocianinas y donde oleuropeina decae hasta valores muy bajos y aumentan sus derivados, debido a su hidrólisis enzimática, junto con la acción de las glucosidasas y esterasas (Gariboldi y cols., 1986; Amiot y cols., 1989; Malik y Bradford, 2006; Ryan y cols., 1999). Fue descrito en 1908 por Bourquelot y Vintilesco, e investigado por primera vez por Panizzi y cols., en 1960, que demostraron el efecto antihipertensivo del producto aislado de las hojas del olivo (El y Karakaya, 2009).

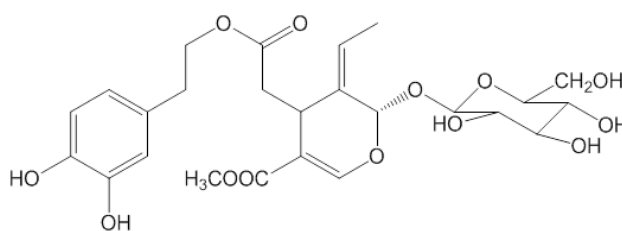


Figura 2. Estructura química de oleuropeina



II.4.2. Absorción y metabolismo

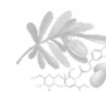
Aunque el metabolismo y la biodisponibilidad de oleuropeina no se han elucidado completamente, diferentes estudios han demostrado que oleuropeina llega intacta hasta el intestino grueso, ya que la parte glucosídica protege a la molécula de la degradación en el medio ácido del estómago (Vissers y cols., 2002; Corona y cols., 2006). Oleuropeina es degradada en el colon por la microflora y se libera hidroxitirosol como producto final mayoritario (Corona y cols., 2006, 2009). Mosele y cols. (2014) han confirmado la rotura del enlace con el azúcar y la posterior hidrólisis a hidroxitirosol y derivados, y Santos y cols. (2012) postularon que bacterias comunes en el colon humano, como *Enterococcus* o *Bifidobacterium*, son capaces de hidrolizar oleuropeina a hidroxitirosol.

II.4.3. Propiedades farmacológicas

El extracto de la hoja de olivo se ha utilizado en la medicina tradicional en múltiples afecciones, e incluso existen preparaciones comercializadas. Es por eso, que el estudio del efecto farmacológico de oleuropeina en diferentes modelos animales y celulares se ha incrementado en los últimos años. Muchas de sus propiedades son debidas en parte, a su elevada capacidad antioxidante y antiinflamatoria, aunque también se le atribuyen otros efectos que cabe destacar. A continuación se recogen los estudios realizados con oleuropeina, en algunos casos con su genina, y con extractos del fruto y la hoja de olivo.

II.4.3.1. Actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se producen de manera fisiológica en los procesos metabólicos. Por definición, el estrés oxidativo



surge de un desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad del organismo para eliminar estas especies o reparar el daño producido por ellas. Estas especies pueden reaccionar con componentes celulares como ADN, lípidos o proteínas y producir el llamado daño oxidativo, que si persiste, puede desencadenar un proceso inflamatorio y provocar la pérdida de la función celular. Los lípidos son especialmente sensibles al daño oxidativo, y tras reaccionar con las EROs, promueven la oxidación de los lípidos adyacentes hasta que un compuesto antioxidante detenga este ciclo (Charoenprasert y Mitchell, 2012). Los compuestos fenólicos actúan como agentes antioxidantes al donar un radical hidrógeno a los radicales alquilperóxidos generados por la oxidación lipídica y formar especies estables durante esta reacción. De hecho, la habilidad para ceder este radical se incrementa con el número de grupos hidroxilos presentes en el anillo fenólico, e incluso esta capacidad antioxidante es mayor cuando los sustituyentes donantes de electrones se encuentran en posición *orto* (*o*-difenoles), ya que tienden a debilitar la unión del hidroxilo fenólico y proporcionan mayor estabilidad al radical fenoxilo (Servili y cols., 2009). Tanto oleuropeina como su derivado, hidroxitirosol, presentan estos grupos, confiriéndoles una alta capacidad para captar radicales libres. El poder antioxidante de oleuropeina se ensayó *in vitro* mediante el test del radical 2,2-difenilo-1-picrilhidracilo (DPPH), y es similar al ejercido por el ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E) (Visioli y cols., 1998). Además, oleuropeina actúa como un potente inhibidor de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por sulfato de cobre (Visioli y Galli, 1994). En estudios en conejos alimentados con una dieta suplementada con oleuropeina, se observó que este compuesto reduce los niveles plasmáticos de colesterol total, libre y esterificado e incrementa la



resistencia a la oxidación de las LDL (Coni y cols., 2000). Por otra parte, se demostró que oleuropeina inhibe la peroxidación lipídica (Visioli y cols., 1995). También reduce la liberación de ácido hipocloroso (HClO) (Visioli y cols., 1998) y óxido nítrico (NO) (De la Puerta y cols., 2001). Por último, estudios en humanos realizados por Visioli y cols. (2000) demostraron que la administración de oleuropeina en voluntarios sanos disminuye la eliminación en orina de 8-iso-PGF₂ α , un producto derivado de la oxidación lipídica.

II.4.3.2. Actividad antiinflamatoria

El efecto sobre mediadores proinflamatorios de oleuropeina ha sido evaluado en diferentes procedimientos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*. De la Puerta y cols. (1999) demostraron que oleuropeina inhibe las enzimas 5-lipooxigenasa (5-LO) y COX-2, además de presentar propiedades antioxidantes en leucocitos estimulados con acetato de forbol miristato (PMA). Similares resultados han encontrado Ryu y cols. (2015), observando que al tratar con oleuropeina los macrófagos RAW 267.4 estimulados con LPS, se reduce la activación de numerosas vías de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria, así como la liberación de citocinas y la expresión de COX-2 o iNOS.

Los estudios *in vivo* utilizados para determinar el efecto antiinflamatorio de oleuropeina son muy variados, y van desde procesos agudos a crónicos. En un modelo de pleuritis aguda inducida por carragenina, oleuropeina reduce la infiltración celular y la expresión de moléculas de adhesión como P-selectina o intercelulares (ICAM-1), inhibe la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β y disminuye



los niveles de nitritos en los exudados pulmonares. Además, atenúa la peroxidación lipídica y la activación de la polimerasa Poli-ADP ribosa (PARP) (Impellizzeri y cols., 2011a).

Oleuropeina también ha demostrado actividad protectora en un modelo de osteoporosis inducida por inflamación. El fallo gonadal debido al periodo menopáusico causa osteopenia en mujeres, y con la edad, las condiciones inflamatorias y oxidantes empeoran, provocando que el cuerpo sea incapaz de eliminar los radicales libres y prevenir la inflamación. Puel y cols. (2004) demostraron que oleuropeina reduce los signos de inflamación en un modelo de inflamación crónica inducida por inyecciones subcutáneas de talco en ratas ovariectomizadas, y a su vez, ofrece protección frente a la pérdida de masa ósea.

La artritis inducida por colágeno tipo II reproduce de manera similar la artritis reumatoide en humanos, una enfermedad autoinmune de carácter crónico, con activación inmunológica tanto humoral como celular. La administración intraperitoneal de la genina de oleuropeina reduce el edema, la infiltración celular y la erosión del hueso y del cartílago en la articulación tibiotarsal. Además, inhibe la expresión de marcadores proinflamatorios como citocinas, quimiocinas, COX-2 o iNOS entre otros, y es capaz de retrasar el desarrollo de la artritis al administrarse como post-tratamiento (Impellizzeri y cols., 2011b). También se determinó su efecto frente al daño medular traumático en ratones. En este tipo de patologías, la muerte neuronal no sólo se produce durante el momento del trauma, sino que puede continuar hasta 24 h después. Este proceso se conoce como daño secundario, que se amplifica en parte, debido a la presencia de una fuerte respuesta inflamatoria local (Profyris y cols., 2004). La genina reduce



la activación de distintas vías de señalización implicadas en la inflamación y, por tanto, inhibe la expresión de numerosos mediadores, como iNOS o citocinas, restaura los niveles de la proteína cinasa A, un conocido inhibidor de la vía NF- κ B, y modula la muerte celular debida al daño, reestableciendo los mecanismos implicados en la apoptosis a sus niveles basales. Además, incrementa los niveles del factor neurotrópico derivado de las células gliales, que promueve la supervivencia de distintas poblaciones neuronales, por lo que además de su efecto antiinflamatorio, deja entrever un efecto neuroprotector del que se tratará más adelante (Impellizzeri y cols., 2012).

Por otra parte, extractos que contienen oleuropeina han sido probados en modelos inflamatorios. Existen diferentes estudios que avalan el efecto protector de los polifenoles presentes en el aceite de oliva en diferentes modelos de inflamación intestinal. Entre ellos, se ha determinado la actividad antiinflamatoria de una fracción polifenólica modificada del aceite de oliva en un modelo de colitis crónica inducida por DSS en ratones, siendo la genina de oleuropeina uno de los componentes representativos del extracto. La inhibición de las vías NF- κ B y MAPK parece ser el punto clave en la protección frente a la inflamación intestinal inducida por DSS (Sánchez-Fidalgo y cols., 2013).

II.4.3.3. Actividad antitumoral

El ensayo de compuestos fenólicos como coadyuvantes en el tratamiento contra el cáncer ha experimentado un aumento notable en los últimos años, debido a su habilidad para modular distintas vías de señalización implicadas en la carcinogénesis (Ding y cols., 2013; Lall y cols., 2015). Oleuropeina ha demostrado un potente poder antitumoral en



numerosas líneas celulares. Se observó que este compuesto es capaz de inhibir el crecimiento celular inducido por 17- β -estradiol en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, mediante la inactivación de la vía de las proteínas cinasas reguladoras de señales extracelulares (ERK1/2) (Sirianni y cols., 2010). Otros estudios han demostrado que el tratamiento con oleuropeina produce una activación de p53 y reduce la expresión de la subunidad 1 α del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) en células HT-29. El factor p53 está implicado en la inducción de la apoptosis y en el control de la angiogénesis, posiblemente mediante la represión de HIF-1 α , un activador de la transcripción génica encargado de estimular la angiogénesis en procesos cancerosos (Cárdeno y cols., 2013). El tratamiento de células HeLa (línea celular cancerígena de ovario proveniente de Henrietta Lacks) con oleuropeina detiene el ciclo celular en la fase G₂/M y una apoptosis celular dosis-dependiente. Adicionalmente, la activación de la vía de las proteínas cinasas c-Jun N-terminal (JNK) parece ser crucial para la inducción de la apoptosis en este tipo celular (Yao y cols., 2014).

El efecto proapoptótico y antiproliferativo de oleuropeina se ha determinado también en células leucémicas humanas HL60, donde ejerce protección frente al daño de ADN inducido por H₂O₂ (Anter y cols., 2011). Acquaviva y cols. (2012) demostraron que oleuropeina puede inducir la apoptosis de células tumorales mediante la inhibición de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt, una vía de señalización celular implicada en la supervivencia y crecimiento celular y sobreactivada en células cancerígenas prostáticas andrógeno-independientes; por otra parte, oleuropeina también provoca necrosis en células tumorales de próstata y su citotoxicidad se debe, en parte, al incremento del estrés oxidativo en las



células, ya que induce la producción de EROs en la línea celular tumoral prostática DU145. En el mismo estudio se observó que oleuropeina también actúa como agente antioxidante en células epiteliales de hiperplasia benigna de próstata BPH-1, indicando una actividad dual relacionada con los factores intracelulares inducibles presentes en las células benignas. Esta característica se ha reproducido en un trabajo realizado por Elamin y cols. (2013), donde oleuropeina desencadena la muerte celular programada a través de la vía mitocondrial en la línea celular de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231, incrementando la expresión de caspasa-3 y de Bax, así como disminuyendo Bcl-2 y survivina, pero no se vio afectada la línea celular epitelial no tumoral MCF-10A. Además, se observa un retraso de la fase S del ciclo celular. Recientemente se ha visto que oleuropeina puede unirse al receptor acoplado a proteína G (GPR30), activarse y desencadenar la apoptosis en células SKBR3 ER-negativas, y evitar así la resistencia al tamoxifeno, frecuente en este tipo de cánceres. Este efecto se relaciona con una activación sustancial de la vía ERK1/2 y una acumulación de la forma activada en el núcleo, que transmite señales antiproliferativas y apoptóticas (Chimento y cols., 2014).

El efecto antitumoral de oleuropeina se ha evaluado también en distintos modelos *in vivo*. Hamdi y Castellón (2005) observaron que la administración de oleuropeina reduce el crecimiento, la movilidad y la invasión tumoral. Además, debido al efecto disruptor que ejerce sobre el citoesqueleto de las células tumorales, reduce la aparición de sarcomas en ratones Swiss. Kimura y Sumoyoshi (2009) demostraron en un modelo de fotoenvejecimiento por radiación ultravioleta (UV)-B, que tanto



oleuropeína como el extracto de hoja de olivo previenen el daño y la aparición de tumores en ratones.

Además, cabe mencionar que el extracto de hoja de olivo inhibe la proliferación de una gran variedad de líneas celulares cancerígenas, como línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Han y cols., 2009), células de melanoma B16 (Mijatovic y cols., 2011), células Jurkat (Fares y cols., 2011) o células de glioblastoma humano T98G (Tunca y cols., 2012).

II.4.3.4. Efecto cardioprotector

Las enfermedades cardiovasculares incluyen una serie de patologías del corazón o los vasos sanguíneos, y están íntimamente relacionadas con el estrés oxidativo. De hecho, el elemento más común en estas condiciones fisiopatológicas es la formación de radicales libres por la mitocondria de las células endoteliales y miocárdicas, debido a un aumento de la expresión de la iNOS y un incremento excesivo de la producción de NO que reacciona con moléculas adyacentes. En el caso de isquemia coronaria, el daño producido depende de la severidad, la duración de la isquemia y del mismo proceso de reperfusión, ya que se ha observado que durante los primeros minutos de recuperación del flujo sanguíneo, la reoxigenación provoca el incremento de EROs y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs), aumentando la muerte de cardiomiocitos por necrosis, apoptosis o ambas (Ruiz-Meana y García-Dorado, 2009). El 4-hidroxinonal (4-HNE) es un forma aldehídica obtenida a partir de la oxidación lipídica que puede producir daños irreversibles en los cardiomiocitos, y que en cultivo celular, induce un daño similar al provocado por el proceso de isquemia/reperfusión, activando además la señal apoptótica. En estas



condiciones, se ha demostrado que oleuropeina protege frente a la toxicidad inducida por 4-HNE en células de miocardio de embrión de rata H9c2, inhibiendo las vías proapoptóticas y reduciendo el estrés oxidativo (Bali y cols., 2014). Por otra parte, Manna y cols. (2004) observaron que el tratamiento con oleuropeina protege frente al daño cardíaco inducido por un proceso de isquemia/reperfusión *in vivo*, reduciendo los niveles plasmáticos de diferentes marcadores de fallo cardíaco debido al estrés oxidativo. Similares resultados han obtenido Andreadou y cols. (2006, 2015), indicando que la administración oleuropeina de manera nutricional ejerce un efecto cardioprotector mediante la activación de vías de señalización implicadas en la recuperación celular ante una situación isquémica, y la inhibición del estrés oxidativo durante la reperfusión, además de reducir los niveles plasmáticos de LDL en animales sobrealimentados con colesterol, e incrementar el contenido miocárdico de ATP. Se ha visto que en pacientes con enfermedades cardiovasculares, la actividad de diferentes enzimas encargadas de proteger frente al estrés oxidativo en el miocardio se ve reducida. En un modelo animal de infarto agudo de miocardio inducido por el ligamiento de la arteria coronaria izquierda, se observa un descenso en la expresión de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, y un aumento de los niveles plasmáticos de malondialdehído. Tal y como se confirmó en otros estudios (Jemai y cols., 2008), se sugiere que el efecto cardioprotector de este compuesto se debe en parte, a sus propiedades antioxidantes. Además, oleuropeina mejora la función cardíaca, reduce la extensión de la zona infartada y disminuye los niveles de marcadores séricos de lesión cardíaca como lactato deshidrogenasa o troponina I (Janahmadi y cols., 2015).



Otros estudios realizados por Andreadou y cols. (2007) demostraron también el efecto protector de oleuropeina en un modelo de cardiotoxicidad aguda inducida por doxorubicina, donde el estrés oxidativo también juega un importante papel. El tratamiento con oleuropeina reduce los niveles de marcadores de lipoperoxidación y oxidación proteica del tejido cardíaco tras la administración de doxorubicina, inhibe la expresión de iNOS, y por consiguiente la liberación de NO, y reduce la producción de nitrotirosina. Estos mismos autores han descrito que oleuropeina previene la aparición de cardiomiopatía inducida por la administración crónica de doxorubicina, atenuando las lesiones miocárdicas degenerativas e inflamatorias, reduciendo la inducción de estrés nitro-oxidativo y restaurando la homeostasis de NO. Además, regula la expresión de mediadores proapoptóticos mediante el control de distintas vías de señalización implicadas en la apoptosis, como por ejemplo la vía PI3K/Akt, así como el metabolismo miocárdico (Andreadou y cols., 2014).

Por otra parte, la aterosclerosis es una enfermedad multifactorial, donde la oxidación de LDL y la respuesta inflamatoria juegan un papel muy importante, ya que contribuyen a la formación y el acúmulo de las placas ateroscleróticas o ateromas, que con el tiempo, pueden obstruir las arterias y provocar trastornos circulatorios o cardíacos. Puesto que oleuropeina tiene propiedades tanto antiinflamatorias como antioxidantes, son diversos los estudios llevados a cabo para avalar su efecto antiaterosclerótico. Oleuropeina actúa reduciendo la expresión de VCAM-1 y la activación de las vías de señalización de NF- κ B y AP-1 en células endoteliales de cordón umbilical humanas (Carluccio y cols., 2003). Además, ha demostrado un efecto antiproliferativo en células del músculo liso de aorta, bloqueando el

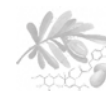


ciclo celular entre la fase G₁ y S mediante la inhibición de la vía ERK1/2 (Abe y cols., 2011).

La comercialización de extractos de hoja de olivo como tratamiento coadyuvante para la hipertensión no es un hecho casual. La administración de un extracto rico en oleuropeína es capaz de reducir los niveles de lípidos y suprimir el desarrollo de la aterosclerosis, reduciendo la expresión de TNF- α , que, a su vez, reduce la expresión de la proteína quimiotáctica monocítica-1 y VCAM (Wang y cols., 2008). Estudios *in vitro* demuestran que un extracto rico en la genina de oleuropeína inhibe la vía de señalización de la fosfodiesterasa en plaquetas humanas aisladas (Dell'Agli y cols., 2008). Distintos estudios en animales revelaron que el tratamiento con extractos de hoja de olivo en ratas hipertensas previene el aumento de la tensión arterial, (Osim y cols., 1999; Khayyal y cols., 2002) la aterosclerosis y además, mejora la resistencia a la insulina (Somova y cols., 2003). Perrinjaquet-Mocchetti y cols. (2008) observaron que tras la administración de un extracto etanólico de hoja de olivo en pacientes gemelos con unos niveles límite de hipertensión, se reducía la presión arterial así como el colesterol en sangre de manera significativa.

II.4.3.5. Efectos neuroprotectores

El cerebro es altamente vulnerable al daño provocado por el estrés oxidativo, puesto que consume el 20% del oxígeno total del cuerpo, contiene una alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y presenta niveles de enzimas antioxidantes más bajos con respecto a otros órganos (Floyd y Hensley 2002; Shulman y cols., 2004). La acumulación de EROs puede provocar el daño o la muerte celular, y desencadenar enfermedades



neurodegenerativas, como es el caso de la enfermedad de Parkinson, que consiste en la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Sarbishegi y cols. (2014) han demostrado que la administración intraperitoneal diaria de oleuropeina durante seis meses aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes en el mesencéfalo de ratas viejas, además de proteger frente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, mostrando un posible efecto protector en la prevención y atenuación de la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por el acúmulo de placas neuríticas extracelulares (formadas por el péptido- β -amiloide) y nudos neurofibrilares intracelulares (cuyo mayor componente es la proteína *tau* hiperfosforilada). Las placas amiloides ($A\beta$) tienden a agregarse formando oligómeros neurotóxicos, que desencadenan una serie de eventos patológicos induciendo la muerte neuronal. Recientes estudios han demostrado los posibles efectos terapéuticos de oleuropeina contra la enfermedad de Alzheimer. Tras haberse demostrado *in vitro* la capacidad para obstaculizar la aparición de agregados prefibrilares oligoméricos, protegiendo las células expuestas al daño por $A\beta$ (Daccache y cols., 2011), Diomedede y cols. (2013) han confirmado *in vivo* que la genina de oleuropeina reduce la agregación amiloide en un modelo de enfermedad de Alzheimer en *Caenorhabditis elegans*; además, sugieren que este efecto es independiente de la capacidad antioxidante de la molécula, interfiriendo directamente en el proceso de agregación, al inhibir la formación de oligómeros tóxicos solubles y fibras amiloides. En otros trabajos se ha observado que la administración de la genina aumenta el proceso de autofagia y reduce la inflamación asociada en distintos modelos animales



de Alzheimer. La autofagia permite la eliminación de A β que se encuentra reducida en esta patología y que junto a un componente inflamatorio, contribuyen a un empeoramiento de las facultades cognitivas en la enfermedad de Alzheimer (Grossi y cols., 2013; Luccarini y cols., 2014). Finalmente, en un reciente estudio se ha demostrado que oleuropeina aumenta la acetilación de histonas 3 y 4, activando la transcripción génica y mejorando los procesos de aprendizaje y de memoria (Luccarini y cols., 2015).

II.4.3.6. Efecto hepatoprotector

A oleuropeina también se le atribuyen efectos hepatoprotectores. Domitrović y cols. (2012) demostraron que este compuesto protege frente a la inflamación y el estrés oxidativo en un modelo de daño hepático inducido por tetracloruro de carbono. La administración de oleuropeina mejora los cambios histopatológicos en el hígado, reduce la activación de NF- κ B, así como la expresión de proteínas implicadas en la inflamación, como COX-2, iNOS o distintas citocinas. Se observó además, un aumento de la activación de mecanismos antioxidantes celulares como la vía del factor nuclear eritrocítico (Nrf)-2, que modula el estado redox de la célula mediante la expresión de múltiples proteínas implicadas en la defensa celular, como es el caso de la hemooxigenasa (HO)-1 (Yang y cols., 2011). Así, oleuropeina aumenta la activación de Nrf-2, y por consiguiente, la expresión de HO-1 en el hígado. Por otra parte, en un modelo de esteatosis hepática, oleuropeina reduce el incremento hepático de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres. Reduce la activación de la vía ERK1/2 hepática y restaura la vía Wnt/ β -catenina a los niveles del grupo control. Oleuropeina inhibe también la expresión de los receptores *toll like* (TLR)-2



y TLR-4 y la transcripción génica de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ en el hígado (Park y cols., 2011).

II.4.3.7. Actividad hipoglucemiante

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por la ausencia relativa o absoluta de insulina, o bien, por una reducida actividad de la misma. La diabetes produce una hiperglucemia mantenida en el tiempo que causa complicaciones en otros órganos como ojos, riñones, piel o nervios. Es conocido que uno de los mecanismos implicados en la patología de la diabetes es el estrés oxidativo, por lo que una manera de prevenir o aliviar este daño es la utilización de antioxidantes. Al-Azzawie y Alhamdani (2006) observaron una reducción de la glucemia en conejos diabéticos tratados con oleuropeina. En otro estudio, Jemai y cols. (2009) demostraron que oleuropeina reduce los niveles plasmáticos de colesterol total en ratas diabéticas por aloxano.

No obstante, aunque actualmente se acepta que oleuropeina posee actividad hipoglucemiante, el estudio de este efecto con extractos de la hoja de olivo se remonta a la década de los 90 (Gonzalez y cols., 1992), y parece que en los últimos años se está contemplando la posibilidad de introducirlo en clínica. Se ha publicado un estudio clínico donde se demuestra que la administración diaria del extracto polifenólico de la hoja de olivo en hombres de mediana edad con sobrepeso, mejora la sensibilidad a insulina y produce un aumento de la actividad secretora de las células β -pancreáticas (De Bock y cols., 2013).

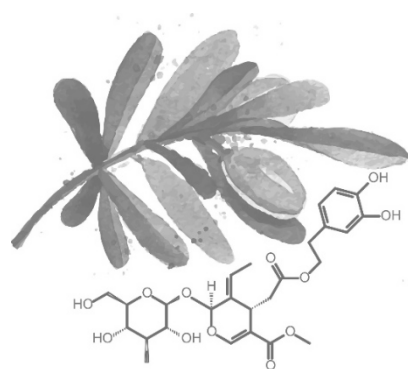


II.4.3.8. Otras propiedades farmacológicas

Otros efectos que se le atribuyen a oleuropeina son antimicrobiana (Bisignano y cols., 1999), antivírica (Zhao y cols., 2009), dermoprotectora frente a rayos UV (Sumiyoshi y Kimura, 2010), o efectos cicatrizantes (Mehraein y cols., 2014a, 2014b).

Material y

Métodos





III.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OLEUROPEINA A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO

Se obtiene oleuropeina a partir de las hojas de olivo, siguiendo el esquema de extracción (Figura 3) descrito por Andreadou y cols. (2006). Así, se procede a una extracción sólido/líquido de 1 kg de hojas de olivo desecadas con acetona durante 72 h. El extracto obtenido se concentra y se lava con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (98:2). El material insoluble separado, se redisuelve y se purifica mediante una cromatografía líquida de vacío, utilizando como fase móvil mezclas $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-EtOAc}$ (9:1-8:2). La oleuropeina se identifica en base a los datos espectrales de acuerdo con los descritos por Gariboldi y cols. (1986).

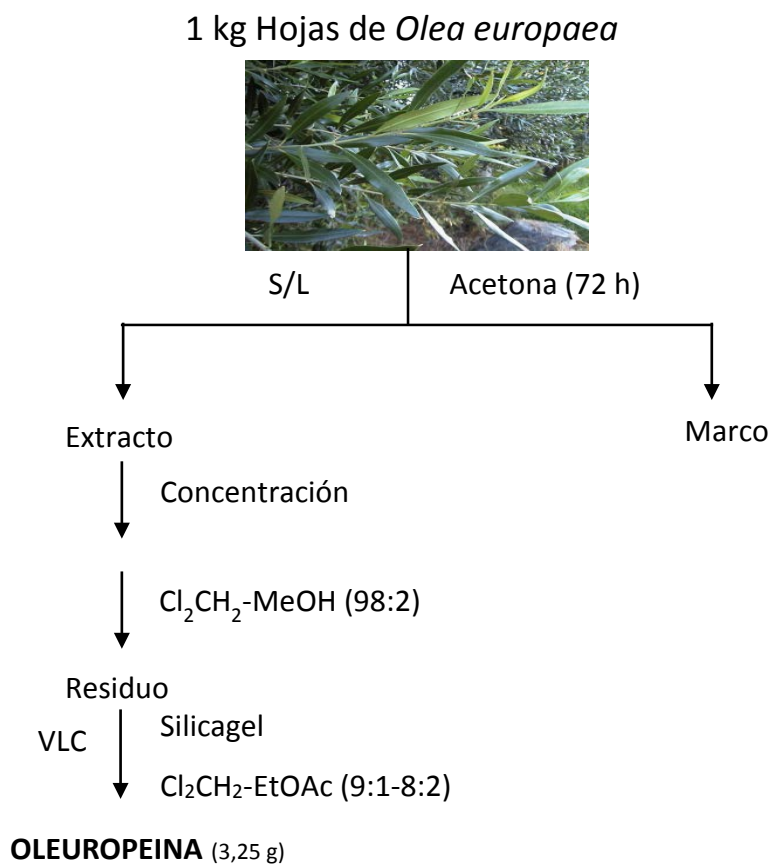
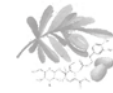


Figura 3. Esquema de extracción de oleuropeina.



Además, de este método de obtención, oleuropeina también se adquiere a través de Sigma y Extrasynthese.

III.2. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS *IN VIVO*

III.2.1. Animales de experimentación

Los animales empleados son ratones hembras de las cepas Balb/C y C57BL/6.

Balb/C: Son una cepa de ratones inmunodeficientes innatos, de carácter albino, de ahí su pelaje blanco y pupilas rojas. Se obtuvieron por primera vez a partir de ratones silvestres en el año 1913. Son ratones manejables y de fácil mantenimiento y cría, puesto que suelen ser fértiles durante mucho tiempo. Se utilizan en el campo del cáncer y de la inmunología, y también se usan para la producción de anticuerpos monoclonales debido a la facilidad de producir plasmocitomas en respuesta a una inyección de aceite mineral.

C57BL/6: Esta cepa tiene un pelaje oscuro y son fácilmente irritables. Se utilizan en modelos fisiológicos y patológicos *in vivo*, y como cepa *background* para animales modificados genéticamente, puesto que es el primer ratón que se secuenció su genoma al completo.

Los animales son proporcionados por Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, España), con una edad comprendida entre 6-8 semanas y un peso de 18-20 g. Los ratones se reciben y se mantienen en el estabulario de la Sección de Producción Animal (SCSIE) de Burjassot de la Universitat de València. El periodo de aclimatación dura siete días, bajo condiciones de 12 h de luz/oscuridad, a 22 °C, 60% de humedad, con una dieta estandarizada



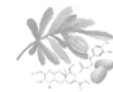
de ratón de experimentación y agua *ad libitum*. Todos los protocolos tienen la autorización de la Generalitat Valenciana (108 A1233134999884, 28-01-2009, A1328853373111, 2012, ver Anexo IV) de acuerdo a la legislación vigente.

III.2.2. Incorporación de oeluropein al 1% en la dieta estándar del ratón.

La dieta se prepara como describe Billerey-Larmonier y cols. (2008). Se considera un consumo de 4 g de materia seca diarios por ratón. El pienso utilizado se adquiere de Panlab. Para ello, se mezcla en seco, el pienso pulverizado con el producto a la concentración establecida (1% de oleuropeina respecto al contenido final). Se homogeneiza y se le añade agua (0,65 mL/g de dieta) y agar previamente disuelto en microondas (contenido final de 0,2%). Se dispersa el agar y el agua homogéneamente por toda la masa, se divide en pequeñas porciones y se deja secar durante 24 h a una temperatura inferior a 37 °C. Una vez seco, se pesa la cantidad correspondiente diaria y se les proporciona a los ratones. Al día siguiente, se le resta el remanente a la cantidad inicial y se calcula los gramos de producto ingeridos por ratón diariamente y su equivalencia en humanos, según la fórmula descrita por Reagan Shaw y cols. (2008):

$$DEH (mg/kg) = dosis animal (mg/kg) \times \frac{Km animal}{Km humano}$$

Siendo, Km un valor calculado a partir de las medias de albúmina sérica de las diferentes especies en estudio, entre ellas la humana.



III.2.3. Protocolos experimentales

III.2.3.1. Inflamación intestinal aguda inducida por DSS al 5%

El modelo de colitis aguda inducida por DSS fue descrito por primera vez en 1985 por Ohkusa, al publicar sus primeras investigaciones en hámster. Con el tiempo, este modelo se fue adaptando hasta poder ser utilizado en ratón y además, se establecieron condiciones para la inducción de colitis crónica mediante DSS (Okayasu y cols., 1990).

La colitis aguda se induce mediante el suplemento del agua del grifo con DSS al 5% durante 7 días. Los ratones Balb/C se asignan aleatoriamente en 3 grupos de tratamiento de 10 animales: grupo control (reciben agua y dieta estándar); grupo DSS (reciben DSS al 5% y dieta estándar); grupo DSS+O (reciben DSS al 5% y dieta suplementada con un 1% de oleuropeina). Cada día se pesan los animales así como la dieta remanente y el día 8 se sacrifican por dislocación cervical (Figura 4). Se extrae el colon de los animales, destinándose tres para el estudio histológico de las muestras, tres para el cultivo de tejido, y el resto, se lavan con tampón fosfato salino (PBS) frío, se abren longitudinalmente, se miden, se pesan y se determina el parámetro mg/cm, como medida indirecta del edema. Estas muestras son congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a – 80 °C hasta su uso posterior.

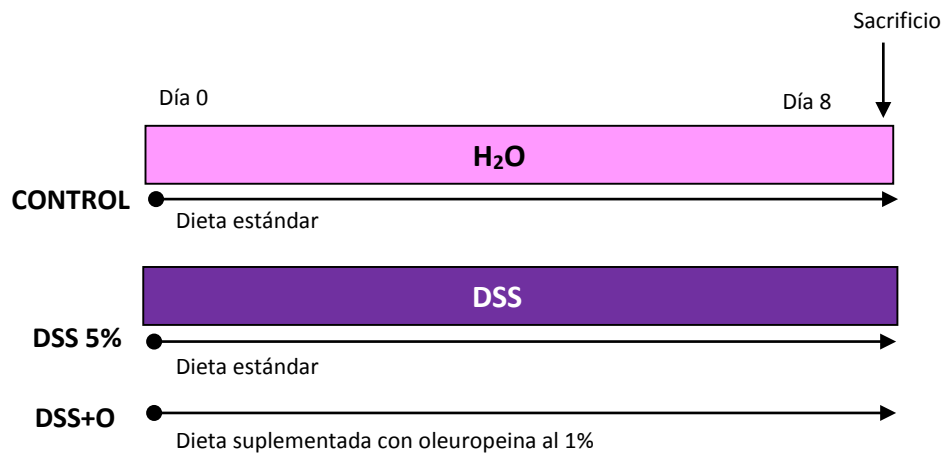
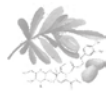


Figura 4. Esquema del protocolo de colitis aguda inducida por DSS al 5%.

- Cultivo primario de tejido de colon

El objetivo de esta prueba es determinar *ex vivo* la liberación de mediadores inflamatorios por el tejido intestinal. Una vez sacrificados los animales, se selecciona aleatoriamente el colon de tres animales, se limpian con medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640, suplementado con SFB al 10% y 1% de antibiótico. Después, el tejido se corta en 4 partes, la parte proximal, media superior, media inferior y distal, que se siembran en una placa de 24 pocillos con medio RPMI-1640 conteniendo SFB al 10% y antibióticos, y se incuban durante 24 h a 37 °C y en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% (Kim y cols., 2008). Pasado este tiempo, se pesan los trozos de colon y se recoge el sobrenadante. Sobre éste, se determina la concentración de TNF- α mediante ELISA y la liberación de NO mediante el reactivo Griess.

- Determinación de NO

El NO es un radical libre producido por las diferentes isoformas de la enzima óxido NOS con un papel muy importante a nivel fisiológico, pero



que a altas concentraciones puede producir efectos perjudiciales en el organismo. En un proceso inflamatorio, la isoforma iNOS es la encargada de producir NO. Este NO puede actuar de manera directa con actividad citostática, ya que promueve la destrucción de microorganismos y parásitos por el reclutamiento de otras células inflamatorias, o de manera indirecta, ejerciendo una actividad citotóxica al reaccionar con otras sustancias proinflamatorias como las EROs. Sin embargo, una producción incontrolada de NO puede aumentar los niveles de EROs, produciendo estrés oxidativo y dañando los tejidos adyacentes.

El NO tiene una vida media muy corta, transformándose casi instantáneamente en sus formas más estables, nitritos y nitratos. Los nitratos provienen de la reacción del NO con la oxihemoglobina, siendo más común en sangre y plasma. Los nitritos, en cambio, son el único producto estable de la auto-oxidación del NO en soluciones acuosas. Es por eso, que para la determinación indirecta de NO se utiliza el reactivo de Griess. El ácido sulfanílico reacciona con los nitritos formando sales de diazonio, que al entrar en contacto con α -naftilamina desarrolla un color rosa-violáceo.

Para ello, 100 μ L de sobrenadante del cultivo de tejido se hacen reaccionar en una placa de 96 pocillos con 100 μ L de reactivo de Griess. El resultado se mide por espectrometría a 570 nm utilizando el espectrofotómetro victor X3. Para poder calcular la concentración de nitritos de cada muestra, se prepara una curva patrón de concentraciones conocidas de nitrito sódico (NaNO_2), a partir de la cual se interpolan los valores de absorbancia obtenidos en cada muestra problema, siguiendo la ecuación de la recta:



$$x = \frac{y - a}{m}$$

Donde:

x = concentración desconocida

y = absorbancia conocida

a = ordenada en el origen

m = pendiente

El porcentaje de inhibición de la producción de NO se obtiene según la siguiente expresión matemática:

$$I\% = \left(\frac{(\Delta(A/\text{mg})_e - \Delta(A/\text{mg})_p)}{\Delta\left(\frac{A}{\text{mg}}\right)_e} \right) \times 100$$

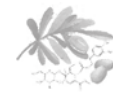
Siendo:

$\Delta(A/\text{mg})_e$ = media de absorbancia por mg del grupo enfermo

$\Delta(A/\text{mg})_p$ = media de absorbancia por mg grupo problema

III.2.3.2. Inflamación intestinal aguda inducida por DSS al 3%

La colitis aguda se induce tras administrar durante 7 días DSS al 3% en agua de bebida en ratones C57BL/6. Los animales se distribuyen aleatoriamente en grupos de 3 ratones: grupo control (reciben agua de bebida); grupo DSS (reciben DSS en el agua de bebida); grupo DSS+O (reciben diariamente desde el día -7, 100 mg/kg de oleuropeina disuelta en



el agua de bebida y a partir del día 0 se añade DSS al 3% al agua de bebida); grupo DSS+Dx (reciben 6 dosis de dexametasona 2,5 mg/kg desde el día -7 por vía oral y desde el día 0 se añade DSS al 3%). Tres veces por semana se pesan los animales, se calcula el volumen de líquido bebido y el día 8 se sacrifican los animales por dislocación cervical (Figura 5).

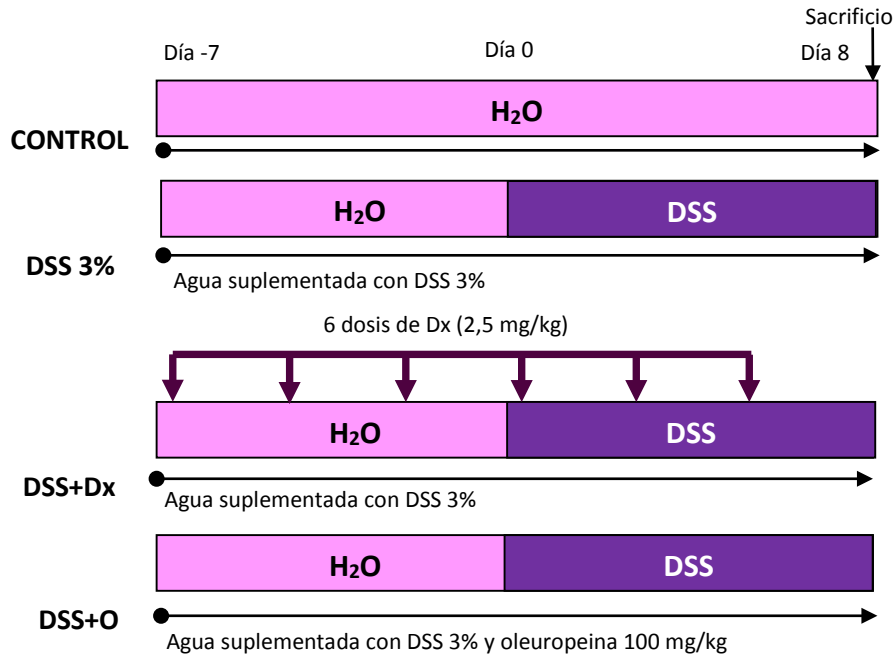
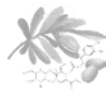


Figura 5. Esquema de protocolo de colitis aguda inducida por DSS al 3%.

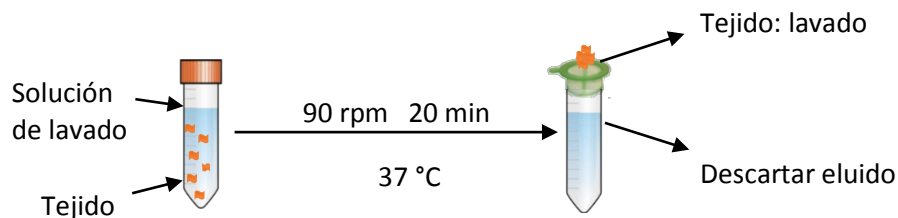
- Protocolo de aislamiento de linfocitos de la *lamina propria*

Una vez sacrificados los animales, se retira el colon, se lava con PBS, se abre longitudinalmente y se corta en pequeños trozos, de aproximadamente 1 cm. A continuación, se siguen los pasos siguientes:

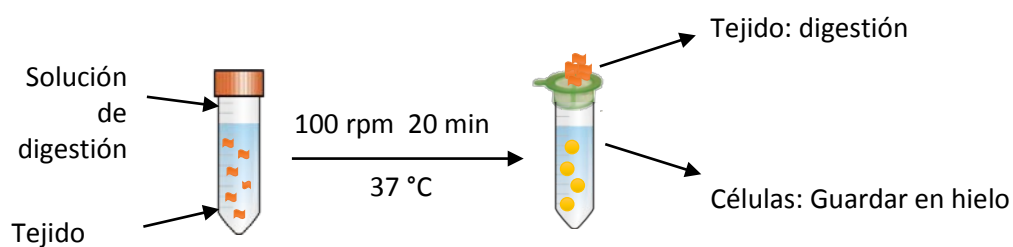
- **Etapa de lavado:** La finalidad de esta etapa es eliminar la mucosa y el epitelio intestinal para facilitar el acceso a la *lamina propria*. Las muestras de colon previamente cortadas se incuban durante 20 min, a 37 °C y en agitación (90 rpm), con 5 mL de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5% disuelto en HBSS modificado (sin

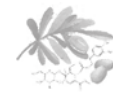


Ca²⁺ ni Mg²⁺). Seguidamente, se hace pasar por un filtro tipo Falcon® Cell Strainer de diámetro de poro de 100 µm, se recupera el intestino y se descarta el líquido de lavado. Este proceso se repite dos veces.



- **Etapas de disgregación:** Mediante la digestión de la *lamina propria* se consigue liberar las células presentes en ella. Para ello, el intestino se corta en trozos más pequeños aún, del orden de 0,5 cm, y se incuban durante 20 min, a 37 °C y a una velocidad de agitación de 100 rpm con 0,5 mg/mL de colagenasa D, 0,25 mg/mL de DNAsa I, 3 U/mL de dispasa II y 5% de suero fetal bovino (SFB) disuelto en HBSS modificado (sin Ca²⁺ ni Mg²⁺). Se pasa la solución por un filtro tipo Falcon® Cell Strainer de 40 µm, y en este caso, se recoge tanto el intestino como el líquido, ya que contiene las células de la *lamina propria*. Se repite el proceso tres veces, y las células se mantienen en hielo durante los periodos de incubación.

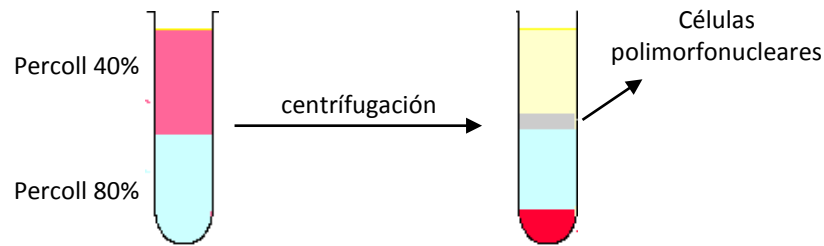
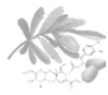




El tejido se descarta, y el sobrenadante de la digestión (15 mL), se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante, se resuspende el pellet con medio RPMI 1640 GlutaMAX™ suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina) y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones.

- **Aislamiento de linfocitos mediante gradiente percoll:** En este paso, se aíslan los linfocitos obtenidos del proceso de digestión usando el gradiente percoll. El percoll se compone de una suspensión de partículas de ácido silícico revestidas de polivinilpirrolidona, que presenta baja viscosidad a densidades altas, no afecta a la presión osmótica del medio y es estable a pH comprendido entre 5 y 10. Es soluble en soluciones acuosas. Su utilización permite una separación de las poblaciones en bandas, facilitando su aislamiento. Para ello, se preparan soluciones de percoll al 80% y al 40% en PBS. Se rellena un tubo de polipropileno de 15 mL con 5 mL de solución al 80% de percoll, y por otra parte, se resuspende el pellet resultante de la centrifugación anterior con 10 mL de percoll al 40%. Muy cuidadosamente, y de forma constante, se añade poco a poco por la pared del tubo de polipropileno la suspensión celular a los 5 mL de percoll al 80%, formando una interfase entre ambas soluciones.

Se centrifugan los tubos de polipropileno a 2500 rpm durante 20 min, a 25 °C sin freno. Al terminar el proceso, los linfocitos se habrán separado y quedarán en forma de anillo blanquecino en la interfase:

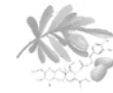


Se elimina el resto que se encuentra en la parte superior, se descartan unos 7 mL, y se aspira el anillo de células. Se recogen hasta 3 mL. El resto se descarta. Estos 3 mL se centrifugan a 1500 rpm, durante 5 min a 4 °C, se descarta el sobrenadante, se resuspenden las células en 1-2 mL de medio RPMI con 10% de SFB y se recuentan con la cámara de Neubauer.

- Estudio poblacional linfocitario por citometría de flujo

Entre las múltiples aplicaciones de la citometría de flujo, se encuentra la posibilidad de separar poblaciones celulares o determinar las características de una población determinada. Así, una vez aisladas las células polimorfonucleares de la *lamina propria*, se procede a la caracterización de los tipos celulares y subcelulares de interés.

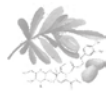
- **Estimulación:** Tras el recuento de células, se siembran 5×10^5 células/mL en una placa de 24 pocillos, y se estimulan con PMA (5 ng/mL) e ionomicina (500 ng/mL) durante 4 h a 37 °C y en una atmósfera humidificada 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo, se recogen las células, se transfieren a tubos cónicos, se centrifugan a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C, se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con PBS suplementado con 10% de SFB.



- **Tinción de marcadores extracelulares:** Se lavan dos veces por centrifugación y se incuban con el anticuerpo anti mouse-CD4 durante 30 min a 4 °C.
- **Fijación y permeabilización:** Las células se lavan, se fijan con *p*-formaldehído al 4% en PBS, durante 20 min a 4 °C. Éste se elimina por centrifugación, y se mantienen las células con PBS y SFB al 10% durante toda la noche. Al día siguiente, se permeabilizan con “Permeabilization buffer” durante 15 min a temperatura ambiente.
- **Tinción de marcadores intracelulares:** se incuban las células con los anticuerpos anti mouse *RAR-related Orphan Receptor* (ROR) γ t, anti mouse IL-17 y anti mouse IFN- γ a 4 °C. Tras 30 min, las células se lavan por centrifugación, y se pasan las muestras por el citómetro.

III.2.3.3. Inflamación intestinal crónica inducida por DSS

La colitis crónica es inducida mediante la administración de cuatro ciclos de DSS (DSS al 1% durante el primer y el segundo ciclo, seguido de DSS al 2% en el tercer y cuarto ciclo). Cada ciclo consiste en 7 días de DSS disuelto en el agua de bebida seguidos de 7 días de agua sin DSS. Los ratones C57BL/6 son distribuidos aleatoriamente en tres grupos de tratamiento de 10 animales: grupo control (reciben dieta estándar y agua), grupo DSS (reciben dieta estándar y DSS en agua) y grupo DSS+O (reciben dieta suplementada con oleuropeína al 0,25% y DSS en agua). Tanto los animales como la dieta remanente se pesan tres veces por semana y los animales son sacrificados el día 56 por dislocación cervical (Figura 6). Se extrae el colon de los animales, destinándose tres para el estudio histológico y el resto se lavan con PBS frío, se cortan longitudinalmente, se



miden, se pesan, se congelan con nitrógeno líquido y se conservan a -80°C hasta su uso posterior.

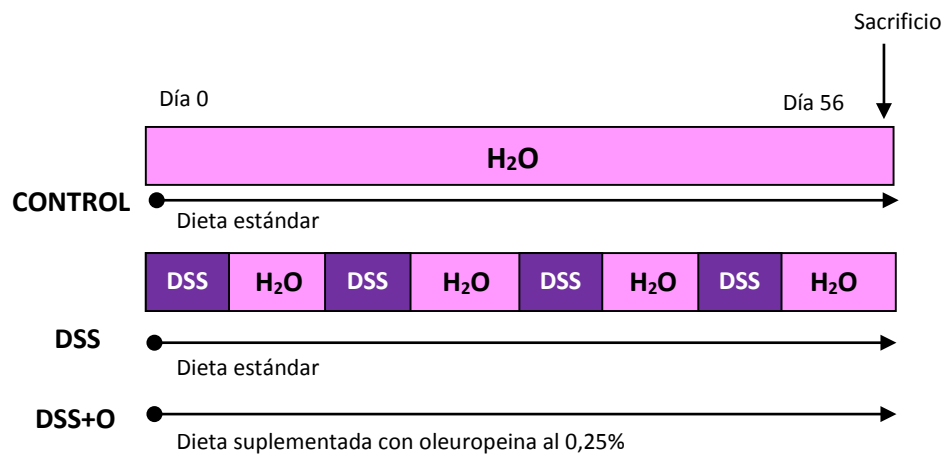
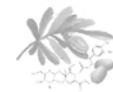


Figura 6. Esquema de protocolo de colitis crónica inducida por DSS.

III.2.3.4. CCR asociado a CU inducido por AOM y DSS

Este método fue descrito por primera vez en 1996 por Okayasu y cols., donde demostraban que la administración de AOM seguido del tratamiento con DSS producía un daño crónico con necrosis y regeneración en la mucosa intestinal, siendo crítico para el desarrollo de tumores.

El CCR asociado a colitis se induce mediante la inyección intraperitoneal de AOM (7,5 mg/kg, 0,2 mL) disuelto en PBS el día -7, y la administración posterior de 3 ciclos de DSS a partir del día 0. Cada ciclo consta de 7 días de agua suplementada con DSS al 1,5%, seguidos de 14 días de agua del grifo. Los animales se reparten aleatoriamente en 8 grupos de 10 animales: grupo control (reciben agua durante todo el experimento); grupo DSS (reciben sólo los 3 ciclos de DSS); grupo AOM (reciben agua y la inyección de AOM); los siguientes grupos, llamados AOM/DSS, reciben tanto la inyección de AOM como los 3 ciclos de DSS, y con excepción del grupo AOM/DSS, el resto son tratados por vía oral con el fármaco de



referencia, el 5-ASA (75 mg/kg), grupo AOM/DSS+ASA (Clapper y cols., 2008); con oleuropeina 50 mg/kg, grupo AOM/DSS+O50; y con oleuropeina 100 mg/kg, grupo AOM/DSS+O100. Todos los tratamientos se disuelven y administran en el agua de bebida. Tres veces por semana se pesan los animales, se mide el volumen de líquido remanente y se observa la presencia de diarrea o sangre en heces durante todo el experimento. El día 63, los animales se sacrifican por dislocación cervical y se extrae el colon. Para el estudio histológico, se corta un trozo de la parte distal del colon, de aproximadamente 0,5 cm, y se fija en *p*-formaldehído al 4% disuelto en PBS. Se deja toda la noche a temperatura ambiente y se guarda al día siguiente a 4 °C para su posterior análisis. El resto de los intestinos se lavan con PBS frío, se cortan longitudinalmente y se observa macroscópicamente la presencia de tumores, se miden, se pesan, se congelan con nitrógeno líquido y se guardan a -80 °C.

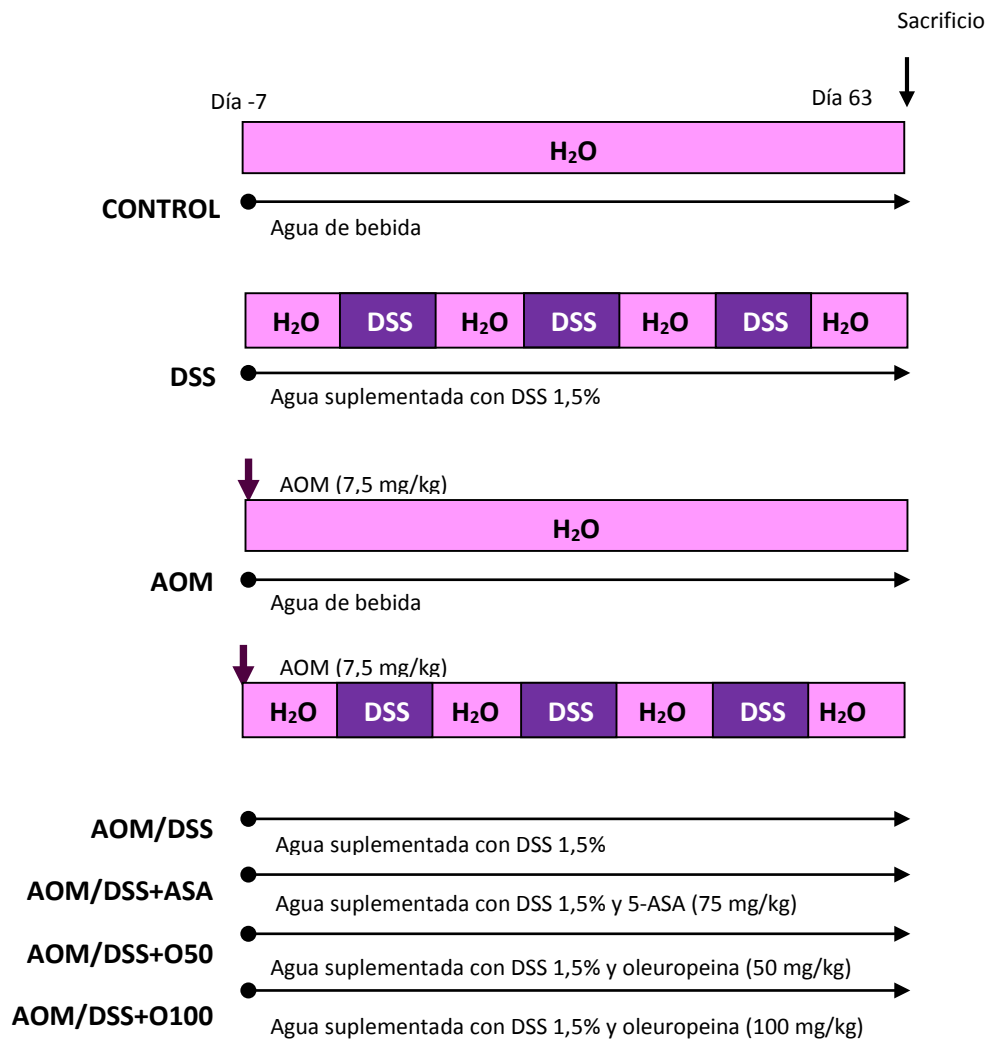
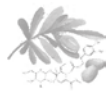


Figura 7. Esquema del protocolo de inducción de CCR inducido por AOM/DSS.

III.2.4. Índice de actividad de la enfermedad (IAE)

Una de las herramientas más frecuentemente usada para determinar la severidad de la EII es el IAE. Es un factor acumulativo que cuantifica la pérdida de peso, diarrea y sangrado en heces en la CU, inducida en animales de experimentación, según la Tabla 3:

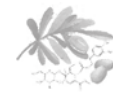


Tabla 3. Evaluación del IAE.

IAE			
Puntuación	Pérdida de peso (PP)	Sangre en heces (SH)	Diarrea (D)
0	No existe	No existe	No existe
1	1-5%		
2	6-10%	Leve sangrado	Semidura
3	10-20%		
4	>20%	Alto sangrado	Diarrea

Al final del experimento, se calcula la diferencia del peso al inicio y al final del experimento, y se examina la presencia de diarrea y el sangrado rectal, medido por sangre fecal visible macroscópicamente. Tras obtener los resultados de cada uno de los animales, se aplica la fórmula correspondiente a IAE:

$$IAE = \frac{(P(PP) + P(SH) + P(D))}{3}$$

Siendo:

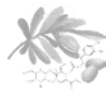
$P(PP)$ = Puntuación correspondiente a la pérdida de peso

$P(SH)$ =Puntuación correspondiente a la presencia de sangre en heces

$P(D)$ = Puntuación correspondiente al grado de diarrea

El IAE se expresa con valores comprendidos entre 1-4.

En el modelo de CCR, el IAE también informa de la severidad y del progreso del CCR. Se utilizan los mismos parámetros que en la Tabla 3, sin embargo, en este caso se hace también una evaluación del estado de los



animales al terminar cada ciclo, para así controlar la evolución de la enfermedad.

III.2.5. Análisis histológico e inmunohistoquímico

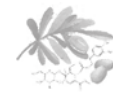
III.2.5.1. Tinción hematoxilina-eosina

Para facilitar el estudio histopatológico del intestino grueso, con una visión global de la muestra y la posibilidad de profundizar más en una determinada zona del colon, se utilizó la técnica de *swiss roll* en las muestras de colitis aguda y colitis crónica. Se abre longitudinalmente el colon, por el axis vertical, se enrolla en espiral desde la parte distal hasta la parte proximal del colon, sujetos con una aguja de un diámetro 25G x 5/8" y se fijan en *p*-formaldehído al 4% en PBS. Se dejan a temperatura ambiente durante la noche y se guardan a 4 °C hasta su uso. Se incluyen en parafina, se cortan en secciones de 8 µm y se tiñen con hematoxilina y eosina. Se seleccionan aleatoriamente 8 campos distintos de cada sección, y son analizados por un patólogo experto (magnificación 10x).



Figura 8. Intestino enrollado o rollo "swiss".

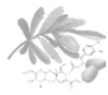
Para el estudio histopatológico del CCR, se corta una muestra de la parte distal del colon de aproximadamente 0,5 cm. Se fija con *p*-



formaldehído al 4% en PBS, durante toda la noche a temperatura ambiente, y después se incluye en parafina. Los bloques se cortan en secciones de 8 μm y se tiñen con hematoxilina y eosina. Se seleccionan 8 campos aleatoriamente y se evalúa de forma ciega por un patólogo experto (magnificación a 10x). Se identifica la pérdida de epitelio, infiltración celular, la ulceración y la presencia de regiones displásicas en los diferentes grupos.

III.2.5.2. Inmunohistoquímica de Ki-67

Las muestras de parafina se cortan en secciones micrométricas, se calientan a 65 °C, se desparafinan y se rehidratan con alcohol de diferentes grados. Tras esto, las secciones se hierven con tampón citrato para recuperar los antígenos. La actividad peroxidasa endógena se inhibe tras el tratamiento con H_2O_2 al 0,6% durante 20 min y la incubación posterior con avidina y biotina durante 15 min más para reducir la reactividad de biotina. Después, las secciones son permeabilizadas y las proteínas se bloquean con BSA al 2% con PBS-Tween 20 al 0,05%. El anticuerpo primario Ki-67 se incuba a una concentración de 1/50 a 4 °C en una cámara húmeda, durante toda la noche. Tras 3 lavados, los cortes son tratados con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo y con el complejo estreptavidina-peroxidasa, ambos 30 min a temperatura ambiente. La actividad enzimática se determina mediante el tratamiento de H_2O_2 y 3,3'-diaminobencidina (DAB) durante 5 min. En el último paso, las secciones se co-tiñen con hematoxilina Mayer. La tinción de Ki-67 se evalúa por un patólogo experto, y se cuantifica por densitometría mediante el uso del programa Image J.



III.2.6. Determinaciones bioquímicas y moleculares

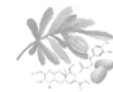
Para las determinaciones bioquímicas y moleculares, las muestras de colon previamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se pulverizan con un pilón y un mortero de porcelana, enfriados con nitrógeno líquido, quedando la muestra en forma de polvo perfectamente homogeneizado.

III.2.6.1. Determinación de la infiltración celular en colon: infiltración neutrofílica, eosinofílica y de macrófagos

En todos los casos, se toma una pequeña porción de tejido pulverizado previamente y se homogeneiza con tampón fosfato sódico 80 mM (pH=5,4) que contiene 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Se sonicán las muestras y se centrifugan a 10.300 rpm durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se recogen los sobrenadantes resultantes y se guardan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

- Medida de la actividad mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, aunque se encuentra principalmente en los neutrófilos, a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos. Es la única peroxidasa que cataliza la conversión de cloruro y H_2O_2 a HClO. Éste es un potente agente oxidante, que contribuye al mecanismo de primera línea de defensa contra agentes infecciosos, sin embargo, una activación excesiva puede conducir a una situación perjudicial para el huésped. El HClO desestabiliza las membranas celulares, ya que reacciona con proteínas y ácidos grasos insaturados, y se convierte en una de las EROs más dañinas en las enfermedades inflamatorias (García Morales y cols., 1998).



La medida de la actividad MPO es directamente proporcional al número de neutrófilos infiltrados. Puesto que la acumulación leucocitaria en la mucosa intestinal es una de las características de la CU, la valoración de esta enzima permite obtener una estimación semicuantitativa de la infiltración neutrofílica en el tejido. El experimento se basa en el método de Suzuki y cols. (1983), modificado por De Young y cols. (1989).

El procedimiento se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos. Se añade en cada pocillo, 30 μL de sobrenadante, 100 μL de PBS, 85 μL de tampón fosfato sódico 0,22 M (pH= 5,4) y 15 μL H_2O_2 al 0,017%. La reacción empieza al añadir 20 μL de cloruro de tetrametilbenzidina (Cl-TMB) 18,4 mM disuelto con dimetilformamida al 8%. El periodo de incubación dura 3 min a 37 °C. La reacción se paraliza con la adición de 30 μL de tampón citrato sódico 1,46 M (pH=3) en hielo. La actividad de la MPO se determina midiendo la absorbancia a 630 nm.

La TMB es oxidada por la MPO en presencia de H_2O_2 y toma un color azulado. Al añadir el ácido se reduce la actividad MPO (Figura 9).

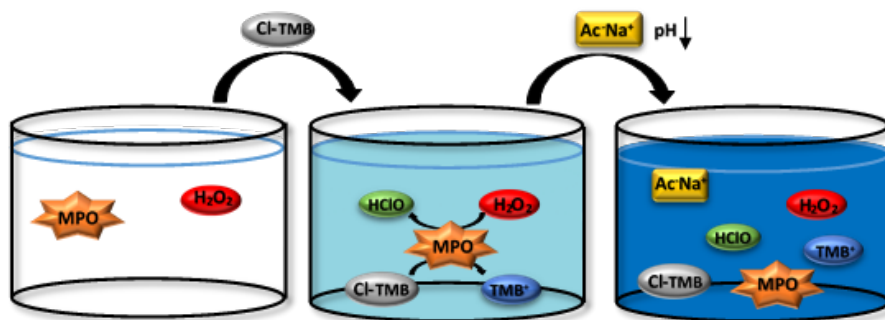
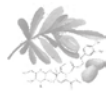


Figura 9. Ilustración del mecanismo de la reacción MPO.



- **Medida de la actividad eosinofilperoxidasa**

Los eosinófilos son leucocitos que poseen la capacidad de iniciar o potenciar las reacciones inflamatorias a través de la liberación de citocinas, quimiocinas u otros mediadores inflamatorios, como por ejemplo la eosinofilperoxidasa (EPO). La EPO cataliza la reacción de haluros y pseudohaluros con productos de la explosión respiratoria (H_2O_2 y O_2), formando compuestos oxidantes citotóxicos que causan daño y muerte celular.

Forbes y cols. (2004) observaron una alta infiltración de eosinófilos en colitis inducida por DSS. Además, la liberación de proteínas eosinofílicas por desgranulación podría estar implicada en la patogénesis de la colitis. En concreto, observaron que la colitis era mucho menos severa tanto en ratones $EPO^{-/-}$, como en ratones de cepa natural tratados con un inhibidor de EPO, demostrando el importante papel de esta enzima en las manifestaciones de la colitis experimental.

Una forma de determinar el grado de infiltración eosinofílica en la colitis es mediante la medida de la actividad enzimática EPO.

En una placa de 96 pocillos, se añaden 50 μ L de sobrenadante, 30 μ L de H_2O_2 6,6 mM disuelta en Tris-HCl (pH=8) y 100 μ L de *o*-fenilendiamina (OPD) 1,5 mM. Tras 2 min a temperatura ambiente, la reacción se detiene al añadir 75 μ L de ácido cítrico 50 mM (pH=4,5). La absorbancia se mide a 490 nm.

La OPD pasa a su forma oxidada, dando una coloración amarillenta. La enzima detiene su actividad debido a la reducción del pH al añadir el ácido (Figura 10).

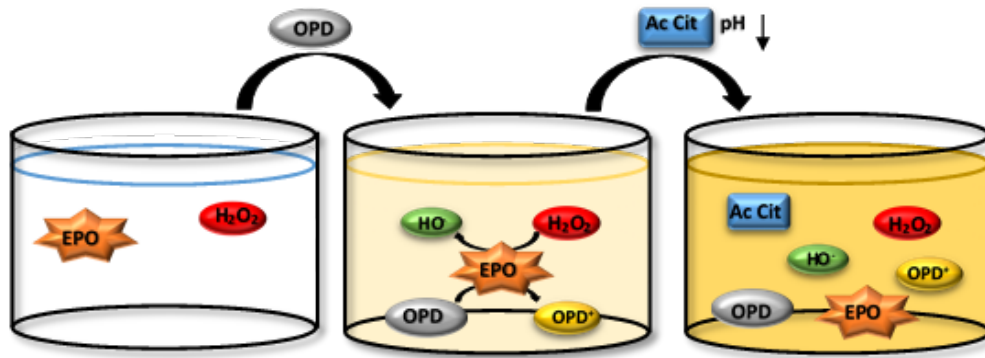
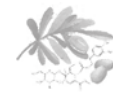
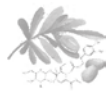


Figura 10. Ilustración del mecanismo de la reacción EPO.

- Medida de la actividad N-acetil-glucosaminidasa

Los macrófagos representan, junto con los neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, basófilos, linfocitos NK, células dendríticas y células linfoides innatas, al grupo celular perteneciente a la respuesta inmunológica innata. En su estado basal, los macrófagos circulan por el torrente sanguíneo en forma de monocitos y se diferencian y se activan al llegar al tejido dañado o al lugar de la inflamación. A parte de sintetizar y liberar mediadores inflamatorios, los macrófagos son capaces de fagocitar cuerpos extraños y eliminarlos con ayuda de unas partículas citoplasmáticas llamadas lisosomas. Estos lisosomas contienen enzimas hidrolíticas que degradan macromoléculas, como proteínas, azúcares o ácidos nucleicos. Una de ellas es la N-acetilglucosaminidasa (NAG), encargada de digerir compuestos N-acetilglucosaminados. Aunque existan macrófagos residentes en la *lamina propria* con la capacidad de modular su respuesta en función de la agresión producida, su presencia y activación en el proceso inflamatorio en la EII ha tomado especial relevancia en los últimos años (Steinbach y cols., 2014).

La mayoría de células del sistema inmune segregan mediadores inflamatorios, como citocinas, COX-2 o iNOS, por lo que sería difícil



discriminar el tipo celular al detectar este tipo de proteínas. Por esto, una manera de detectar el grado de infiltración de macrófagos en el proceso inflamatorio es mediante la medida de la actividad de la enzima NAG.

Para la detección de la actividad NAG, en una placa de 96 pocillos se añade 50 μL de sobrenadante y 100 μL de 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina 2,25 mM disuelta en tampón acetato sódico 50 mM. El ensayo se mantiene a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, y se añaden 50 μL de Na_2CO_3 0,2 M para parar la reacción.

La enzima hidroliza el sustrato liberando el *p*-nitrofenol, que en contacto con una base, en este caso el carbonato sódico, se transforma en nitrofenolato dando una coloración amarilla intensa que es medida espectrofotométricamente a 405 nm (Figura 11).

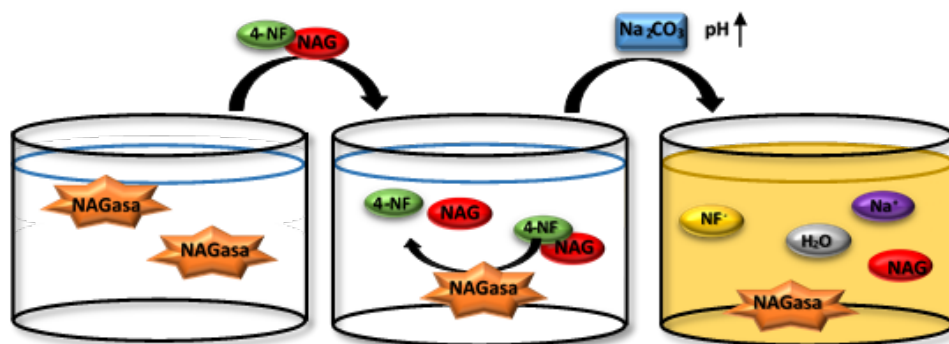


Figura 11. Ilustración del mecanismo de la reacción NAG.

- Tratamiento de los datos

Las absorbancias obtenidas se dividen por la concentración de proteínas expresadas en mg/mL utilizadas para el ensayo, con la finalidad de unificar resultados. La actividad enzimática se expresa como la cantidad de enzima necesaria para producir un cambio de absorbancia por 1 unidad/mg de proteína.



El porcentaje de inhibición de las actividades enzimáticas se obtiene según la siguiente expresión matemática:

$$I\% = \left(\frac{(\Delta(A/\text{mg})_e - \Delta(A/\text{mg})_p)}{\Delta\left(\frac{A}{\text{mg}}\right)_e} \right) \times 100$$

Siendo:

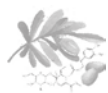
$\Delta(A/\text{mg})_e$ = media de absorbancia por mg del grupo enfermo

$\Delta(A/\text{mg})_p$ = media de absorbancia por mg del grupo problema

III.2.6.2. Determinación de citocinas mediante inmunoensayo

La técnica ELISA se utiliza para determinar la concentración de moléculas específicas en una muestra. Generalmente, el ELISA más utilizado es el tipo sándwich. El anticuerpo de captura se une a la base del pocillo y capta al antígeno presente en la muestra. Las moléculas que no se hayan unido se eliminan con los lavados. Se añade el anticuerpo de detección asociado a una enzima, que se une al antígeno y mediante una reacción enzimática, convierte un sustrato incoloro en un compuesto azulado. Existe la posibilidad de realizar una recta patrón con concentraciones conocidas de antígeno, y así, mediante la medida de la absorbancia, determinar la concentración de la molécula de interés.

Se toma una pequeña porción de tejido pulverizado de todas las muestras a analizar (colitis aguda, crónica y CCR) y se homogeneiza con Nonidet NP-40 1% en PBS. Las muestras se sonicán 3 veces durante 10 s y se centrifugan a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recoge el



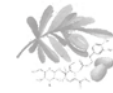
sobrenadante y se determinan los niveles de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17A, utilizando un kit de ELISA específico para cada una de ellas. A continuación se detalla el procedimiento experimental según las instrucciones del kit:

Tabla 4. Instrucciones del kit ELISA.

	RECTA PATRÓN	PROBLEMA
Anticuerpo de captura	100 μ L	100 μ L
Incubar toda la noche a 4 °C		
Diluyente del ensayo	200 μ L	200 μ L
Incubar 1 h a T ambiente		
Estándar	100 μ L	-
Muestra	-	100 μ L
Incubar toda la noche a 4 °C		
Anticuerpo de detección	100 μ L	100 μ L
Incubar 1 h a T ambiente		
Avidin-HRP (enzima)	100 μ L	100 μ L
Incubar 30 min a T ambiente		
TMB (sustrato)	100 μ L	100 μ L
Incubar 15 min a T ambiente		
H₂SO₄ 2N	50 μ L	50 μ L
Leer absorbancia a 450 nm y 570 nm		

Los valores de absorbancia total de cada una de las muestras se obtienen restando los valores de absorbancia obtenidos a 570 nm a los obtenidos a 450 nm.

Una vez realizada la curva patrón, se interpolan los valores de absorbancias totales de las muestras y se obtienen las concentraciones existentes de citocinas en cada una de ellas, que, una vez dividido el valor



por los mg de proteína presentes en la muestra, se calcula el promedio de las concentraciones totales.

Los porcentajes de inhibición de la producción de citocinas se calculan según la siguiente fórmula:

$$I\% = \left(\frac{[C]e - [C]p}{[C]e} \right) \times 100$$

Siendo:

[C]e = media aritmética de la concentración de citocina en el grupo enfermo

[C]p = media aritmética de la concentración de citocina en el grupo problema

III.2.6.3. Extracción proteica citosólica y nuclear

Para determinar proteínas de interés utilizando la técnica de western blot, es necesario separar las proteínas de una muestra de tejido. Para ello, se toma una pequeña porción de tejido pulverizado de todas las muestras y se homogeneiza con tampón A (Anexo III.2). Se sonicán tres veces durante 10 s, se añade Nonidet NP-40 0,5% y se agitan durante 45 min en hielo. Los lisados se centrifugan a 1500 rpm durante 10 min a 4 °C, se recoge el sobrenadante, que se corresponde con la **fracción citosólica**, y se guarda a – 80 °C hasta su uso posterior. Los pellets resultantes se resuspenden con 500 µL del tampón B (Anexo III.2) y se incuban durante 30 min en hielo y agitación. Después de esto, las muestras se centrifugan a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes, correspondientes a la **fracción nuclear**, se recogen y se guardan a – 80 °C.



III.2.6.4. Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantifican usando el método de Bradford. El reactivo de Bradford contiene un colorante hidrofóbico, el azul de Commassie, cuyas disoluciones acuosas, en presencia de ácido fosfórico, poseen un color pardo que se convierten en azul intenso al entrar en contacto con la parte hidrofóbica de una proteína. La intensidad de este color azulado, medida por absorbancia, será proporcional a la concentración de proteínas en una muestra.

Una alícuota de la muestra se diluye 1:5 y 5 μL de la misma (por duplicado) se añaden a una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se adicionan 250 μL de reactivo de Bradford y tras 15 min de reposo se mide la absorbancia a 570 nm. Para calcular la concentración de proteínas de cada muestra, se realiza una curva estándar de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA), sobre la que se interpolan los valores obtenidos para cada muestra problema, según la ecuación de la recta:

$$x = \frac{y - a}{m}$$

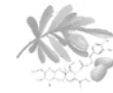
Donde:

x = concentración desconocida

y = absorbancia conocida

a= ordenada en el origen

m = pendiente



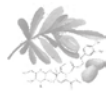
III.2.6.5. Determinación de la expresión proteica mediante western blot

- Reducción y desnaturalización de las proteínas

Una vez cuantificada la concentración de proteínas, se alícuota los volúmenes correspondientes a la misma cantidad de muestra de proteínas, se completan con agua destilada para que todas tengan el mismo volumen, y se hierven a 100 °C con un tampón desnaturalizante (*Reducing Buffer*) que contiene ditioneitol (DTT) y dodecil sulfato sódico (SDS) (5:1 v/v).

- Western blot

Cantidades iguales de proteína se cargan en el gel de poliacrilamida (Anexo III.3) y se separan con tampón de electroforesis (Anexo III.4) durante 50 min a 150 V. Posteriormente se transfiere a una membrana de nitrocelulosa mediante el método de transferencia húmeda, usando un tampón de transferencia (Anexo III.4) durante 120 min a 120 mA. La membrana se bloquea con leche desnatada en polvo al 5% disuelta en PBS-Tween 20 al 0,05% durante 90 min. A continuación, se incuba con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C y agitación suave. Al día siguiente, la membrana se lava tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05% y se incuba con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, cabra o ratón 1:12000) durante 1 h a T ambiente con ligera agitación. Después de lavar tres veces la membrana, se hace reaccionar con el reactivo de quimioluminiscencia, se deja actuar 3-5 min y se visualizan las proteínas separadas con ayuda de un transiluminador LAS-3000 mini.



Generalmente se usa el protocolo descrito anteriormente, sin embargo, para determinados anticuerpos primarios es necesario seguir las especificaciones del fabricante, o bien cuando el objetivo es determinar proteínas fosforiladas, se sustituye la leche por BSA al 3% para el bloqueo y la incubación con el anticuerpo secundario, y BSA al 1,5% para la incubación con el anticuerpo primario. Esto es debido a que la leche puede contener enzimas fosfatasa, que pueden liberar el grupo fosfato y dificultar la detección de este tipo de proteínas. Los anticuerpos primarios utilizados, y sus condiciones se muestran en el anexo II.2.

La detección de β -actina (anti- β -actina 1:10000) se usa como control interno de carga, y por tanto, para normalizar las diferencias en las cantidades de proteínas entre las diferentes muestras.

La intensidad de las bandas se cuantifica densitométricamente utilizando el programa Scion Image. El valor de la densidad de cada mancha se refiere al valor obtenido para la β -actina correspondiente.

Se calcula el porcentaje de inhibición de la expresión de las proteínas mediante la siguiente fórmula matemática:

$$I\% = \left(\frac{[D]e - [D]p}{[D]e} \right) \times 100$$

Siendo:

[D]e = media aritmética de los valores densitométricos de la proteína en cuestión en el grupo enfermo

[D]p = media aritmética de los valores densitométricos de la proteína en cuestión en el grupo problema



III.2.6.6. Estudio de la expresión génica: extracción de ARN y RT-PCR semicuantitativa

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (siglas de su nombre en inglés *polymerase chain reaction*), consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN específico para determinar la expresión génica de una determinada proteína. En este caso, la expresión génica se cuantifica a partir de la cadena de ARN, sin embargo, su inestabilidad hace difícil su manipulación, así que se transforma en ADN complementario (ADNc). A este tipo de PCR se le denomina “reverse transcriptase-PCR” (RT-PCR).

- Extracción de ARN

Para extraer el ARN de la muestra se utiliza el kit específico Quiagen RNAeasy mini Kit. Se recoge una pequeña porción de tejido pulverizado y se homogeneiza con 350 μ L de β -mercaptoetanol al 1% disuelto con el tampón RLT. Se sonica tres veces durante 10 s, se hace pasar la muestra por agujas de calibre decreciente hasta que pase por una aguja de diámetro 30G x ½”, se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C y se recoge el sobrenadante.

A continuación, se utilizan las columnas RNAeasy mini spin, siguiendo el protocolo descrito a continuación:

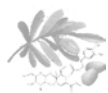
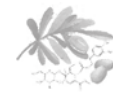


Tabla 5. Pasos a seguir para la extracción de ARNm.

Pasos	EXTRACCIÓN ARN
1	Añadir 350 μ L de etanol 70% a la muestra
2	Transferir a la columna
3	Centrifugar a 12000 rpm durante 1 min
4	Descartar el líquido eluido
5	Añadir 350 μ L de tampón RW1 a la columna
6	Repetir paso 3
7	Descartar líquido eluido
8	Mezclar 10 μ L de ADNasa con 70 μ L de tampón RDD y añadir 80 μ L a la columna
9	Incubar 15 min a T ambiente
10	Añadir 350 μ L de tampón RW1
11	Repetir paso 3
12	Cambiar la columna a un tubo colector nuevo
13	Añadir 500 μ L de tampón RPE
14	Repetir paso 3
15	Descartar líquido eluido
16	Añadir 500 μ L de etanol 80%
17	Centrifugar 12000 rpm durante 2 min
18	Cambiar la columna a un tubo colector nuevo
19	Abrir la columna y centrifugar 12000 rpm durante 5 min
20	Cambiar la columna a un eppendorf libre de ARNasas
21	Añadir 14 μ L de agua destilada libre de ARNasas del kit
22	Repetir paso 3
23	Descartar la columna

Se toman 2,5 μ L de la muestra para determinar la absorbancia a 260 y 280 nm y calcular la concentración de ARN mediante Nanodrop. El ratio de



la densidad óptica entre 260/280 debe ser siempre superior a 1,8. Las muestras de ARN se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

- **Conversión a ADNc**

Para asegurar una cantidad adecuada de ADNc, se necesita una cantidad específica de ARN, aproximadamente, 500 ng. Se alicuotan los volúmenes correspondientes a 500 ng y se completa hasta 12 μL con agua destilada libre de ARNasas. A cada muestra se añade:

- 1 μL de Oligo dT
- 1 μL de Random primer

Se mantienen a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min.

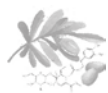
Se añade:

- 2 μL de Affinity Script RT buffer
- 2 μL de DTT
- 1 μL de dNTP mix
- 0,5 μL de Affinity Script multi-temp RT
- 0,5 μL de agua destilada libre de ARNasas.

Se introducen en el termociclador y se programa a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h y luego, a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min.

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Tras obtener el ADNc, se mezcla 1 μL de este ADNc con 12,5 μL de mix Red Taq y 1 μL de los primers en estudio y se diluye hasta 25 μL con agua destilada libre de ARNasas. Las condiciones del termociclador van a variar



según el primer que se vaya a utilizar. Los cebadores utilizados y las condiciones son los siguientes:

Tabla 6. Lista de cebadores para RT-PCR.

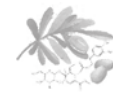
Primer	Secuencia	Condiciones termociclador
Anexina A1	5'-CCCTGGATGAAACCTTGAAA-3'	94 °C 1 min; (60 °C 1 min, 72 °C 1 min)x25; 72 °C 10 min
	5'-CATTACAGTCTGTCCCCTTT-3'	
IL-6	5'-ATGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	94 °C 1 min; (60 °C 1 min, 72 °C 1 min)x30; 72 °C 10 min
	5'-GGCATAACGCACTAGGTTTGCCGA-3'	
TNF-α	5'-AGCCACGTCGTAGCAAACCAC-3'	94 °C 1 min; (60 °C 1 min, 72 °C 1 min)x30; 72 °C 10 min
	5'-TAGACGTGCCCGACTCCGC-3'	
IL-1β	5'-GCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGCA-3'	94 °C 1 min; (60 °C 1 min, 72 °C 1 min)x30; 72 °C 10 min
	5'-AGCGACCTGTCTTGCCGAGG-3'	
β-actina	5'-GCAGAGCAAGAGAGGCATCC-3'	94 °C 1 min; (60 °C 1 min, 72 °C 1 min)x30; 72 °C 10 min
	5'-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3'	

Una vez completada la reacción, el producto amplificado se separa por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio al 0,03% en tampón TAE (Anexo III.5). El gel es revelado mediante un transiluminador LAS-3000 mini fujifilm.

La intensidad de las bandas se cuantifica densitométricamente utilizando el programa Scion Image. El valor de la densidad de cada mancha se refiere al valor obtenido para la β -actina correspondiente.

Se calcula el número de veces aumentado o disminuido con respecto al grupo enfermo, según la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de veces} = \left(\frac{[D]p}{[D]e} \right)$$



Siendo:

[D]e = media aritmética de los valores densitométricos del ADNc en cuestion en el grupo enfermo

[D]p = media aritmética de los valores densitométricos del ADNc en cuestion en el grupo problema

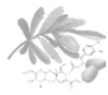
III.3. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS *IN VITRO*

III.3.1. Tipos celulares utilizados

III.3.1.1. Obtención de macrófagos peritoneales de ratón Balb/C

Los macrófagos de ratón son uno de los tipos celulares más utilizados para determinar el efecto antiinflamatorio de un determinado producto. Estas células pertenecen a la primera línea de defensa en un proceso inflamatorio, la respuesta innata. Por eso, son muy fáciles de activar tras un estímulo y generan una respuesta inmunológica potente, con activación de numerosas vías de señalización y liberación al medio de gran cantidad de mediadores.

Los macrófagos son células adherentes, que crecen y se mantienen fijadas a un soporte sólido mediante la formación de pseudópodos (Figura 12). Se pueden obtener a través de líneas celulares modificadas, como los macrófagos RAW 264.7, o bien mediante el aislamiento y cultivo primario. A diferencia de las líneas celulares, la vida media de los macrófagos primarios no supera las 48 h, pero ofrecen información mucho más real, puesto que provienen directamente del animal, y se comportan de manera



similar a como lo harían ante una agresión. En este caso se trata de macrófagos residentes en el peritoneo, ya que juegan un papel muy importante en la inflamación intestinal al migrar hasta el colon ante un proceso inflamatorio.

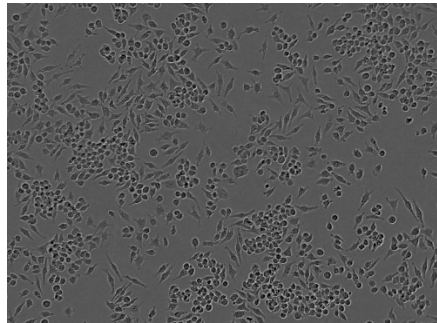
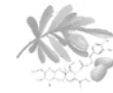


Figura 12. Macrófagos primarios peritoneales de ratón tras 24 h de cultivo.

- Preparación de tioglicolato al 3%

Una manera sencilla de inducir la migración de este tipo celular hacia la cavidad abdominal es mediante la inyección intraperitoneal de tioglicolato, un agente irritante que atrae gran cantidad de macrófagos y monocitos a la cavidad peritoneal. Por razones poco conocidas, este efecto proinflamatorio aumenta cuanto más tiempo ha estado preparado el tioglicolato. La solución tiene un color verdoso en el momento de la preparación, que va cambiando a marrón conforme pasa el tiempo.

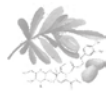
La preparación y dosificación del tioglicolato se debe realizar en un ambiente estéril, puesto que su contaminación puede producir la muerte del ratón.



- **Inyección de tioglicolato y aislamiento de los macrófagos peritoneales**

Los macrófagos primarios se aíslan a partir del exudado peritoneal de ratones hembra Balb/C proveídos de Harlan Interfauna Iberica S.L. Se inyecta por vía intraperitoneal 2 mL de tioglicolato al 3% (Anexo III.6). Además de trabajar en condiciones de esterilidad, todo el material debe estar frío. A los 4 días, cuando la mayor parte de las células de peritoneo son macrófagos (Melnicoff y cols., 1989), se sacrifican los animales con CO₂, y en cabina de flujo laminar, se procede al aislamiento de los mismos:

- Se limpia el abdomen con etanol 70%
- Se inyecta 5 mL de PBS en el abdomen.
- Se masajea el abdomen del ratón durante unos 5 min, para que el PBS se reparta de manera uniforme por el interior del peritoneo y se puedan recoger las células más fácilmente.
- Se abre el ratón mediante un pequeño corte en la línea alba, con atención de rasgar sólo la piel, y se retira cuidadosamente, evitando que se rompa la bolsa peritoneal. En su interior se encuentra el PBS que se ha inyectado previamente.
- Con una aguja del calibre 21G x 1 ½" y una jeringuilla de 10 mL se aspira el líquido del interior del peritoneo. Este líquido ha de ser turbio, pero blanco. Una coloración rosada o roja indica la presencia de sangre en el peritoneo, lo que significa que durante el proceso se ha dañado algún tejido, vena o arteria. Si presenta la apariencia adecuada, se recoge en un tubo de polipropileno de 50 mL previamente enfriado. Si el líquido aparece contaminado de sangre, se separa a un tubo de



polipropileno distinto. Cuando se haya recogido toda la suspensión de células posible, se vuelve a añadir 5 mL de PBS. En este caso, sólo es necesario un breve masaje de unos 30 s, y se vuelve a aspirar con la jeringuilla. Este proceso se repite hasta que el líquido sea transparente. Finalmente, se abre la cavidad peritoneal por completo, y se recoge todo el PBS remanente. Durante todo este proceso, las células deben estar en hielo.

Al terminar, los tubos de polipropileno se rellenan hasta 50 mL con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) glutaMAX™ 1 g/L de glucosa, suplementado con 10% de SFB y 1% antibiótico. Se centrifugan a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C, se retira el sobrenadante por decantación y se disgrega el pellet. Para la lisis de eritrocitos, se añaden 5 mL de NaCl al 0,2% estéril, 5 mL de NaCl al 1,6% estéril, y 10 mL de medio. Es importante mezclar bien en el momento que se añade cada reactivo. Los tubos de polipropileno se centrifugan a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet con medio DMEM glutaMAX™ 1 g/L de glucosa, suplementado con 10% de SFB y 1% antibiótico. Se procede al conteo celular mediante el contador ZM™ Coulter Counter®, y se siembran en una placa a una densidad de acuerdo con el experimento a realizar (6, 12, 24 o 96 pocillos).

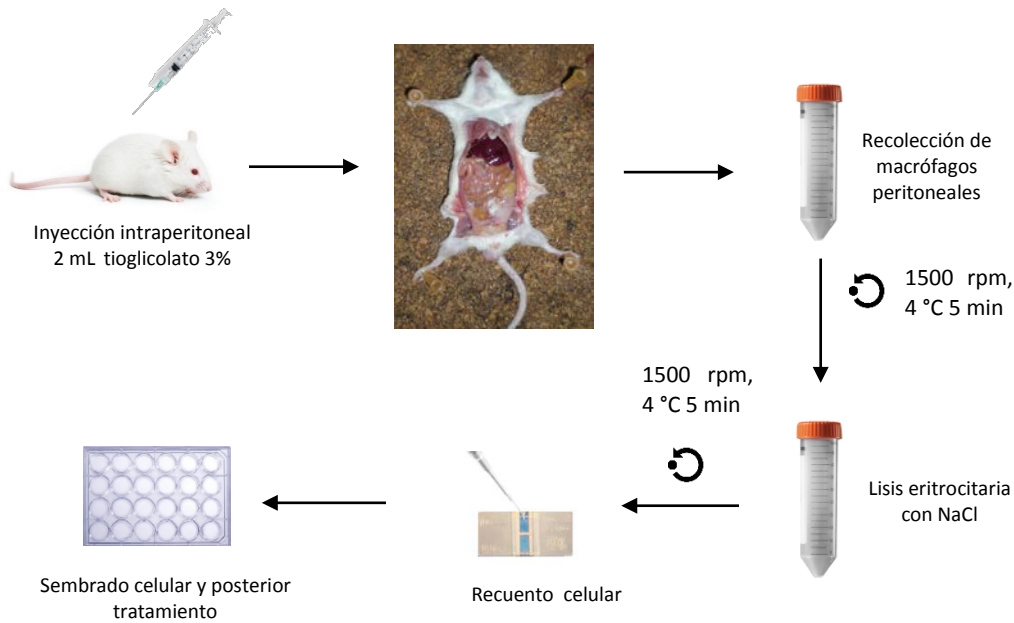


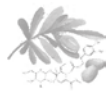
Figura 13. Esquema del protocolo de extracción de macrófagos peritoneales

III.3.1.2. Línea celular IEC-18

Las IEC-18 es una línea celular que proviene del íleon del intestino de rata (*Rattus norvegicus*). Estas células proceden de la Colección Americana de Cultivos Celulares (American Type culture collection, ATCC, Manassas, VA, USA) y fueron proporcionadas por la unidad de cultivos del SCSIE de la Universitat de València.

Las IEC-18 son adherentes y crecen fijadas en la base del frasco formando islas, sin llegar al 100% de confluencia. Para su mantenimiento, las células se siembran en frascos de una superficie de 75 m², en medio DMEM glutaMAX™ 4,5g/L de glucosa, suplementado con 20% SFB y 1% de antibiótico y se mantienen a 37 °C y en una atmósfera controlada al 5% CO₂ y 95% de humedad en un incubador celular.

Cuando la confluencia es entre 70-80%, se realiza el pase celular a un frasco nuevo. Para ello, las células se lavan dos veces con PBS, se añade 2,5



mL de 0,25% tripsina – 0,53 mM de EDTA y se incuban a 37 °C durante 5 min. Tras comprobar que las células están despegadas de la base del frasco, se añade 8 mL de medio completo para inactivar la tripsina, se toma 1 mL y se pasa a un frasco nuevo o se procede al conteo mediante el contador ZM™ Coulter Counter®. Para los estudios llevados a cabo en este experimento, las células deben encontrarse entre los pases 18-22.

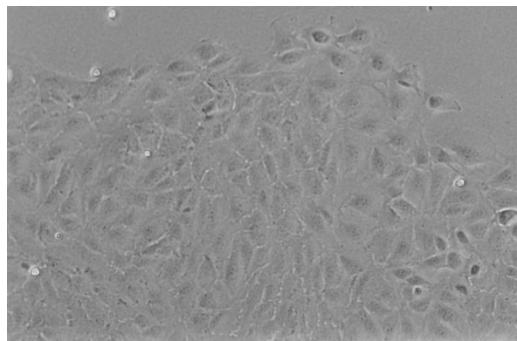


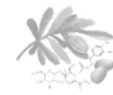
Figura 14. Cultivo celular IEC-18.

III.3.2. Procedimientos experimentales

III.3.2.1. Macrófagos peritoneales de ratón Balb/C

- Ensayo de citotoxicidad por MTT

Este método fue descrito por primera vez por Mosmann (1983) y es ampliamente utilizado en estudios de viabilidad celular. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), a través de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, a formazán, un compuesto azulado cuya concentración cuantificada espectrofotométricamente es directamente proporcional al número de células vivas. En este caso, se mide la toxicidad de los productos de interés a las 24 h. Es una de las primeras



pruebas que se deben realizar, ya que si los productos son citotóxicos, los resultados obtenidos pueden estar falseados.

Una vez hecho el recuento, en una placa de 96 pocillos se siembran 200 μL de suspensión celular a una concentración de 3×10^5 células/mL y se tratan con oleuropeina o hidroxitirosol (10, 25, 50 y 100 μM). A las 24 h, se retira el medio, y se añade al pocillo 100 μL de 0,5 mg/mL de MTT disuelto en medio DMEM o PBS. Se incuba la placa a 37 °C durante 1 h aproximadamente, se elimina el sobrenadante y se añaden 200 μL de DMSO para disolver los cristales de formazán. La placa se deja unos 10 min en el baño de ultrasonidos para facilitar la disolución de los cristales y se lee la absorbancia a 490 nm. Se seleccionan aquellas concentraciones cuya viabilidad celular sea superior al 95%, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \left(\frac{(Ab - Ap)}{Ab} \right) \times 100$$

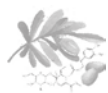
Siendo,

Ab = absorbancia del blanco

Ap = absorbancia del problema



Figura 15. Esquema del protocolo de MTT.

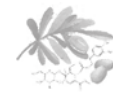


- Tratamiento celular

Tanto oleuropeina como su metabolito, hidroxitirosol, son solubles en el medio de cultivo a las concentraciones utilizadas (rango entre 10-100 μM). Para estimular las células se utiliza el LPS, un componente de la pared de las bacterias Gram negativas que estimula diferentes tipos celulares, activando distintas vías de señalización, como NF- κB o MAPK. Los macrófagos aislados se siembran en placas de cultivo a una densidad específica para cada experimento y se sigue el procedimiento descrito en la siguiente tabla:

Tabla 7. Protocolo de tratamiento celular de los macrófagos peritoneales de ratones Balb/C.

Etapas	Tiempo
Incubación con medio DMEM glutaMAX™ 1 g/L de glucosa, suplementado con 10% de SFB y 1% antibiótico, a 37 °C en atmósfera humidificada con CO ₂ al 5%.	2 h
Sustitución del medio por DMEM glutaMAX™ 1 g/L de glucosa, suplementado con 0,5% de SFB y 1% antibiótico.	2 h
Tratamiento celular con oleuropeina (10, 25, 50 y 100 μM) o hidroxitirosol (10, 25, 50 y 100 μM) disueltos en medio DMEM glutaMAX™ 1 g/L de glucosa, suplementado con 0,5% de SFB y 1% antibiótico.	1 h
Estimulación con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en DMEM glutaMAX™ 1 g/L de glucosa, suplementado con 0,5% de SFB y 1% antibiótico.	30 min - 24 h



- **Determinación de NO**

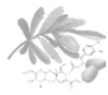
Como se ha explicado en el apartado III.2.3.1, la medida de los niveles de nitritos mediante el reactivo Griess es una forma sencilla e indirecta de determinar NO. Si no existen nitritos en el medio, el sobrenadante pasa de un color rosáceo a un color amarillento. En cambio, el color permanece rosado si se detectan nitritos.

En una placa de 96 pocillos, se siembran 200 μL de suspensión celular a una concentración de 3×10^5 células/mL, se tratan con oleuropeina o hidroxitirosol a 10, 25, 50, 100 μM , y tras 1 h se estimulan con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentración final) durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se recogen 100 μL de sobrenadante, se hacen reaccionar con 100 μL de reactivo Griess y se mide la absorbancia a 570 nm, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.3.1.

- **Determinación de la expresión génica de citocinas por RT-PCR**

La PCR permite detectar fragmentos de ADN en la célula, cuantificar el grado de expresión génica ante un estímulo, y si se ve afectada por la adición de un producto. Así pues, se puede determinar si éste actúa sólo sobre el proceso final de la traducción de proteínas y su posible difusión al exterior, o bien, su mecanismo de acción se sitúa en un eslabón anterior en el proceso de activación de la célula, afectando a la transcripción génica.

Se siembran 1 mL de una suspensión 1×10^6 células/mL en una placa de 12 pocillos, las células se tratan con 100 μM de oleuropeina o 50 y 100 μM de hidroxitirosol, y tras 1 h se estimulan con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Transcurridas 3 h, se elimina el sobrenadante y se añaden 350 μL de tampón RLT (Kit Quiagen) con β -mercaptoetanol al 1% al pocillo. Este producto



desnaturaliza las proteínas, haciendo que las células se despeguen de la base de la placa. Se recoge la muestra en un eppendorf y se guarda a -80°C .

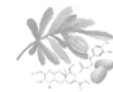
Para la extracción de ARN, conversión a ADNc, amplificación, y separación de fragmentos de ADN se sigue el protocolo descrito en el apartado III.2.6.6.

- **Determinación de la producción de citocinas por inmunoensayo**

Los macrófagos, tras el estímulo, sintetizan mediadores extracelulares que son liberados al medio y cuya función es, principalmente, modular la respuesta inmunológica. Entre estos, se encuentran las citocinas, un grupo de proteínas encargadas de activar otros tipos celulares involucrados en un proceso inflamatorio, y cuya concentración en el medio se puede utilizar para determinar si un producto posee actividad antiinflamatoria. La técnica ELISA es un método muy utilizado para detectar proteínas específicas en una muestra.

Se siembra 1 mL de una suspensión celular de 1×10^6 células/mL en una placa de 12 pocillos, se tratan las células con $100 \mu\text{M}$ de oleuropeina o 50 y $100 \mu\text{M}$ de hidroxitirosol durante 1 h, y se estimulan con LPS ($1 \mu\text{g/mL}$). A las 24 h, se recogen los sobrenadantes, se centrifugan a 1500 rpm durante 5 min a 4°C , y se guardan a -80°C . El ensayo de ELISA de las citocinas IL-6, IL- 1β , IFN- γ y TNF- α se realiza según el esquema del apartado III.2.6.2. Sin embargo, en el caso de los macrófagos peritoneales, existen algunas modificaciones con respecto al protocolo:

- Para IL- 1β e IFN- γ , las muestras se utilizan directamente, sin diluir, y el periodo de incubación es toda la noche a 4°C .



- Para IL-6 y TNF- α , las muestras se diluyen 1/100 y la incubación es 2 h a temperatura ambiente.

- **Determinación de proteínas por western blot**

Mediante la técnica de western blot se puede detectar la presencia o ausencia de una determinada proteína en la célula, la expresión de la misma de forma semicuantitativa, e incluso cambios estructurales, como pueda ser dimerizaciones o fosforilaciones.

Se siembran 2 mL de una suspensión celular con 1×10^6 células/mL en una placa de 12 pocillos, las células se tratan con 100 μ M de oleuropeina, 50 y 100 μ M de hidroxitirosol, y tras 1 h se estimulan con LPS (1 μ g/mL). Según la vía de activación o la proteína objeto de estudio, los tiempos y las fracciones celulares para la obtención de las muestras varían:

Tabla 8. Proteínas detectadas mediante western blot en macrófagos peritoneales de Balb/C.

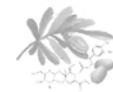
Proteína	Tiempo de estímulo	Fracción
COX-2	24 h	Citosólica
iNOS	24 h	Citosólica
STAT3/p-STAT3	30 min	Citosólica
p65 NF- κ B	1 h	Nuclear

En todos los casos, las células se recogen con 1 mL de PBS y con la ayuda de un raspador celular, se centrifugan a 1500 rpm 5 min a 4 °C, se retira el sobrenadante, y con el pellet se siguen dos métodos para la extracción de proteínas:



- Para la detección de p65 en el núcleo y la fosforilación de STAT3 en el citoplasma, se necesitan fracciones celulares separadas, por lo tanto se utiliza un kit de extracción diferencial (Proteojet) siguiendo las instrucciones del fabricante. El pellet resultante de células se resuspende con 80 μ L de *Cell lysis Buffer* suplementado con DTT 1 mM, un coctel de inhibidor de proteasas (Complete[®]), NaF 25 mM y Na₂VO₄ 2 mM. Tras 10 min de incubación en hielo, se centrifugan las muestras 2500 rpm durante 7 min a 4 °C, y se recoge el sobrenadante, que corresponde a la **fracción citoplasmática**. El pellet resultante se resuspende con *Nuclei Washing buffer*, se centrifuga (2500 rpm durante 7 min a 4 °C), se elimina el sobrenadante y se añade *Nuclei storage buffer* suplementado igualmente con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Finalmente, se añade un volumen de 1:10 de *Nuclei lysis reagent* y se mantiene en agitación durante 15 min a 4 °C. Tras centrifugar a la máxima velocidad durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante resultante corresponde a la **fracción nuclear**.
- Para la determinación de COX-2 o iNOS, no es necesaria una extracción diferencial, por lo que utilizaremos el tampón Laemmli (Anexo III.1): se añaden 100 μ L de tampón por 1 x 10⁶ células/mL. Se sonicán 3 veces durante 10 s, se hierven 5 min, se centrifugan a 14000 rpm durante 10 min, y se recogen el sobrenadante. Se guarda a – 80 °C. A diferencia del resto de extracciones, el paso de desnaturalización de las muestras tratadas con Laemmli no es necesario para western blot, ya que contiene β -mercaptoetanol.

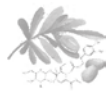
A partir de la extracción proteica, se siguen los apartados III.2.6.4 y III.2.6.5 para el tratamiento de las muestras y la técnica de western blot.



- **Activación de la subunidad p65 NF-κB por inmunofluorescencia**

La técnica de inmunofluorescencia permite visualizar los cambios producidos en la célula mediante la adición de anticuerpos acoplados a fluorocromos. En este caso, se intenta determinar la activación y la localización de la subunidad p65 NF-κB en los macrófagos tras la adición de un estímulo, LPS, y el efecto que tiene al añadir hidroxitirosol. Oleuropeina no se ensaya porque se observa mediante WB que no inhibe el p65.

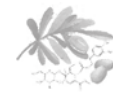
Se siembran 5×10^5 células/pocillo en microcámaras tipo *Lab-Tek*TM Chamber SlideTM, las células se tratan con 100 μM de hidroxitirosol, y se estimulan con LPS (1 μg/mL) durante 1 h. A continuación, se elimina el medio y se fijan las células con una mezcla de metanol y ácido acético (95:5) durante 20 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras esta incubación, las células se lavan dos veces con PBS y se incuban 18 h con tampón permeabilizante PBS-Tritón X-100 al 0,3%. Transcurrido este tiempo, las células se bloquean mediante BSA 0,5% disuelto en agua con 0,1% de Tritón X-100 durante 15 min a T ambiente, y se incuban con el anticuerpo primario anti-p65, a una dilución de 1/500 en BSA 1% con 0,1% de Tritón X-100, durante 2 h en una cámara de humectación y a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se lavan tres veces con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 5 min, y se incuban con el anticuerpo secundario, Alexa fluor[®] anti-IgG mouse a una dilución de 1/1000 en BSA 1% con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 40 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en cámara oscura de humectación. Tras repetir los lavados, los núcleos de las células se co-tiñen con DAPI a una concentración de 1 μg/mL durante 10 min en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las células se lavan con PBS-Tritón X-100 al 0,1%, se añade el medio de montaje Vectashield[®] y se tapa con un cubreobjetos. Las imágenes se obtienen a través de un microscópico (Eclipse E800, Nikon Instruments



Europe), conectado a una fuente de luz UV, una cámara fotográfica y el programa ACT-1 (Nikon Instruments Europe).

III.3.2.2. Línea celular IEC-18

La principal función del epitelio intestinal es actuar como barrera frente a la entrada de sustancias nocivas para el organismo. Sin embargo, debido a algunas enfermedades, interacciones con la microbiota o incluso la propia digestión normal, se producen daños que afectan a la estructura epitelial y se produce la penetración de factores tóxicos e inmunogénicos, desencadenando un proceso inflamatorio y provocando un desequilibrio en la homeostasis del huésped. Todo esto implica la necesidad de activar procesos de regeneración para reestablecer el epitelio, cuyos mecanismos dependen de un preciso balance entre migración, proliferación y diferenciación de las células adyacentes a la zona afectada. El proceso de cicatrización se puede dividir en tres fases: restitución, proliferación y diferenciación epitelial. Tras la aparición del daño, las células epiteliales que rodean la herida migran rápidamente para cubrir el área dañada. Durante este proceso, llamado restitución epitelial, estas células se vuelven a diferenciar, presentando estructuras en forma de pseudópodos y reorganizando su citoesqueleto. Estos cambios desaparecen al cerrar la herida. La restitución comienza tras unos minutos hasta unas horas después del daño, y la proliferación celular no se requiere durante esta fase, pero sí en el paso siguiente. Tras recubrir la herida, se ponen en marcha mecanismos de proliferación para recuperar el *pool* de células perdidas tras el daño. Por último, se necesita la maduración y diferenciación celular para reestablecer la correcta función de la barrera epitelial intestinal. Si bien, aunque la cicatrización *in vivo* es mucho más compleja, ya que participan



un amplio espectro de factores reguladores, como citocinas, moléculas de adhesión o neuropéptidos, este proceso descrito ofrece una visión simplificada y esquemática de la cicatrización para su posterior estudio.

Para determinar el efecto migratorio y cicatrizante de oleuropeina se utiliza el método *in vitro* de herida en placa. Para ello, se siembran las células IEC-18, con una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/mL en placas tipo TC DISH 60x15 SI con medio DMEM GlutaMAX™ 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 20% de SFB y 1% antibiótico, a 37 °C y en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Tras 24 h, y sobre las células ya confluentes, se realiza una herida con un raspador celular, se lavan dos veces con PBS para eliminar las células despegadas, y se añade 1 mL de medio DMEM suplementado con 0,5% de SFB y 1% antibiótico. A continuación, se tratan las células con oleuropeina 10 y 100 μM, y como control, se usa la dexametasona 10 μM, ya que los glucocorticoides dificultan el proceso de cicatrización. La migración se determina mediante el recuento de células IEC-18 que cruzan el borde de la herida desde el tiempo inicial (0 h) hasta las 24 h en un área definida tomando fotografías a 200x de magnificación con el microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-S acoplado a una cámara Nikon F-601. La cuantificación de células se determina mediante el programa informático Image J.

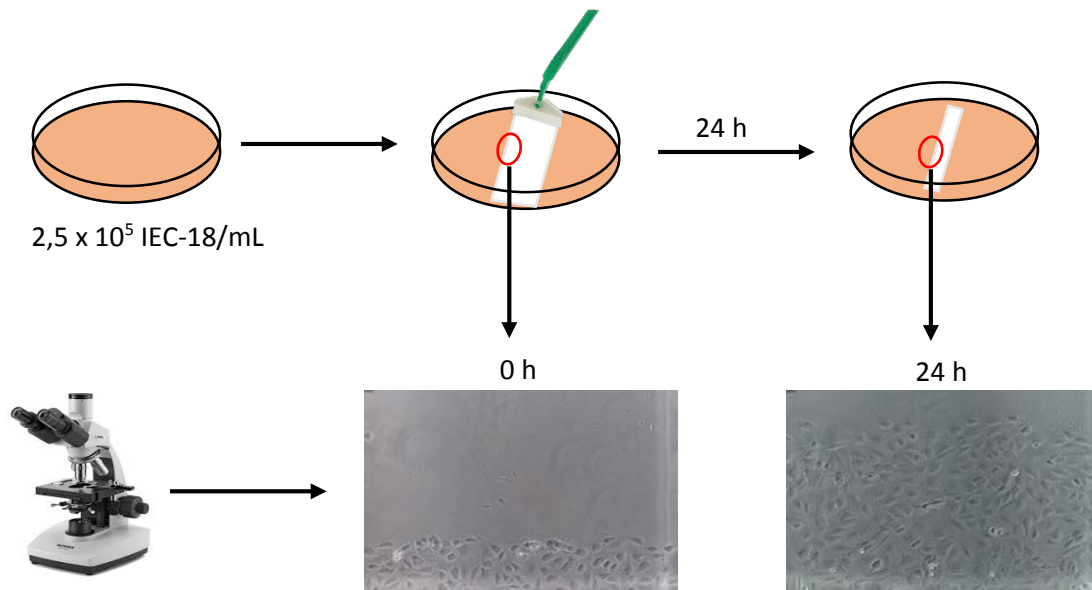
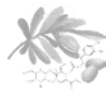


Figura 16. Esquema del protocolo de cicatrización celular.

- Ensayo de proliferación celular

Como ya se ha comentado anteriormente, durante el proceso de migración no hay proliferación. Es por ello, que para observar el efecto cicatrizante de un producto, hay que estudiar el efecto del mismo sobre la proliferación celular, ya que, se podría cerrar la herida debido a un aumento del número de células y no a la migración en sí, lo que podría inducir a error. Se utiliza en este caso, el ensayo por MTT que determina la proliferación celular a las 24 h de sembrado. Se siembran 2×10^5 células/mL en una placa de 96 pocillos con medio DMEM glutaMAX™ 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 20% de SFB y 1% antibiótico. Tras 2 h, se retira el medio y se añade medio DMEM con 0,5% de SFB y antibiótico, y 1 h después se tratan las células con oleuropeina 100 y 200 μM . Tras 24 h, se elimina el medio y se determina la proliferación celular según el apartado III.3.2.1.

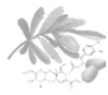


- Tratamiento celular

Las células epiteliales intestinales son capaces de responder a agentes externos mediante la activación de diferentes vías de señalización, desencadenando un proceso inflamatorio y liberando diferentes mediadores. Así, tras comprobar que oleuropeina y SB 203580, un inhibidor de la vía p38 MAPK, son solubles en el medio de cultivo a las dosis usadas y realizar el conteo celular, para el tratamiento y posterior estimulación se sigue el esquema escrito en la siguiente tabla:

Tabla 9. Protocolo de tratamiento celular de IEC-18.

Etapas	Tiempo
Incubación con medio DMEM glutaMAX™ 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 10% de SFB y 1% antibiótico, a 37 °C en atmósfera humidificada con CO ₂ al 5%.	24 h
Sustitución del medio por DMEM glutaMAX™ 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 0,5% de SFB y 1% antibiótico.	2 h
Tratamiento celular con oleuropeina (100 µM) y SB 203580 (10 µM) disueltos en medio DMEM glutaMAX™ 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 0,5% de SFB y 1% antibiótico.	1 h
Estimulación con LPS 1 µg/mL en DMEM glutaMAX™ 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 0,5% de SFB y antibiótico.	30 min - 24 h



- **Detección de la fosforilación de p38 MAPK y la expresión de COX-2 mediante western blot**

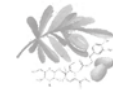
Las células IEC-18 se siembran en placas de 6 pocillos, con una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/mL, se pretratan con SB 203580 $10 \mu\text{M}$ y con oleuropeina $100 \mu\text{M}$, y 1 h después se estimulan las células con LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 min para determinar la fosforilación de p38 MAPK, y durante 24 h para detectar la expresión de COX-2. Transcurrido este tiempo, se elimina el medio, se adiciona 1 mL de PBS al pocillo y con la ayuda de un raspador se recogen las células. Se centrifugan a 1500 rpm durante 5 min a 4°C , y se procede a la extracción proteica.

Tal y como se ha mencionado anteriormente en el apartado III.3.2.1, para la detección citoplásmica de p-p38 MAPK se utiliza un kit de extracción diferencial (Proteojet) siguiendo las instrucciones del fabricante; para la detección de COX-2, las proteínas se extraen mediante el tampón Laemmli.

Una vez obtenidas las fracciones proteicas de interés, se sigue el protocolo descrito en el apartado III.2.6.5.

- **Determinación de ARNm de Anexina A1 mediante RT-PCR**

Se siembran las IEC-18 a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/mL en una placa de 6 pocillos. Las células se pretratan durante 1 h con SB 203580 ($10 \mu\text{M}$) y con oleuropeina a $100 \mu\text{M}$ y se estimulan con LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$). Transcurridas 4 horas, se retira el sobrenadante y se recogen las células con $350 \mu\text{L}$ de tampón RLT con β -mercaptoetanol al 1%. Se depositan en un eppendorf y se congelan a -80°C para su posterior uso. Para la extracción de ARN, conversión a ADNc, amplificación, y separación de fragmentos de ADN Se sigue el protocolo descrito en el apartado III.2.6.6.



III.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

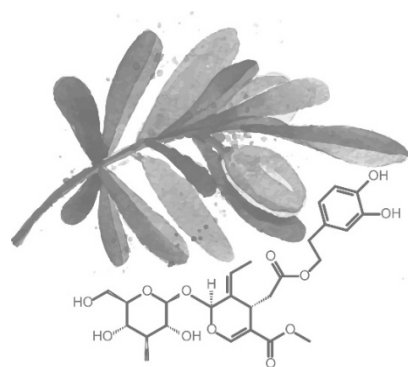
Los resultados se expresan mediante la media aritmética de los valores \pm error estándar de la media (E.E.M.). Para los cálculos de los valores y el posterior análisis estadístico, se utilizan los programas informáticos Microsoft Excel 2013 y Graph Pad Prism 4.0. La significación estadística de las diferencias entre cada grupo se determina mediante el análisis de varianza simple ANOVA, seguido del test de t de Dunnett.

El test de ANOVA indica si hay o no hay diferencias estadísticas entre los distintos grupos mediante el cálculo del valor p . Así, al obtener un valor de $p < 0,05$ se considera que las diferencias entre los grupos son significativas. Sin embargo, ANOVA no informa de que grupos son diferentes entre sí. Para ello, se utiliza el 'post test' de la t de Dunnett, donde se compara un grupo control elegido con el resto.

La simbología utilizada para representar la significación estadística en la presente tesis se describe a continuación:

- Respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$
- Respecto al grupo tratado (DSS, AOM/DSS, LPS): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Resultados





IV.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE OLEUROPEINA

Tras el aislamiento y purificación de oleuropeina (3,25 g) a partir de 1 kg de hoja triturada de olivo se procede a su identificación por comparación con el patrón mediante cromatografía de capa fina de silicagel y fase móvil diclorometano-acetato de etilo (8:2). Finalmente, se confirma su estructura química mediante resonancia magnética nuclear de protón y carbono por comparación con los datos espectroscópicos previamente descritos (Garibaldi y cols., 1986).

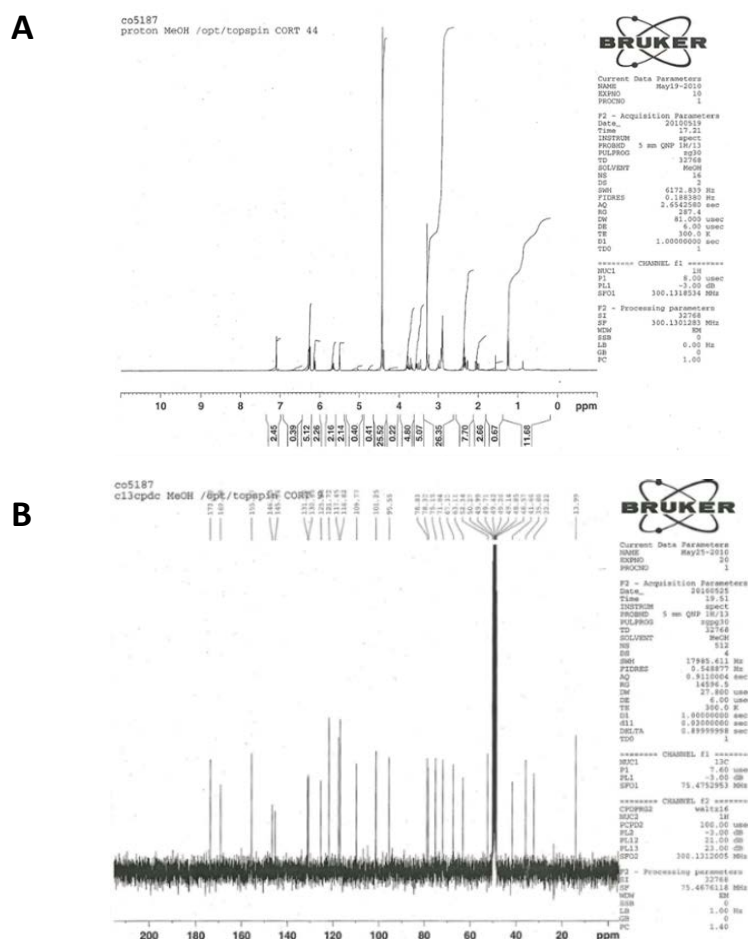


Figura 17. Espectros de A) $\text{RMN-}^1\text{H}$ y B) $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de oleuropeina



Dado el rendimiento (0,3 % p/p) y coste del proceso de extracción y aislamiento de oleuropeina, y la cantidad requerida para las pruebas farmacológicas, se opta por adquirirla en el comercio.

IV.2. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA *IN VIVO*

IV.2.1. Efecto sobre la CU inducida por DSS al 5% en ratones Balb/C

Previamente al experimento definitivo, se comprueba que los animales comen el pienso manipulado de forma normal. El consumo medio de un ratón es de 4 g/día, que coincide con el observado en los animales que reciben la dieta con oleuropeina al 1% (p/p).

IV.2.1.1. Estudio macroscópico

La inflamación intestinal se induce a través de la administración de DSS al 5% en agua de bebida durante 7 días en ratones Balb/C. Tras comprobar que la administración de oleuropeina al 1% en el pienso durante 7 días no afecta a la viabilidad de los animales, se evalúa su efecto antiinflamatorio en colitis aguda. En el grupo DSS, durante los tres primeros días no se observa ningún cambio de comportamiento en los animales, el peso, la ingestión de bebida y dieta son normales y las heces son duras. Entre el cuarto y el quinto día, los animales presentan una ligera pérdida de peso, las heces comienzan a ser blandas, y se acompaña de una pequeña disminución en la ingesta de comida. Es a partir del sexto día cuando la pérdida de peso se acentúa, los animales reducen su actividad motora, tomando un aspecto más enfermizo, el pelo se eriza, y aparece diarrea y sangre en heces (Figura 18B y C). En los casos en los que la diferencia de peso es superior al 20% con respecto al inicial, se procede al sacrificio del



animal. Estos síntomas se retrasan en los animales tratados con oleuropeina al 1% en la dieta, presentando un comportamiento más activo. La presencia de diarrea y sangre en heces es más leve en el sexto día y el peso no desciende hasta pasado el sexto día, observando una tendencia al alza no significativa con respecto al grupo DSS. El aspecto visual de los animales durante el experimento manifiesta que el tratamiento con oleuropeina mejora en general el estado de la enfermedad (Figura 18D).

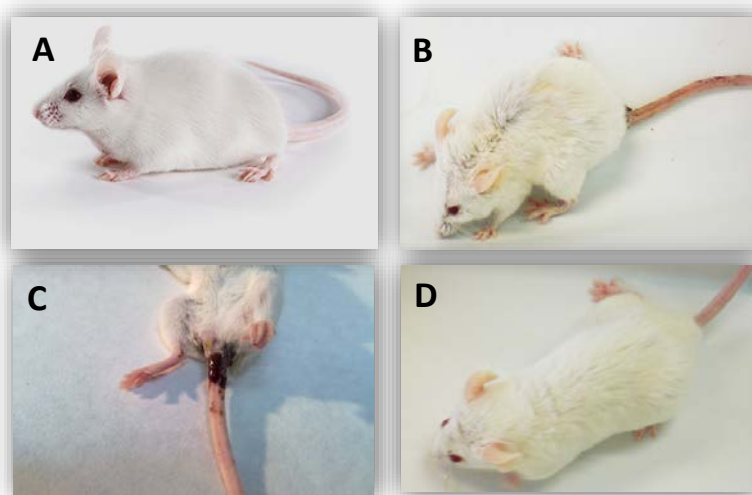


Figura 18. Aspecto de los animales. (A) Grupo Control, (B y C) grupo DSS, (D) grupo DSS+Oleuropeina

La dosis diaria consumida por animal se calcula mediante la resta del pienso remanente cada día. Teniendo en cuenta que cada animal consume aproximadamente 4 g al día, se calcula que toma 2,4 g oleuropeina/kg por día, que en humanos es equivalente a 194 mg/kg, de acuerdo con la fórmula de equivalencia humana descrita en el apartado III.2.2. El volumen total ingerido de DSS al 5% por los animales tratados con oleuropeina es similar al grupo DSS, con 3,85 mL/ratón/día (195 mg de DSS/ratón/día), frente a los 4,15 mL/ratón/día, en el caso del grupo DSS (205 mg de DSS/ratón/día).



El acortamiento del colon y el edema son dos signos característicos de la colitis en este modelo. Tras el sacrificio, se extrae el colon de los animales, se miden, se pesan y se examinan macroscópicamente. En los animales que han recibido sólo DSS se observa diarrea, sangre en el lumen del intestino, un adelgazamiento de la pared intestinal con respecto al grupo control, e incluso algunas ulceraciones. El colon está mucho más acortado e incrementa su peso, que tras calcular el parámetro mg/cm, indica la presencia de edema. En cambio, el colon de los animales tratados con oleuropeina presentan mejor aspecto, pared más engrosada, heces más formes y menor presencia de sangre. La longitud del colon se acerca más al grupo sano y el edema es menor que en el grupo DSS (Tabla 10 y Figura 19).

Tabla 10. Efecto de oleuropeina (O) en CU inducida por DSS al 5%. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=10$).

	Peso animales (g \pm E.E.M.)			% pérdida peso	Longitud (cm \pm E.E.M.)	Edema (mg/cm \pm E.E.M.)
	Día 0	Día 4	Día 8			
CONTROL	19,98 \pm 0,52	20,51 \pm 0,38	20,48 \pm 0,45	-	8,59 \pm 0,28**	21,09 \pm 1,23**
DSS	19,47 \pm 0,30	19,64 \pm 0,19	16,8 \pm 0,67	14	5,31 \pm 0,14##	40,70 \pm 1,77##
DSS+O	19,40 \pm 0,25	19,30 \pm 0,15	17,8 \pm 0,29	8	6,66 \pm 0,22**,,##	29,07 \pm 0,77**,,#

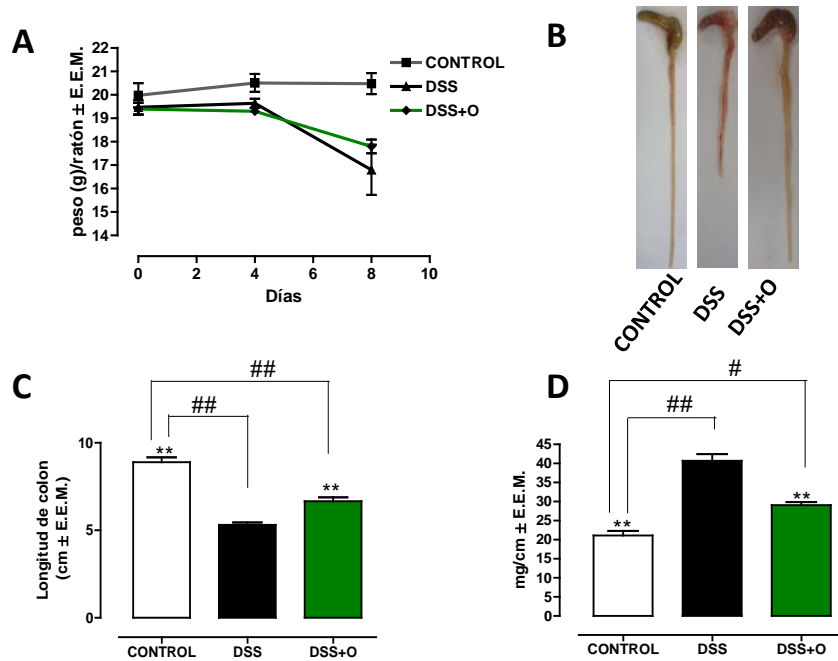


Figura 19. Efecto de oleuropeina (O) en CU inducida por DSS al 5%. (A) Media de la variación de peso durante el experimento. (B) Imagen representativa del colon de cada grupo. (C) Longitud del colon. (D) Parámetro mg/cm. Cada barra/punto representa la media \pm E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: $**p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: $\#p < 0,05$, $##p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=10$).

El IAE es un factor acumulativo que indica la severidad de la colitis y tiene en cuenta la pérdida de peso, la sangre en heces y la diarrea. Tal y como se observa en la Tabla 11 y Figura 20, oleuropeina reduce el IAE de forma significativa (42%) con respecto al grupo DSS. El grupo control no se representa debido a que en todos los parámetros, el valor corresponde a 0.

Tabla 11. Efecto de oleuropeina (O) sobre el IAE en CU inducida por DSS al 5%. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: $**p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=10$).

	Pérdida de peso	Sangre en heces	Diarrea	IAE
DSS	2,56 \pm 0,43	2,65 \pm 0,18	2,59 \pm 0,07	2,59 \pm 0,07
DSS+O	1,87 \pm 0,26	1,38 \pm 0,28**	1,50 \pm 0,21**	1,5 \pm 0,21**

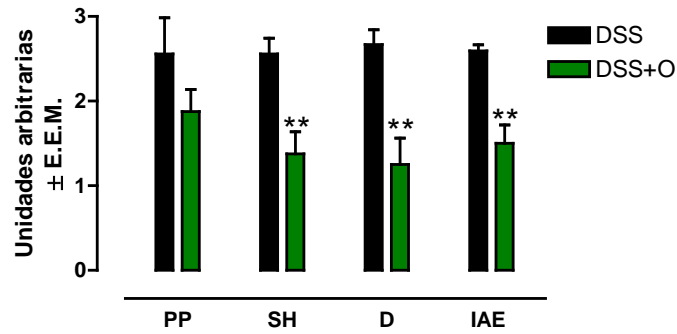
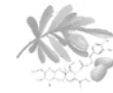


Figura 20. Efecto de oleuropeina (O) sobre el IAE en CU inducida por DSS al 5%. Cada barra representa la media de pérdida de peso (PP), sangre en heces (SH), diarrea (D) e IAE \pm E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=10$).

IV.2.1.2. Determinación de nitritos y TNF- α en cultivo intestinal *ex vivo*

En la CU, el daño se localiza principalmente en el intestino grueso, sobretudo en la parte distal del colon. Esto se comprueba al separar en cuatro secciones el intestino (proximal, media superior, media inferior y distal), y medir distintos mediadores inflamatorios en el sobrenadante de un cultivo *ex vivo*. En este caso, se determina la presencia de nitritos espectrofotométricamente mediante el reactivo de Griess y TNF- α por ELISA en los sobrenadantes obtenidos del cultivo *ex vivo*. Según se observa en la Tabla 12 y la Figura 21, la concentración total de nitritos y de TNF- α está aumentada en los intestinos de los animales tratados con DSS, y la diferencia con respecto al grupo control aumenta a medida que se descende hacia la parte distal. El tratamiento con oleuropeina reduce la liberación de nitritos alrededor de un 90% en todas las partes, y TNF- α , siendo más significativo en la parte media inferior, con un 61%.

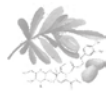


Tabla 12. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de nitritos y de TNF- α en cultivo *ex vivo* de colon. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=3$).

Nitritos (μM) \pm E.E.M.				
	Proximal	Media superior	Media inferior	Distal
CONTROL	113 \pm 18**	186 \pm 21	133 \pm 23**	139 \pm 32**
DSS	4465 \pm 626###	3031 \pm 2412	3711 \pm 1370###	8082 \pm 1578###
DSS+O	370 \pm 40**	357 \pm 32	423 \pm 117**	405 \pm 103**

TNF- α (pg/mL) \pm E.E.M.				
	Proximal	Media superior	Media inferior	Distal
CONTROL	133 \pm 21*	212 \pm 41	228 \pm 53**	220 \pm 70**
DSS	338 \pm 49#	765 \pm 125###	1522 \pm 463###	1343 \pm 167###
DSS+O	153 \pm 53*	437 \pm 75	599 \pm 163**	898 \pm 233*

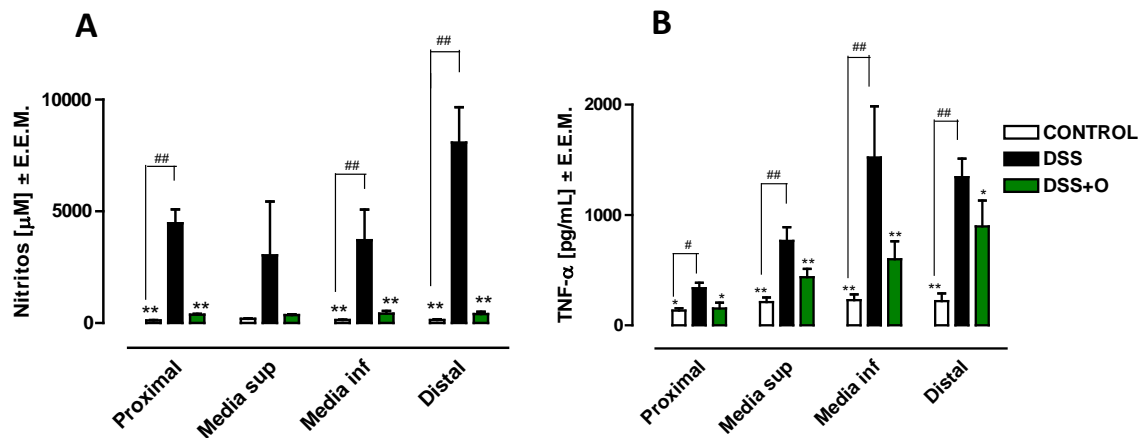


Figura 21. Efecto de oleuropeina (O) sobre los niveles de (A) nitritos y de (B) TNF- α en cultivo *ex vivo* de colon en CU inducida por DSS al 5%. Cada barra representa la media \pm E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=3$).

IV.2.1.3. Análisis histológico

Tras 7 días de exposición a DSS al 5%, el análisis histológico del colon de los animales tratados con DSS muestra características histopatológicas típicas de la CU (Figura 22A y B). Sin embargo, estas lesiones se ven mucho más atenuadas en aquellos procedentes de los animales tratados con oleuropeina (Figura 22C y D).

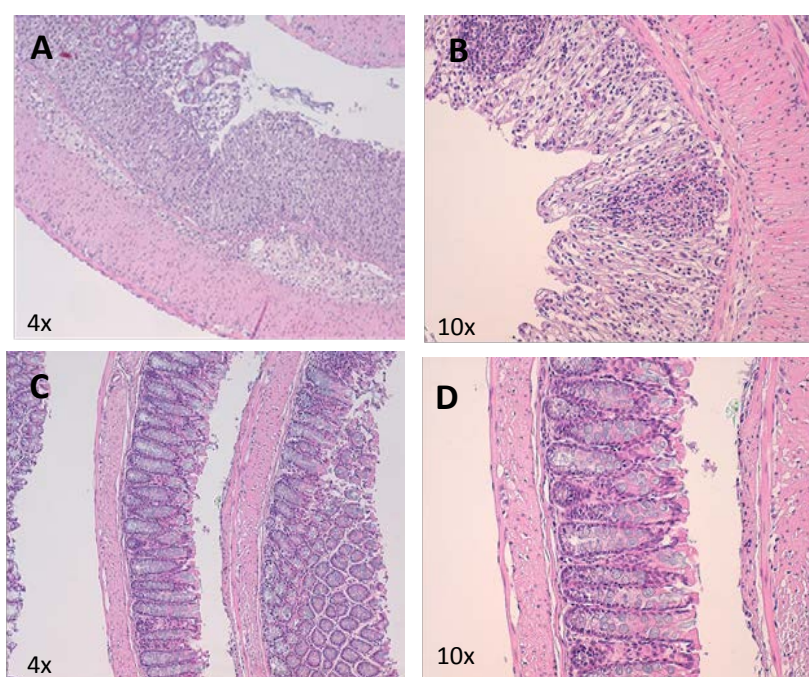


Figura 22. Imágenes representativas del análisis histológico de CU inducida por DSS al 5%. (A y B) grupo DSS, (C y D) grupo DSS+Oleuropeina.

IV.2.1.4. Infiltración neutrofílica

Durante un proceso inflamatorio, mediadores como las citocinas, prostaglandinas o EROs dañan la función intestinal epitelial y permiten el reclutamiento masivo de células inflamatorias al lugar del daño. La medida espectrofotométrica de la actividad MPO en las muestras pulverizadas de colon, permite determinar el grado de infiltración neutrofílica en el tejido inflamado. Como se observa en la Tabla 13 y en la Figura 23, la administración de DSS al 5% durante 7 días produce un aumento de la actividad MPO en el tejido de colon de los animales del grupo DSS y se reduce de forma drástica en las muestras de los animales tratados con oleuropeina (90% de inhibición), lo que junto con los datos obtenidos en el análisis histológico, confirma el efecto inhibitorio de oleuropeina sobre la infiltración neutrofílica.

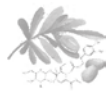


Tabla 13. Efecto de oleuropeina (O) sobre la actividad MPO en CU inducida por DSS al 5%. Significativamente diferente al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=4$).

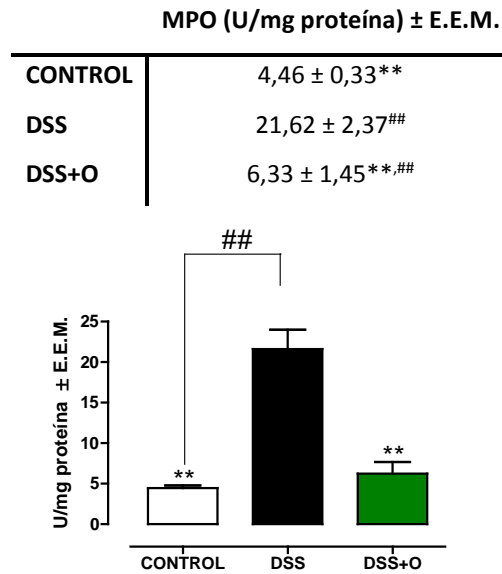


Figura 23. Efecto de oleuropeina (O) sobre la actividad MPO en CU inducida por DSS al 5%. Cada barra representa la media de la actividad MPO (U/mg proteína) \pm E.E.M. de al menos cuatro experimentos independientes. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=4$).

IV.2.1.5. Liberación de citocinas

Tras determinar la concentración en el colon pulverizado de IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-10 mediante ELISA, se observa que la producción de las tres primeras citocinas se encuentra elevada en las muestras del grupo DSS. Los animales tratados con oleuropeina presentan unos niveles más bajos de IL-6, IL-1 β y TNF- α (88%, 37% y 60% de inhibición, respectivamente), lo que implica que inhibe la liberación de estos mediadores inflamatorios (Tabla 14 y Figura 24A). En cambio, no se observan diferencias significativas en los niveles de IL-2, IL-4 e IL-10 entre el grupo control y el grupo DSS, pero sí una tendencia a aumentar los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 (19% de incremento) en los animales tratados con oleuropeina (Tabla 14 y Figura 24B).



Tabla 14. Efecto de oleuropeína (O) sobre los niveles de citocinas en CU inducida por DSS al 5%. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=4$).

(pg/mL)/mg de proteína ± E.E.M.			
	IL-6	IL-1β	TNF-α
CONTROL	51,83 ± 3,57**	60,79 ± 4,97**	13,21 ± 2,50**
DSS	100,93 ± 6,48##	174,57 ± 6,28##	37,04 ± 1,90##
DSS+O	57,48 ± 6,77**.,##	133,96 ± 9,01*.,#	21,96 ± 3,75**
	IL-2	IL-4	IL-10
CONTROL	0,54 ± 0,18	0,37 ± 0,09	0,77 ± 0,01
DSS	0,46 ± 0,19	0,35 ± 0,06	0,81 ± 0,02
DSS+O	0,52 ± 0,21	0,38 ± 0,07	0,96 ± 0,01**

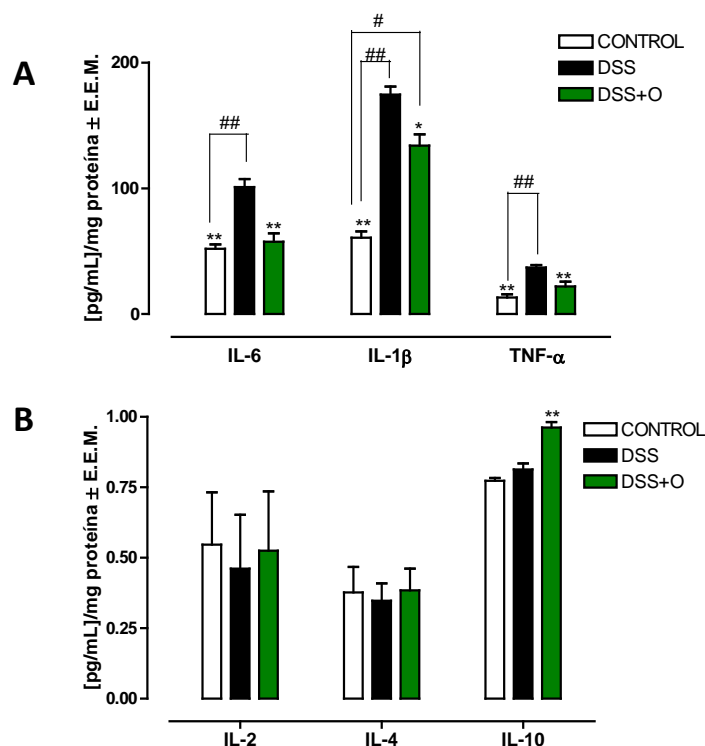
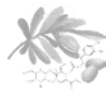


Figura 24. Efecto de oleuropeína (O) sobre los niveles de citocinas en CU inducida por DSS al 5%. Cada barra representa la media de la concentración de las citocinas (pg/mL por mg de proteína) ± E.E.M. de al menos cuatro experimentos independientes. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=4$)



IV.2.1.6. Expresión de COX-2, iNOS y MMP-9

En las biopsias de enfermos de CU, la expresión de COX-2, iNOS y metaloproteínasa (MMP)-9 se encuentra aumentada. Experimentalmente, esto también se observa por western blot en las muestras de colon de los animales tratados con DSS, y el tratamiento con oleuropeína reduce estos niveles de manera significativa (Figura 25).

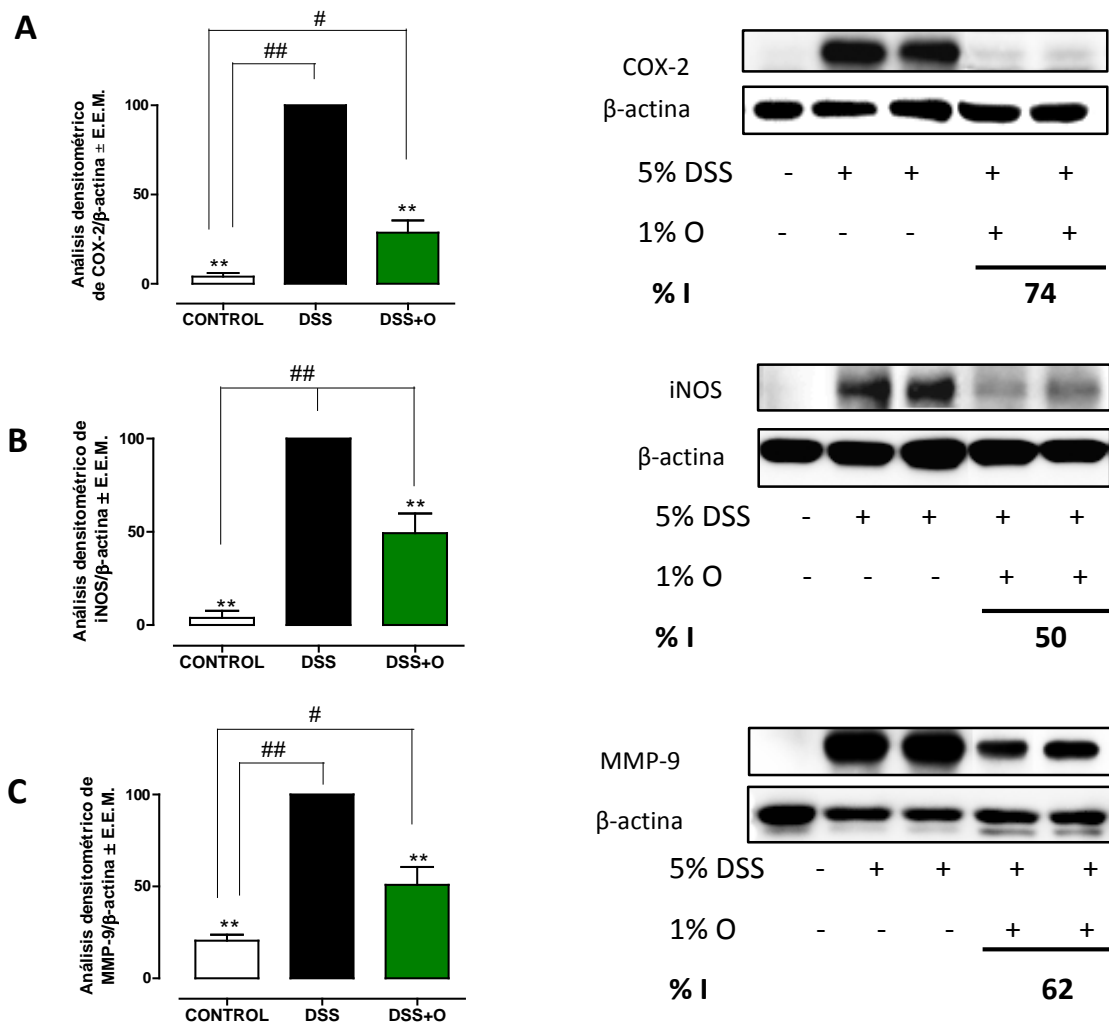
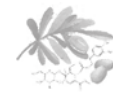


Figura 25. Efecto de oleuropeína (O) sobre la expresión de (A) COX-2, (B) iNOS y (C) MMP-9 en CU inducida por DSS al 5%. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, referidos a β -actina y considerando que el grupo DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n = 4$).



IV.2.1.7. Efecto sobre las vías NF- κ B, p38 MAPK y STAT3

Tras un estímulo, la subunidad p65 del complejo p65/p50 se fosforila y se transloca al núcleo, activando la expresión génica de distintos mediadores proinflamatorios como citocinas o proteínas como iNOS y COX-2. Además, la inhibición de NF- κ B es una de las estrategias terapéuticas propuestas para el tratamiento agudo de la EII (Yamamoto y Gaynor, 2001). Mediante el análisis de western blot, se detecta la presencia de p65 en las fracciones proteicas nucleares obtenidas de las muestras de colon, ya que implica la translocación de la subunidad, y por lo tanto, la activación de la vía de señalización. Tal y como se observa en la Figura 26, mientras que la administración de DSS aumenta los niveles de p65 nuclear, el tratamiento con oleuropeina reduce de manera significativa la presencia de esta subunidad en el núcleo, sugiriendo un efecto represor sobre la activación de esta vía de señalización.

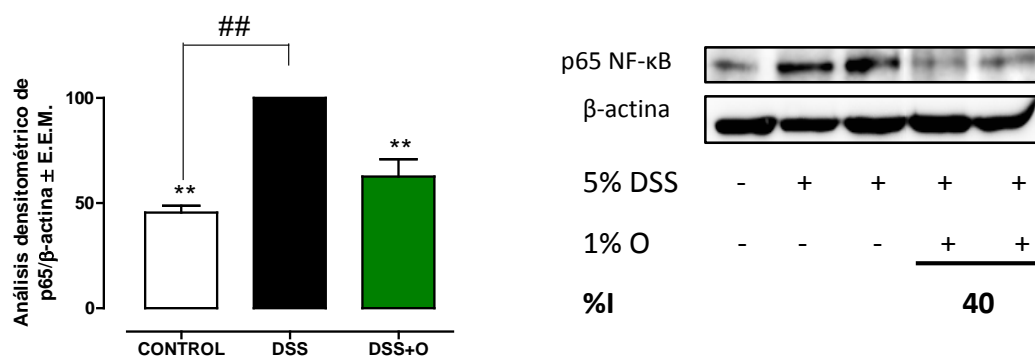
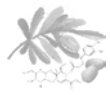


Figura 26. Efecto de oleuropeina (O) sobre la translocación nuclear de la subunidad p65 NF- κ B en CU inducida por DSS al 5%. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, referidos a β -actina y considerando que el grupo DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, $n=4$).

La activación de la vía de señalización p38 MAPK induce el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos, la liberación de IL-1 β , TNF- α e IL-



6 por macrófagos y la producción de numerosos mediadores inflamatorios por el epitelio intestinal. La forma inactiva de p38 MAPK se fosforila tras un estímulo, se transloca al núcleo y activa la transcripción génica. En las fracciones citosólicas del colon del grupo DSS se observa un aumento en la fosforilación de la subunidad p38 MAPK con respecto al grupo control, lo que indica una activación de esta vía de señalización. Este paso se reduce en las muestras de los animales tratados con oleuropeína, donde se detectan niveles más bajos de la forma fosforilada de p38 MAPK con respecto al grupo DSS, mostrando un efecto inhibitorio sobre la activación de esta vía (Figura 27).

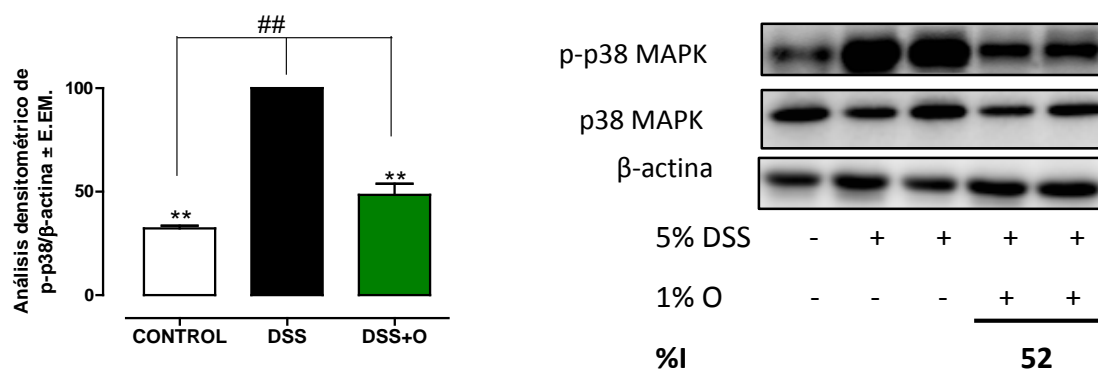


Figura 27. Efecto de oleuropeína (O) sobre la fosforilación de p38 MAPK en CU inducida por DSS al 5%. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, referidos a β-actina y considerando que el grupo DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=4$).

El STAT3 es esencial para el mantenimiento de la integridad del sistema gastrointestinal. Sin embargo, los niveles de STAT3 activado aumentan en pacientes con CU activa con respecto a pacientes con la enfermedad en su forma remitente o controles sanos, y este incremento se relaciona con un aumento de la severidad de la enfermedad (Nguyen y cols., 2015). Así, tal y como se muestra en la Figura 28, se detecta por western blot un aumento de STAT3 fosforilado en las fracciones citosólicas de los



animales que reciben DSS, mientras que el tratamiento con oleuropeina disminuye la forma fosforilada de STAT3.

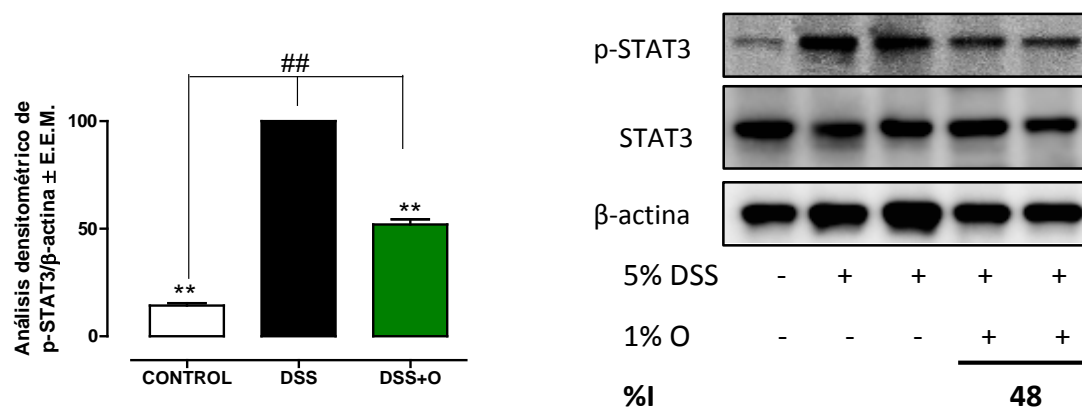


Figura 28. Efecto de oleuropeina (O) sobre la fosforilación de STAT3 en CU inducida por DSS al 5%. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, referidos a β -actina y considerando que el grupo DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, $n=4$).

IV.2.1.8. Expresión génica de anexina A1

Anexina A1 es un mediador endógeno de la señalización corticoide, con potente actividad antiinflamatoria demostrada a nivel intestinal (Babbin y cols., 2008). Tras aislar el ARNm, convertirlo a ADNc, y replicar la secuencia de interés, se separan las hebras mediante electroforesis, utilizando como agente revelador bromuro de etidio. En este caso, se observa una disminución de la expresión génica de anexina A1 en las muestras del grupo DSS, y una recuperación en los animales tratados con oleuropeina.

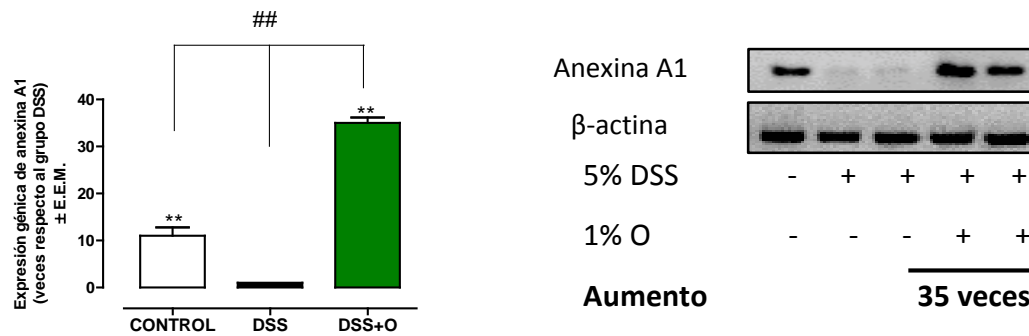
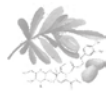


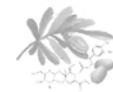
Figura 29. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión génica de anexina A1 en CU inducida por DSS al 5%. Tras el análisis mediante RT-PCR, la expresión génica de anexina A1 se determina por densitometría. se normaliza con β -actina y considerando que el grupo DSS tiene un valor = 1. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: $**p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: $^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$ (t de Dunnet, n=4).

En resumen, oleuropeina mejora los síntomas clínicos e histopatológicos de la CU inducida por DSS al 5% y reduce los marcadores proinflamatorios así como la activación de distintas vías de señalización implicadas en la inflamación intestinal. Por otra parte, provoca un aumento de IL-10 y Anexina A1, lo que podría indicar que oleuropeina potencia el sistema de defensa endógeno.

IV.2.2. Efecto sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3% en ratones C57BL/6

IV.2.2.1. Estudio macroscópico

Con la finalidad de optimizar el tratamiento y la forma de administración de oleuropeina, se comprueba que oleuropeina es soluble en agua a la dosis de 100 mg/kg, por lo que se sustituye en este caso la mezcla del producto en el pienso por la disolución del mismo en el agua de bebida. La administración de DSS al 3% durante 7 días en ratones C57BL/6 provoca una inflamación intestinal de similares características clínicas, aunque menos severa, a la colitis aguda inducida por DSS al 5% en ratones



Balb/C, con pérdida de peso a partir del cuarto día, presencia de diarrea y sangre en heces. No existen diferencias en el consumo de DSS al 3% entre los distintos grupos, 4,25 mL/ratón/día (130 mg de DSS), que además coincide con el volumen correspondiente al tratamiento asignado de 100 mg/kg/día de producto. Tras comprobar la inocuidad de oleuropeina a 100 mg/kg administrado por vía oral durante 7 días, se corrobora el efecto protector de la oleuropeina en la colitis aguda mediante la medida de la longitud del colon y variación de peso (Tabla 15 y Figura 30), y el IAE (Tabla 16 y Figura 31), protegiendo frente a los síntomas clínicos de la colitis aguda a lo largo del experimento.

Tabla 15. Efecto de oleuropeina (O) en CU inducida por DSS al 3%. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, $n=3$).

	Peso animales (g \pm E.E.M.)			% pérdida de peso	Longitud (cm \pm E.E.M.)
	Día 0	Día 4	Día 8		
CONTROL	19,60 \pm 0,57	20,40 \pm 0,98	20,41 \pm 0,96**	-	10,25 \pm 0,38**
DSS	19,80 \pm 0,65	19,50 \pm 0,87	17,32 \pm 0,65##	12	5,31 \pm 0,16##
DSS+Dx	20,01 \pm 0,66	20,31 \pm 1,03	19,11 \pm 0,87**	4	8,10 \pm 0,23**##
DSS+O	19,91 \pm 0,85	19,39 \pm 0,25	18,80 \pm 0,25*#	6	7,21 \pm 0,15**##

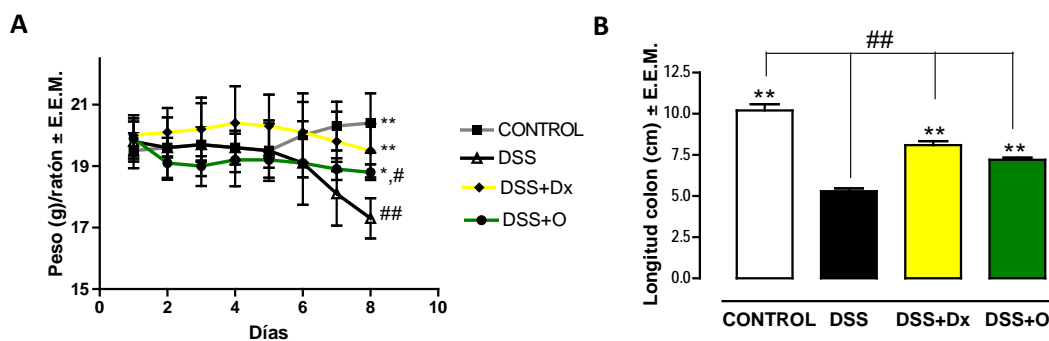


Figura 30. Efecto de oleuropeina (O) en CU inducida por DSS al 3%. (A) Longitud del colon. (B) IAE total, PP: pérdida de peso; SH: sangre en heces; D: diarrea. (C) Peso medio por ratón. Dx: dexametasona. Cada barra/punto representa la media \pm E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, $n=3$).

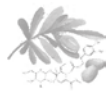


Tabla 16. Efecto de oleuropeina (O) sobre IAE en CU inducida por DSS al 3%. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=3$).

	Pérdida de peso	Sangre en heces	Diarrea	IAE
DSS	3,01 ± 0,25	3,50 ± 0,53	3,50 ± 0,24	3,35 ± 0,28
DSS+Dx	1,01 ± 0,24**	1,05 ± 0,75**	1,50 ± 0,46**	1,26 ± 0,65**
DSS+O	1,00 ± 0,16**	2,36 ± 0,36*	2,10 ± 0,46*	1,53 ± 0,56*

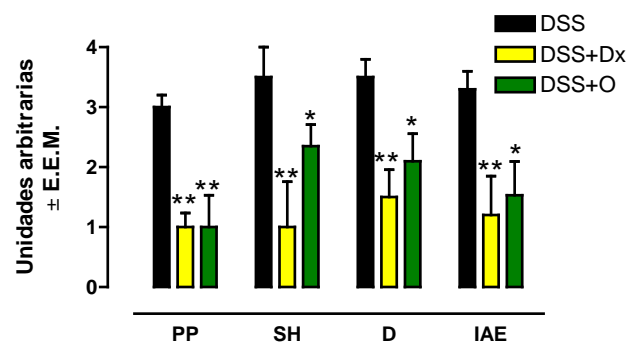
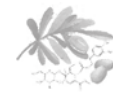


Figura 31. Efecto de oleuropeina (O) sobre IAE en CU inducida por DSS al 3%. Dx: dexametasona. Cada barra representa la media la pérdida de peso (PP), sangre en heces (SH), diarrea (D) e IAE ± E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=3$).

IV.2.2.2. Modulación de la respuesta Th17

Recientemente se ha descubierto un nuevo papel de la respuesta Th17 en la CU, ya que se ha encontrado una elevada infiltración de células Th17 y de citocinas tipo Th17 en la mucosa intestinal inflamada de ratones colíticos y pacientes con CU. Tal y como se observa en la Tabla 17, y la Figura 32 y Figura 33, tras el aislamiento de los linfocitos T de la *lamina propria* y el análisis de las poblaciones celulares por FACS, se detectan linfocitos CD4⁺RORγt⁺ en las muestras, observándose un aumento en el tejido intestinal del grupo DSS. Además, el porcentaje de linfocitos CD4⁺RORγt⁺ que expresan IL-17⁺IFN-γ⁺ es más alto en comparación con el grupo control. El tratamiento con oleuropeina reduce significativamente el porcentaje de estas subpoblaciones (25% y 40% de inhibición, respectivamente)



comparado con el grupo DSS, demostrando un claro efecto sobre las poblaciones de linfocitos T colaboradores en la inflamación intestinal inducida por DSS. Dexametasona actúa como un agente inmunosupresor, así pues, la administración oral de este glucocorticoide disminuye ambas subpoblaciones en estudio (alrededor de un 40%).

Tabla 17. Efecto de oleuropeina (O) sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3%. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=3$).

	CD4 ⁺ RORγt ⁺ (% población ± E.E.M.)	CD4 ⁺ RORγt ⁺ IL-17 ⁺ IFN-γ ⁺ (% población ± E.E.M.)
CONTROL	26,23 ± 0,07**	1,25 ± 0,06**
DSS	77,12 ± 7,80##	2,57 ± 0,12##
DSS+DX	50,01 ± 5,85**,#	1,62 ± 0,03**,#
DSS+O	40,01 ± 5,35**,#	2,01 ± 5,35*,,##

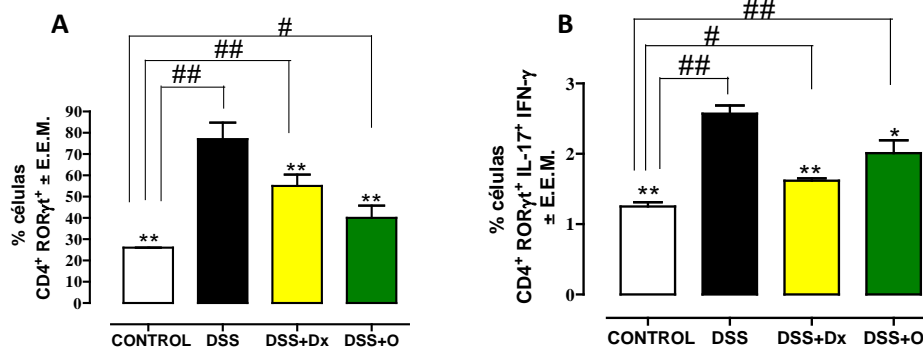


Figura 32. Efecto de oleuropeina (O) sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3%. Dx: dexametasona. Cada barra representa la media del porcentaje de (A) células CD4⁺RORγt⁺ y (B) células CD4⁺RORγt⁺IL-17⁺IFN-γ⁺ ± E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=3$).

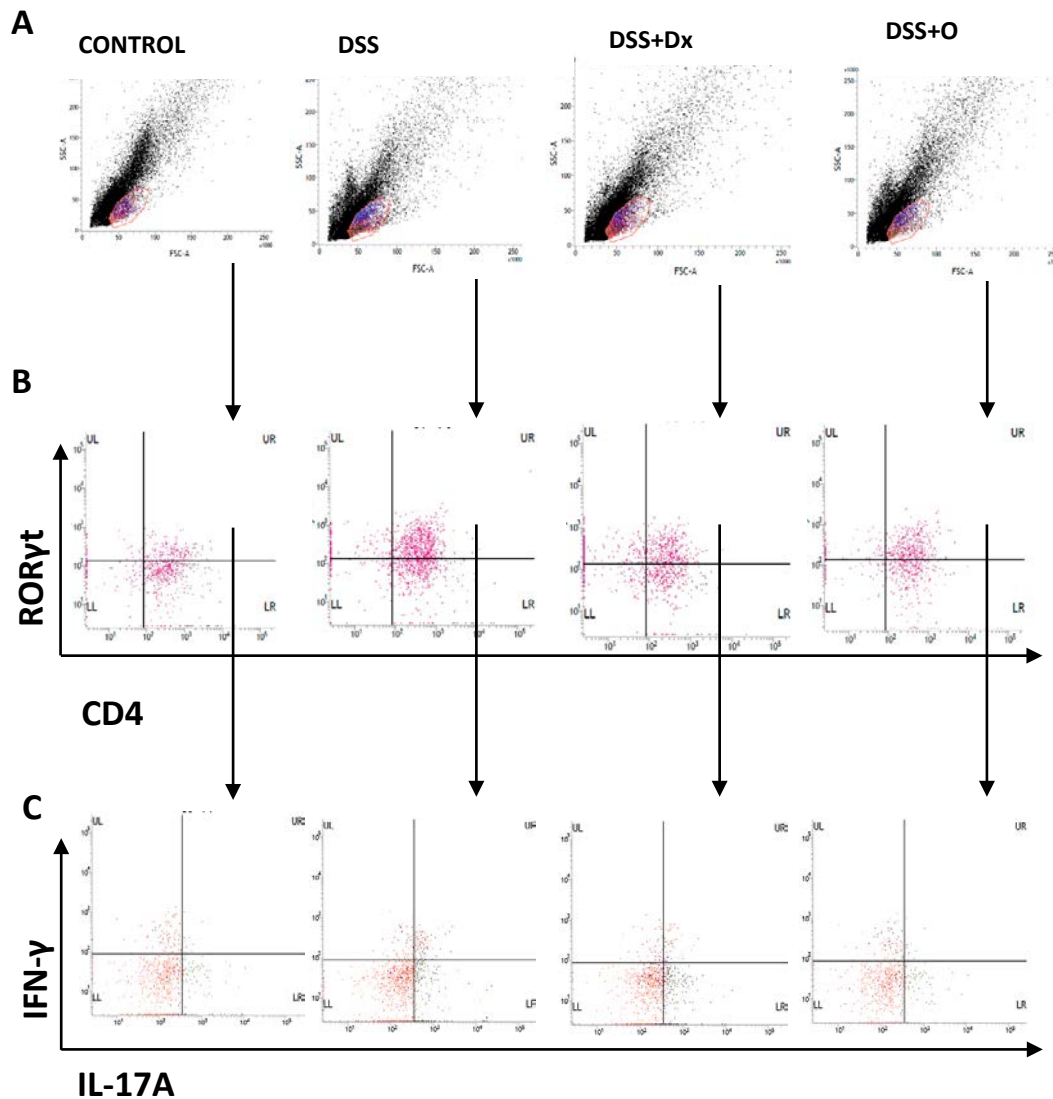


Figura 33. Efecto de oleuropeina (O) sobre la respuesta Th17 en CU inducida por DSS al 3%. Análisis mediante FACS de la población representativa de (A) Linfocitos T, (B) linfocitos CD4⁺ RORyt⁺, (C) linfocitos CD4⁺ RORyt⁺ IFN-γ⁺ IL-17A⁺.

IV.2.2.3. Liberación de IL-17A y IFN-γ

Los linfocitos Th17 son las principales células productoras de IL-17A e IFN-γ en la mucosa intestinal. Mediante la técnica ELISA se determina la concentración de IL-17A e IFN-γ en las muestras de tejido de colon previamente pulverizado. Tal y como se muestra en la Tabla 18 y Figura 34, en el grupo DSS se observa un incremento de los niveles de ambas citocinas, comparado con el grupo control, mientras que el tratamiento con



oleuropeina inhibe de forma significativa la liberación de IL-17A y de IFN- γ (96 y 66%, respectivamente). Similares resultados se obtienen en las muestras de los animales tratados con dexametasona (sobre un 90% de inhibición en ambos casos).

Tabla 18. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de citocinas en CU inducida por DSS al 3%. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, $n=3$).

	(pg/mL)/mg de proteína \pm E.E.M.	
	IL-17A	IFN- γ
CONTROL	7,65 \pm 2,45**	7,65 \pm 4,61**
DSS	1247,52 \pm 12,46##	93,23 \pm 20,43##
DSS+DX	19,94 \pm 3,27**	11,93 \pm 3,27**
DSS+O	68,05 \pm 2,90**	31,33 \pm 5,61**

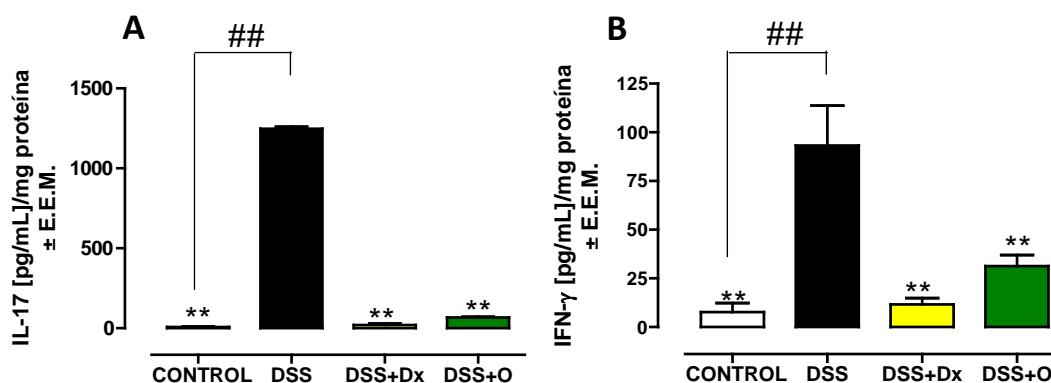
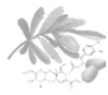


Figura 34. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de citocinas en CU inducida por DSS al 3%. Dx: dexametasona. Cada barra representa la media de la concentración de las citocinas (pg/mL por mg de proteína) \pm E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, $n=3$).

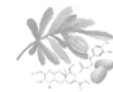


IV.2.3. Efecto sobre la colitis crónica inducida por DSS en ratones C57BL/6

IV.2.3.1. Estudio macroscópico

La inducción de la colitis crónica se realiza mediante la exposición de los animales a cuatro ciclos de DSS, al 1% los dos primeros ciclos y al 2% los dos siguientes. Cada ciclo consiste en 7 días de administración de DSS, seguidos de 7 días de agua de bebida. En este modelo se intenta reproducir la inflamación crónica típica de la colitis, y durante este periodo la pérdida de peso no es un elemento importante. Esto explicaría la poca variación de peso en todos los grupos incluidos en el experimento. Además, el aspecto de todos los animales, su comportamiento y la ingesta de comida y bebida es normal a lo largo del estudio. Se comprueba que la administración diaria de oleuropeina al 0,25% en la dieta durante 56 días no afecta a la viabilidad de los animales. La dosis administrada de oleuropeina equivale a 500 mg/kg/día, que se traduce en 49 mg/kg/día en humanos. Durante los dos primeros ciclos con DSS al 1% no se observa ningún signo de colitis. Es a partir del tercer ciclo cuando los animales expuestos a DSS al 2% presentan heces más blandas y sanguinolentas, que desaparecen durante el periodo de agua. Estos síntomas reaparecen al terminar el cuarto ciclo de DSS, pero en este caso, se perpetúan hasta el final del experimento. En los animales tratados con oleuropeina, las heces son formes y no se detecta pérdida de sangre durante todo el experimento.

Tras el sacrificio de los animales, se examina la presencia de diarrea, sangre en heces, longitud y peso del colon. En la Tabla 19 y Figura 35 se puede observar el efecto de oleuropeina sobre el IAE. El acortamiento del



colon no es significativo en los grupos, sin embargo, en una inflamación crónica sí lo es el edema, observándose un aumento del parámetro mg/cm en los intestinos del grupo DSS, siendo menor en aquellos animales tratados con oleuropeina (Tabla 19 y Figura 35).

Tabla 19. Efecto de oleuropeina (O) sobre la colitis crónica inducida por DSS. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=10$).

	Pérdida de peso	Sangre en heces	Diarrea	IAE	Edema
					(mg/cm \pm E.E.M.)
CONTROL	-	-	-	-	26,33 \pm 4,62**
DSS	0	1,43 \pm 0,20	1,57 \pm 0,25	1,00 \pm 1,23	53,27 \pm 0,38##
DSS+O	0	0,01 \pm 0,01**	1,40 \pm 0,28	0,47 \pm 0,14**	44,24 \pm 2,65**,#

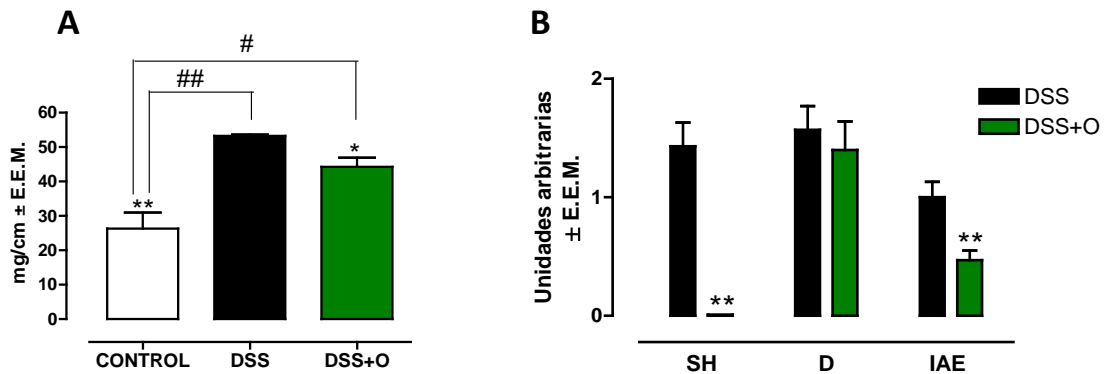
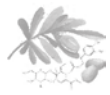


Figura 35. Efecto de oleuropeina (O) sobre la colitis crónica inducida por DSS. (A) Parámetro peso/longitud (B) IAE, SH: sangre en heces, D: diarrea. Cada barra representa la media \pm E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=10$).

IV.2.3.2. Análisis histológico

La administración repetida de DSS produce en el tejido del colon similares características a una inflamación intestinal crónica, tal y como muestra el análisis histológico. Así, se observan los típicos cambios producidos por la inflamación como infiltración celular, edema, daño de las criptas y ulceraciones en la mucosa (Figura 36C y D). Por el contrario, los cortes histológicos del colon de los animales tratados con oleuropeina



(Figura 36E y F) reflejan una menor infiltración celular, mejor epitelización, reducción del daño en la mucosa y menor edema en comparación con el grupo DSS, lo que demuestra el efecto protector de este producto.

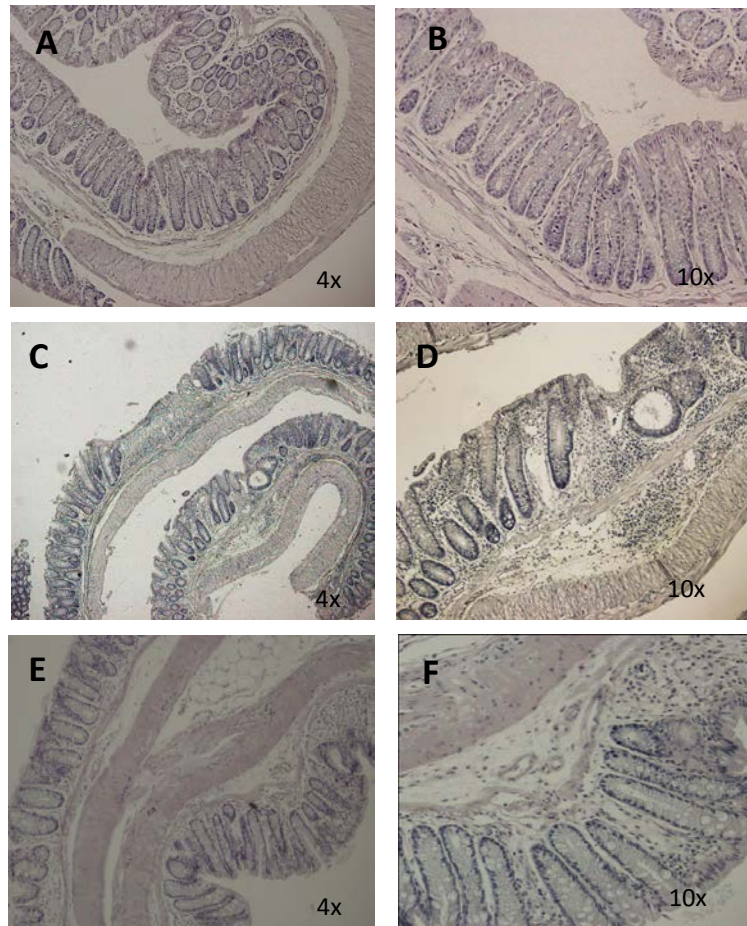


Figura 36. Imágenes representativas del análisis histológico en colitis crónica inducida por DSS. (A y B) Control. (C y D) DSS. (E y F) DSS+Oleuropeina.

IV.2.3.3. Infiltración neutrofílica, eosinofílica y de macrófagos

La infiltración celular se determina en las muestras de colon previamente pulverizado, mediante la medida espectrofotométrica de la actividad enzimática MPO para la infiltración neutrofílica, EPO para la infiltración eosinofílica y NAG para la infiltración de macrófagos. Así, en los animales sometidos a cuatro ciclos de DSS se detecta un aumento de la



actividad MPO, EPO y NAG, lo que implica un aumento de la infiltración celular en el tejido (Bento y cols., 2012). El tratamiento con oleuropeína reduce la acumulación de neutrófilos (27%), eosinófilos (48%) y macrófagos (34%) en el tejido intestinal con respecto al grupo DSS, según se muestra en la Tabla 20 y en la Figura 37.

Tabla 20. Efecto de oleuropeína (O) sobre la infiltración leucocitaria en colitis crónica inducida por DSS. MPO: mieloperoxidasa; EPO: eosinofilperoxidasa; NAG: N-acetilglucosaminidasa. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=7$).

	Actividad enzimática (U/mg proteína \pm E.E.M) $\times 10^{-3}$		
	MPO	EPO	NAG
CONTROL	19,25 \pm 2,65*	11,23 \pm 0,35*	12,78 \pm 0,60**
DSS	48,32 \pm 6,73#	21,42 \pm 2,13#	29,29 \pm 2,19##
DSS+O	35,21 \pm 5,41	10,94 \pm 1,12*	19,30 \pm 2,45*

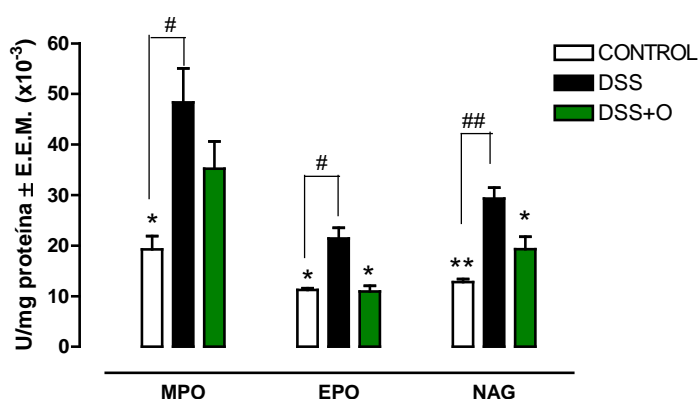
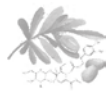


Figura 37. Efecto de oleuropeína (O) sobre la infiltración leucocitaria en colitis crónica inducida por DSS. MPO: mieloperoxidasa; EPO: eosinofilperoxidasa; NAG: N-acetilglucosaminidasa. Cada valor representa la media de la actividad (U/mg de proteína) \pm E.E.M. de al menos cuatro experimentos diferentes. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=7$).

IV.2.3.4. Producción de citocinas

Las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6 juegan un importante papel en la fase crónica de la EII. Mediante la técnica ELISA se detecta un



incremento de los niveles de estas citocinas en las muestras intestinales del grupo DSS y, tal y como se muestra en la Tabla 21 y la Figura 38, el tratamiento con oleuropeina inhibe la producción de ambas alrededor de un 30%. Por otra parte, los niveles de IL-10 en el tejido intestinal descienden en el grupo DSS con respecto al grupo control, mientras que la producción de esta citocina en el colon de los animales tratados con oleuropeina es superior con respecto al grupo DSS (33% de aumento), lo que indica que, al igual que en el proceso agudo, oleuropeina aumenta la expresión de IL-10 en la mucosa intestinal (Tabla 21 y Figura 38).

Tabla 21. Efecto de oleuropeina (O) sobre los niveles de citocinas en colitis crónica inducida por DSS. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: $**p<0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: $##p<0,01$ (*t* de Dunnet, $n=7$).

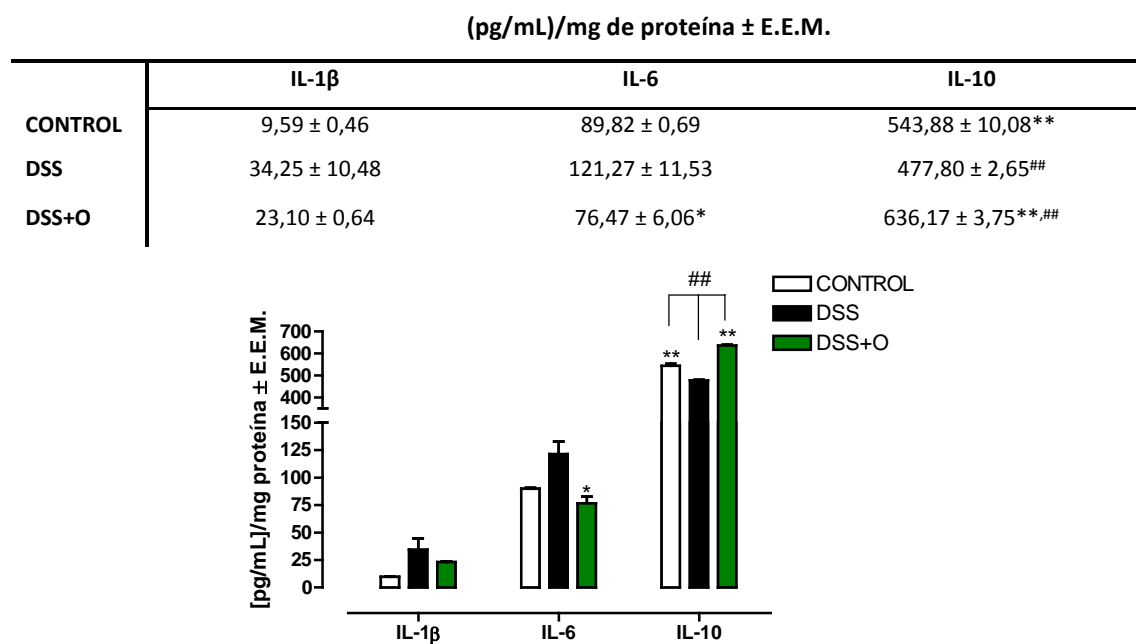


Figura 38. Efecto de oleuropeina (O) sobre los niveles de citocinas en colitis crónica inducida por DSS. Cada barra representa la media de la concentración de citocinas (pg/mL por mg de proteína) \pm E.E.M. de al menos cuatro experimentos independientes. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: $**p<0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: $##p<0,01$ (*t* de Dunnet, $n=7$).



IV.2.3.5. Expresión de COX-2 e iNOS

Al igual que se ha observado en la colitis aguda, la expresión de COX-2 e iNOS se reduce en el colon de los ratones tratados con oleuropeina, tal y como se observa en la Figura 39.

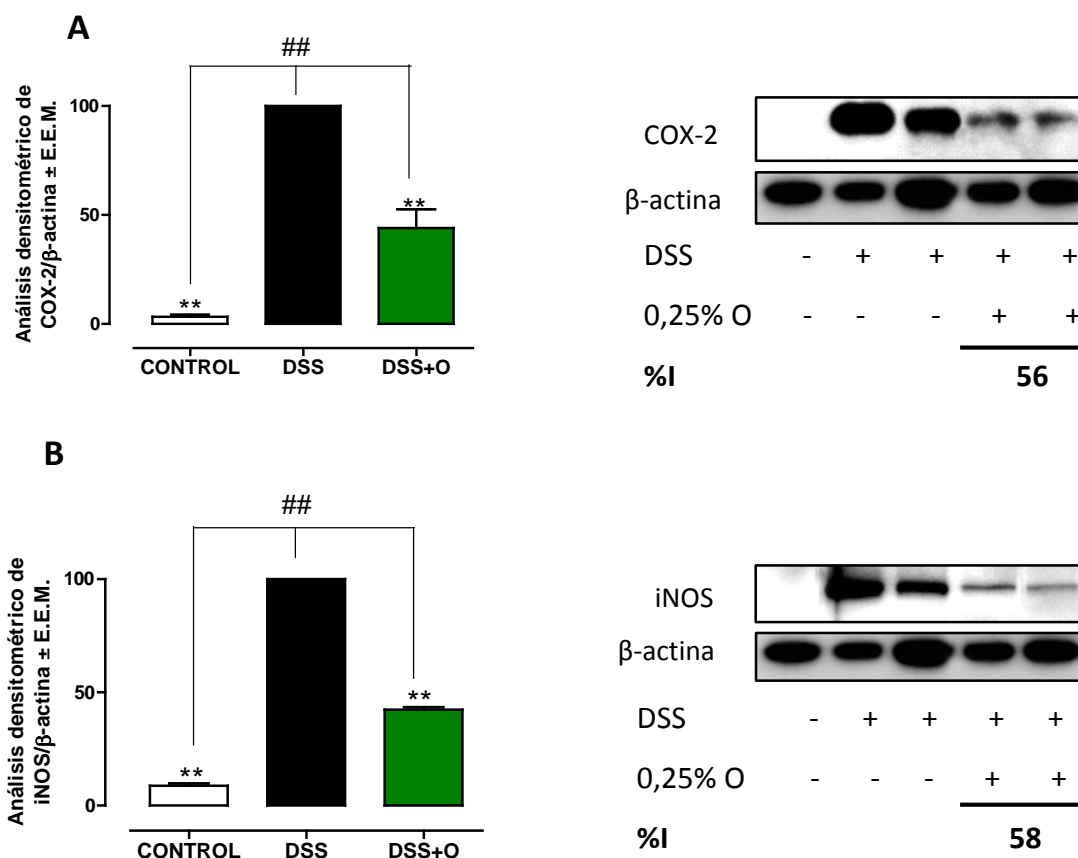
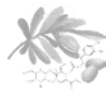


Figura 39. Efecto de oleuropeina sobre (O) la expresión de (A) COX-2 e (B) iNOS en colitis crónica inducida por DSS. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β -actina y considerando que el grupo DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: $**p<0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: $\#p<0,05$, $\#\#p<0,01$ (*t* de Dunnet, $n=7$).

IV.2.3.6. Activación de Nrf-2, p38 MAPK, β -catenina y NF- κ B

Mediante la técnica de western blot, en el modelo de CU crónica empleado se observa un aumento de Nrf-2 en los animales tratados con oleuropeina respecto al grupo DSS, según se aprecia en la Figura 40A. Dicho



factor está implicado en la protección frente a la inflamación intestinal crónica y su posible derivación a CCR (Yao y cols., 2014).

Respecto a la vía de señalización p38 MAPK, se ha visto que en este modelo se incrementa la fosforilación citosólica de la subunidad p38 tras el tratamiento con DSS y oleuropeina reduce dicha activación, tal y como se observa en la Figura 40B.

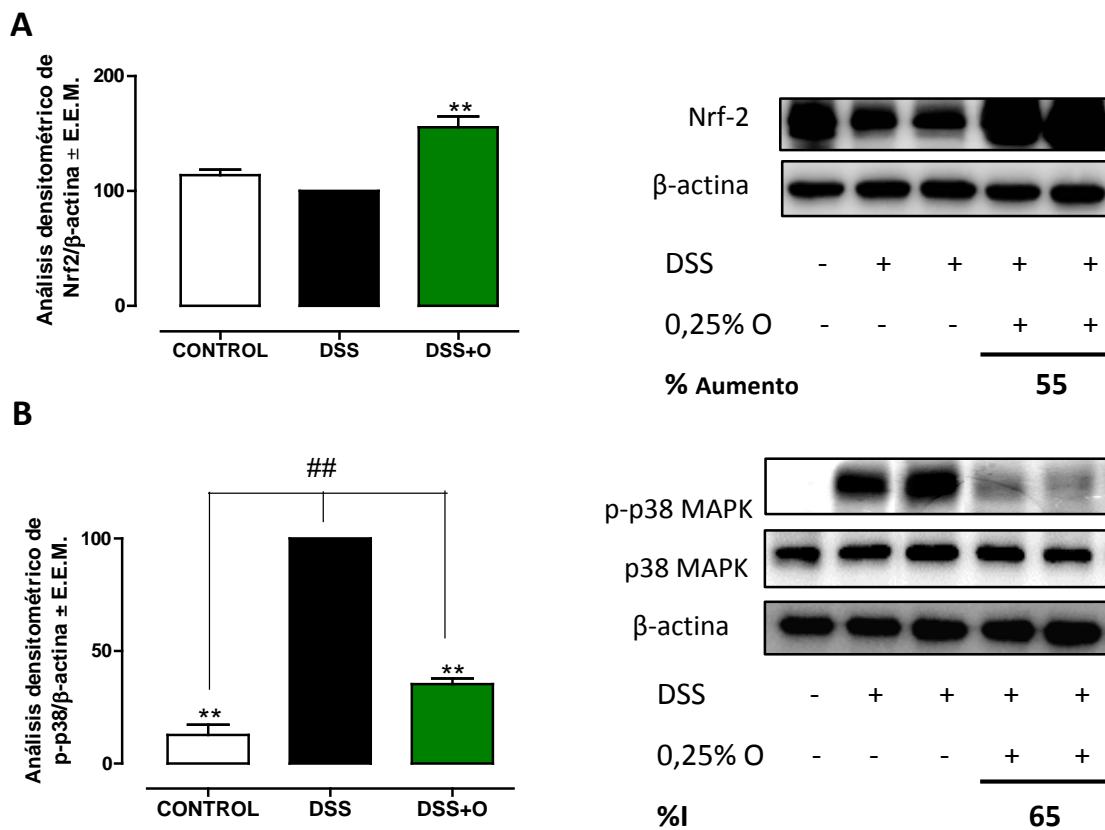
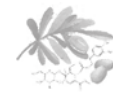


Figura 40. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión de (A) Nrf-2 nuclear y (B) la forma fosforilada de p38 MAPK citosólica en colitis crónica inducida por DSS. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β -actina y considerando que el grupo DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: $**p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: $##p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=7$).



Entre las vías de señalización implicadas en la transformación de una inflamación intestinal crónica a CCR se encuentran Wnt/ β -catenina y NF- κ B. Según se muestra en la Figura 41A, no se observan diferencias significativas de la presencia de β -catenina en las fracciones nucleares del tejido intestinal entre el grupo DSS y el tratado con oleuropeína. En el caso de la activación de la vía NF- κ B, se observa un aumento de la subunidad p65 en los núcleos de las muestras del grupo DSS con respecto al grupo control; sin embargo, este cambio parece no verse afectado por el tratamiento con oleuropeína (Figura 41B).

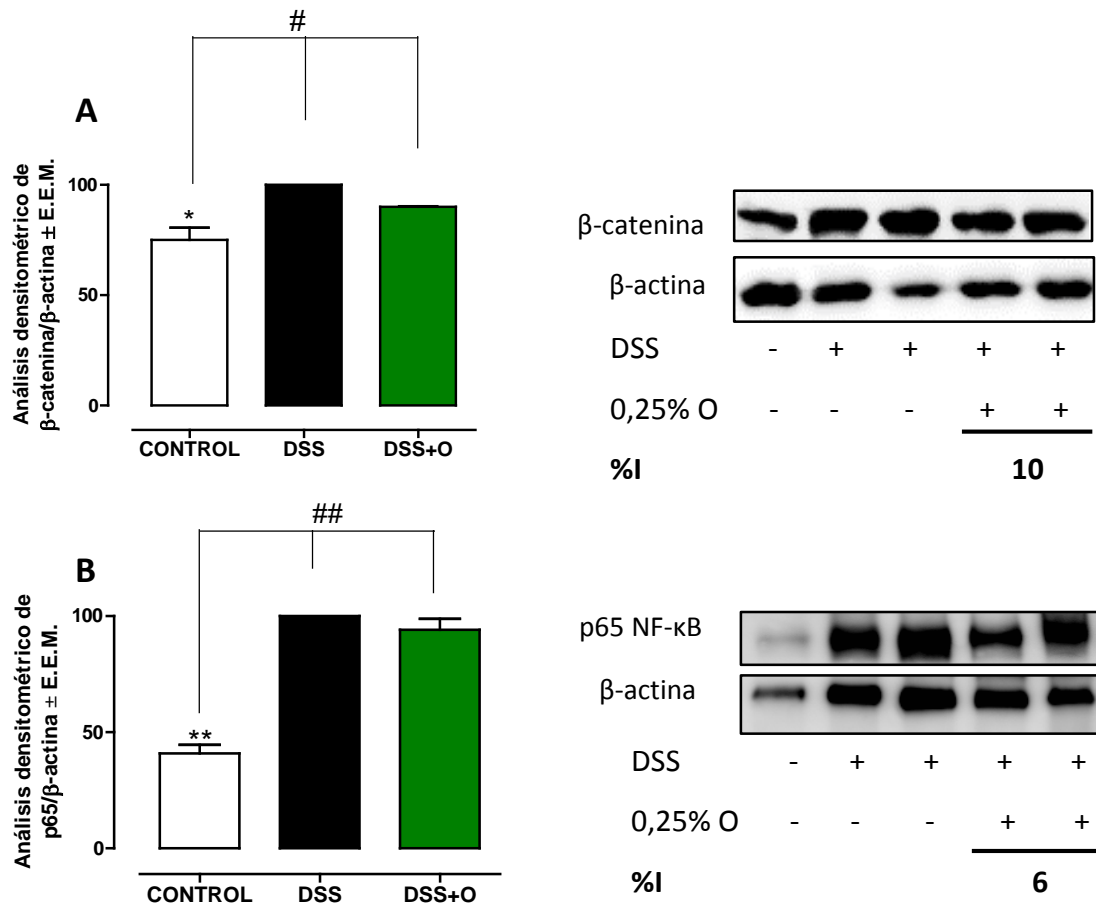
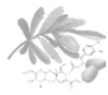


Figura 41. Efecto de oleuropeína (O) sobre la expresión de (A) β -catenina y (B) p65 nuclear en colitis crónica inducida por DSS. Cada barra representa la media de los datos derivados del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β -actina y considera que el grupo DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=7$).



IV.2.3.7. Expresión génica de anexina A1

En la Figura 42 se muestra la expresión génica de anexina A1 medida mediante PCR. En las muestras intestinales del grupo DSS, esta expresión es inferior con respecto al grupo control, y el tratamiento con oleuropeina no sólo revierte el efecto del DSS, sino que la aumenta la expresión de anexina A1 con respecto al grupo control.

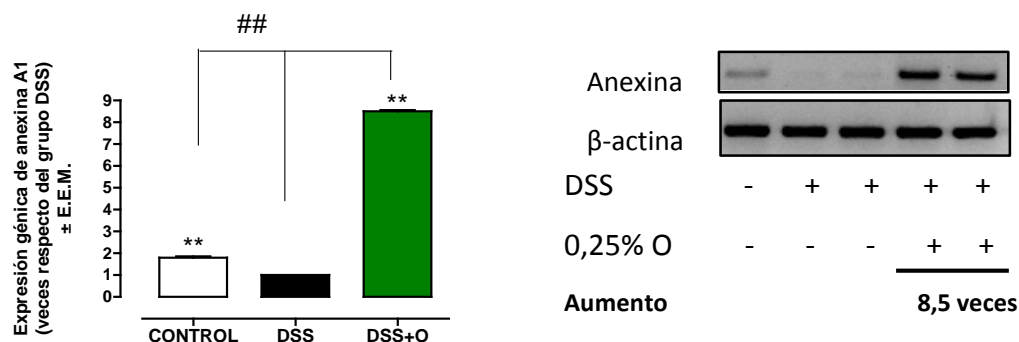


Figura 42. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión génica de anexina A1 en colitis crónica inducida por DSS. Tras el análisis mediante RT-PCR, la expresión génica se determina por densitometría, se normaliza con β -actina, y considerando que el grupo DSS tiene un valor = 1. Significativamente diferente respecto al grupo DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=4$).

En resumen, oleuropeina protege frente a la inflamación intestinal crónica inducida por DSS, reduciendo la infiltración leucocitaria, los niveles de citocinas proinflamatorias, la expresión de COX-2 e iNOS y la activación de la vía p38 MAPK. Además, cabe destacar que oleuropeina estimula los mecanismos de protección endógenos frente a la inflamación mediante el aumento de IL-10, así como Nrf-2 y anexina A1, resultados también observados en la colitis aguda.



IV.2.4. Efecto sobre el CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS en ratones C57BL/6

IV.2.4.1. Estudio macroscópico

En esta experiencia, se administra diariamente oleuropeina disuelta en el agua de bebida a una dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, así como el fármaco de referencia 5-ASA a 75 mg/kg. En primer lugar, se comprueba que oleuropeina administrada diariamente vía oral a una dosis de 100 mg/kg al día durante 63 días no afecta a la viabilidad de los animales. Tanto el grupo control como el grupo AOM no presentan ningún síntoma clínico durante todo el experimento. Los animales que reciben DSS y AOM/DSS presentan una pérdida de peso al final de la administración de DSS en cada ciclo, siendo más marcado tras los 7 primeros días de exposición a DSS. Mientras que la pérdida de peso de los animales se revierte al terminar los dos primeros ciclos, en el tercer ciclo los animales no son capaces de recuperar su peso inicial, y siguen perdiendo peso durante el periodo exento de DSS. Este parámetro se correlaciona con un agravamiento de los síntomas clínicos, presencia de diarrea y heces sanguinolentas, que empeoran a lo largo del estudio. El tratamiento con oleuropeina a 50 mg/kg y 100 mg/kg mejora estos síntomas de forma dosis-dependiente desde el primer ciclo de DSS. Esta protección se extiende durante todo el experimento, demostrando una clara tendencia a mantener el peso y reducir la presencia de diarrea y sangre en heces, tal y como se evalúa con el IAE (Tabla 22 y Figura 43).

Tras sacrificar a los animales y examinar macroscópicamente los intestinos, se observa un acortamiento del colon y un incremento del

parámetro mg/cm en los animales que reciben DSS o AOM/DSS, en comparación con el grupo AOM/DSS+O100, que recibe la dosis más alta de oleuropeina (Tabla 23 y Figura 44). El tratamiento con 5-ASA muestra un empeoramiento clínico de los animales tras el primer ciclo, con una mortalidad del 40%, sin embargo, los animales que sobreviven se recuperan tras el segundo ciclo, con un incremento del peso y una mejora en general como determina el IAE (Tabla 22 y Tabla 23, Figura 43 y Figura 44).

Tabla 22. Efecto de oleuropeina (O) sobre el IAE en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n = 6-10$).

	Día 7	Día 28	Día 49	Día 63
DSS	3,00 ± 0,41	1,75 ± 0,63	2,00 ± 0,41	2,50 ± 0,29
AOM/DSS	3,50 ± 0,41	2,00 ± 0,38	2,50 ± 0,21	3,25 ± 0,25
AOM/DSS+ASA	3,50 ± 0,11	1,5 ± 0,47	0,75 ± 0,25**	0,75 ± 0,47**
AOM/DSS+O50	1,80 ± 0,27*	1,40 ± 0,27	1,45 ± 0,44*	1,80 ± 0,51
AOM/DSS+O100	1,00 ± 0,28**	0,65 ± 0,28**	0,65 ± 0,45**	0,51 ± 0,27**

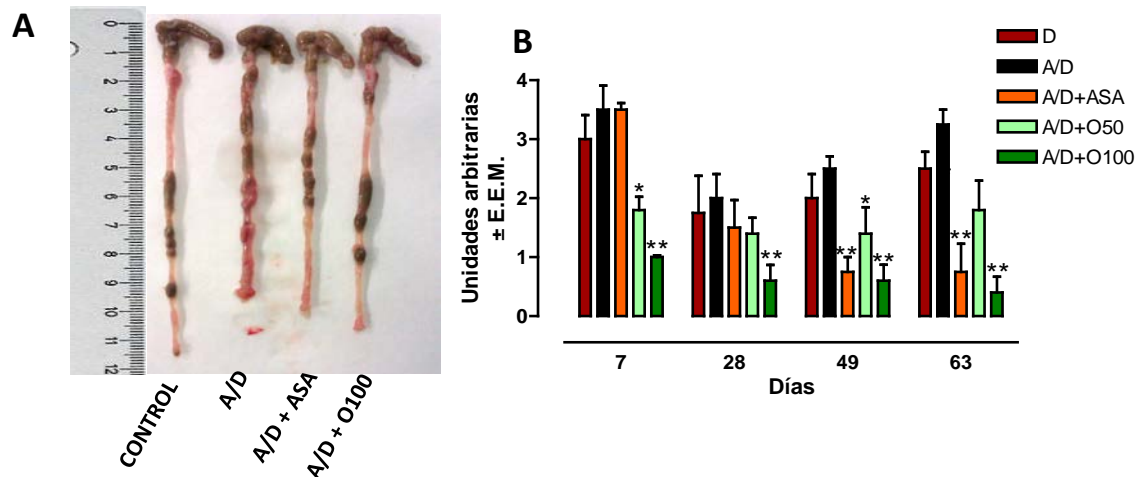


Figura 43. Efecto de oleuropeina (O) sobre el IAE en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A: AOM; D: DSS. (A) Imagen representativa de la longitud y aspecto de los intestinos. (B) IAE medido mediante la pérdida de peso, sangre en heces y diarrea al final cada ciclo de DSS (días 7, 28, 49) y al final del experimento (día 63) Cada barra representa la media ± E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n = 6-10$).



Tabla 23. Efecto de oleuropeina (O) sobre la longitud de colon y edema en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, n=6-10).

	Longitud (cm \pm E.E.M.)	Edema (mg/cm \pm E.E.M.)
CONTROL	11,13 \pm 0,43**	32,27 \pm 1,89**
DSS	7,70 \pm 0,35##	49,23 \pm 1,05##
AOM	10,10 \pm 0,22	30,69 \pm 1,06**
AOM/DSS	8,93 \pm 0,34##	50,49 \pm 3,19##
AOM/DSS+ASA	9,05 \pm 0,21##	40,91 \pm 4,86##
AOM/DSS+O50	9,38 \pm 0,27*,##	45,12 \pm 2,42##
AOM/DSS+O100	9,41 \pm 0,19**.,##	39,90 \pm 1,32**.,#

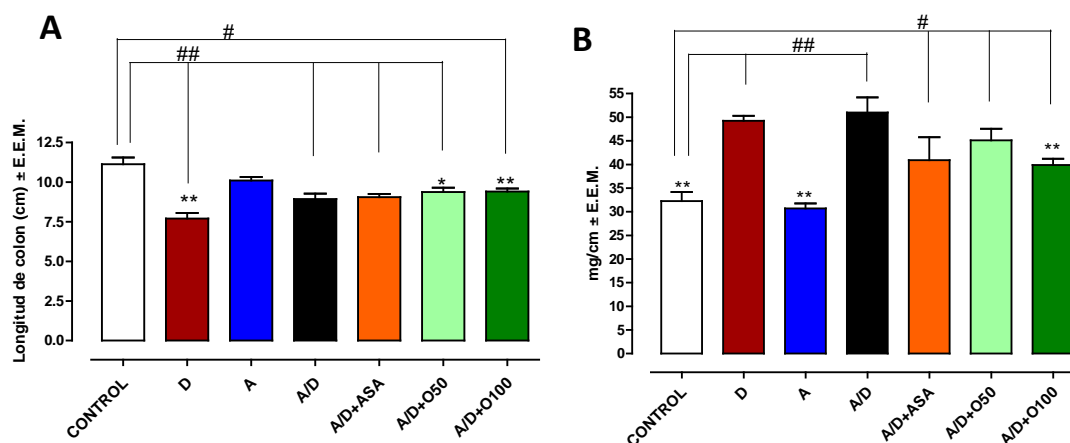


Figura 44. Efecto de oleuropeina (O) sobre la longitud de colon y edema en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A: AOM; D: DSS. (A) longitud del colon, (B) parámetro mg/cm. Cada barra representa la media \pm E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, n=6-10).

IV.2.4.2. Incidencia de tumores

Al final del experimento, la administración de AOM/DSS induce una inflamación crónica caracterizada por úlceras en la mucosa, disrupción del epitelio y una infiltración de células inflamatorias. Además, los animales desarrollan lesiones displásicas en la parte media y distal del colon principalmente. Tal y como se observa en la Figura 45, los animales que reciben sólo AOM apenas manifiestan lesiones displásicas. La incidencia de neoplasias en el grupo AOM/DSS es del 100%, y el tratamiento de oleuropeína tanto a 50 mg/kg como a 100 mg/kg reduce la multiplicidad de las lesiones de manera dosis-dependiente, en un 46% y un 82%, respectivamente (Figura 45), aunque no la incidencia, ya que todos los ratones presentan lesiones tumorales. El tratamiento con 5-ASA exhibe también una reducción del número y tamaño de los tumores.

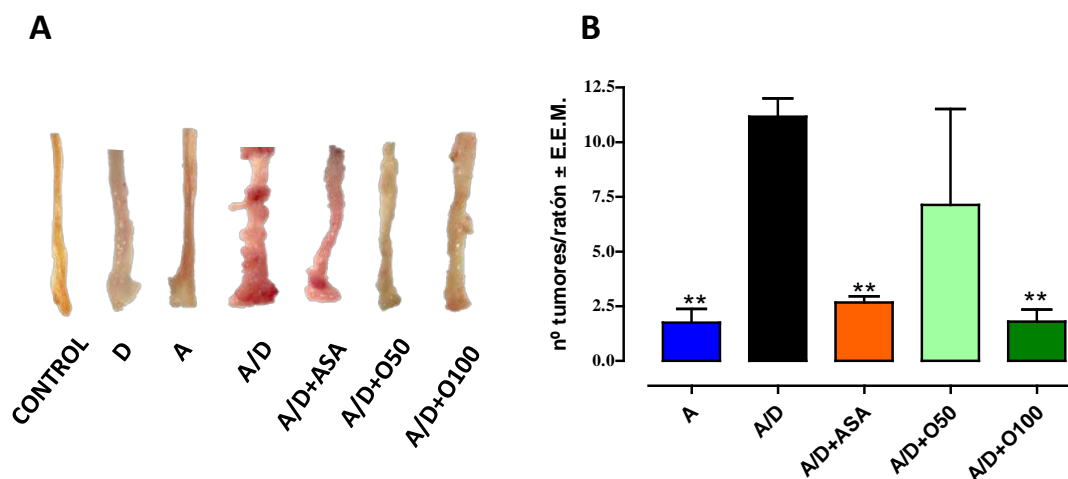
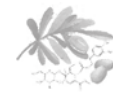


Figura 45. Efecto de oleuropeína (O) sobre la incidencia de tumores en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A: AOM; D:DSS. (A) Multiplicidad de los tumores. (B) Número de tumores por colon. Cada barra representa la media \pm E.E.M. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: $**p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=6-10$).



IV.2.4.3. Análisis histológico

El análisis histológico muestra las típicas características de una inflamación crónica que ha derivado a una lesión precancerosa. El grupo AOM/DSS sufre una marcada inflamación en el intestino grueso, con pérdida de la arquitectura epitelial, y el desarrollo de pólipos neoplásicos, donde las criptas son irregulares y pierden su patrón lineal. Presentan alteraciones celulares y nucleares anaplásicas, además de una mitosis atípica. En cambio, el tratamiento con oleuropeina a 100 mg/kg reduce la inflamación, protege frente al daño en el epitelio intestinal e inhibe la formación de tumores en el colon. Los ratones tratados con 5-ASA muestran una ligera inflamación intestinal, caracterizada por una infiltración leucocitaria focal y algunas zonas erosionadas, pero no hay signos de crecimiento tumoral (Figura 46).

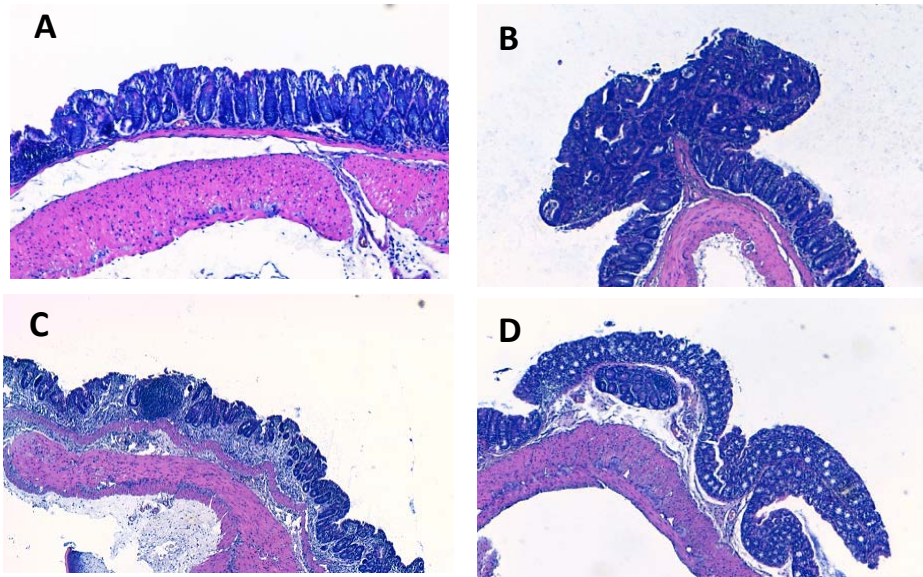
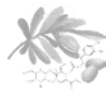


Figura 46. Imágenes representativas del análisis histológico de CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS (4x). (A) Grupo Control. (B) Grupo AOM/DSS. (C) Grupo AOM/DSS+5-ASA. (D) Grupo AOM/DSS+Oleuropeina 100 mg/kg.



IV.2.4.4. Expresión de Ki-67 en el epitelio intestinal

Un aumento de Ki-67 en el tejido de colon es una señal prematura de lesiones displásicas, ya que indica un aumento de la proliferación celular. La determinación de Ki-67 se realiza en este caso mediante inmunohistoquímica utilizando la técnica de DAB, seguido de un análisis densitométrico de la intensidad de la señal. El grupo control muestra un epitelio intestinal típico, con una tinción de Ki-67 residual localizada en la parte basal de las criptas debido al proceso normal de proliferación. En cambio, en los animales tratados con AOM/DSS, se observa una elevada expresión de Ki-67, evidenciando un incremento de la proliferación celular, especialmente en el área del tumor. Tal y como se observa en la Tabla 24 y en la Figura 47, se detecta una diferencia significativa en los animales tratados con 100 mg/kg de oleuropeina, donde el porcentaje de células positivas a Ki-67 en el colon es más bajo comparado con el grupo AOM/DSS. El tratamiento con 5-ASA también reduce la proliferación celular en el tejido de colon. Oleuropeina a 50 mg/kg no tiene un efecto significativo en la inhibición de la expresión de ki-67.



Tabla 24. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión epitelial de Ki-67 en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, n=6-10).

Valores densitométricos Ki-67 \pm E.E.M.

CONTROL	52,40 \pm 2,38**
DSS	79,56 \pm 18,35
AOM	72,37 \pm 18,01
AOM/DSS	100##
AOM/DSS+ASA	72,71 \pm 6,77**
AOM/DSS+O50	80,45 \pm 15,25
AOM/DSS+O100	58,64 \pm 7,83**

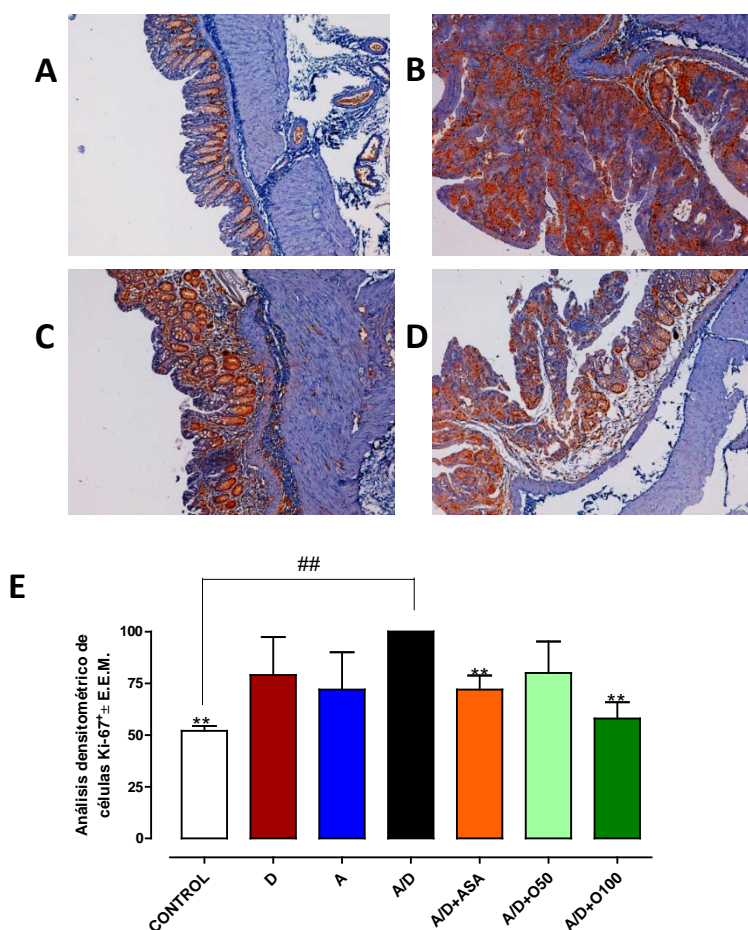
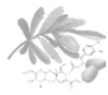


Figura 47. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión epitelial de Ki-67 en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A: AOM; D: DSS. Imágenes histológicas representativas de los intestinos en 10x. (A) Grupo control. (B) Grupo A/D. (C) Grupo A/D+ASA. (D) Grupo A/D+O100. (E) Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de al menos cuatro experimentos independientes, considerando que el grupo AOM/DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (t de Dunnet, n=6-10).



IV.2.4.5. Liberación de IL-6, TNF- α , IL-17 e IFN- γ

Estas cuatro citocinas poseen un papel crucial en el desarrollo del CCR. En la Tabla 25 se muestran los valores determinados por ELISA de IL-6, TNF- α , IL-17A e IFN- γ . Oleuropeina reduce de manera significativa los niveles de dichas citocinas de manera similar al fármaco de referencia 5-ASA (alrededor de un 70% de inhibición). Se destaca la relación dosis-dependiente en la inhibición de IL-17A (Figura 48).

Tabla 25. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de citocinas en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ (t de Dunnet, n=6-10).

	(pg/mL)/mg de proteína \pm E.E.M.			
	IL-6	TNF- α	IL-17	IFN- γ
CONTROL	147,02 \pm 10,31**	181,58 \pm 10,44**	6,34 \pm 1,16*	7,31 \pm 1,31**
DSS	275,99 \pm 5,76**##	375,86 \pm 24,45**##	17,06 \pm 2,36	35,49 \pm 3,36**##
AOM	185,23 \pm 19,80**	328,28 \pm 38,54**##	27,05 \pm 1,36	9,50 \pm 1,30**
AOM/DSS	350,26 \pm 4,08##	551,05 \pm 54,86##	39,32 \pm 12,59#	49,08 \pm 0,33##
AOM/DSS+ASA	105,18 \pm 2,51**	152,67 \pm 19,76**	13,12 \pm 1,50*	10,15 \pm 0,33**
AOM/DSS+O50	106,52 \pm 13,18**	173,55 \pm 25,74**	14,29 \pm 2,59	12,70 \pm 0,73**
AOM/DSS+O100	84,09 \pm 8,73**	153,22 \pm 9,38**	12,46 \pm 1,91*	11,93 \pm 1,25**

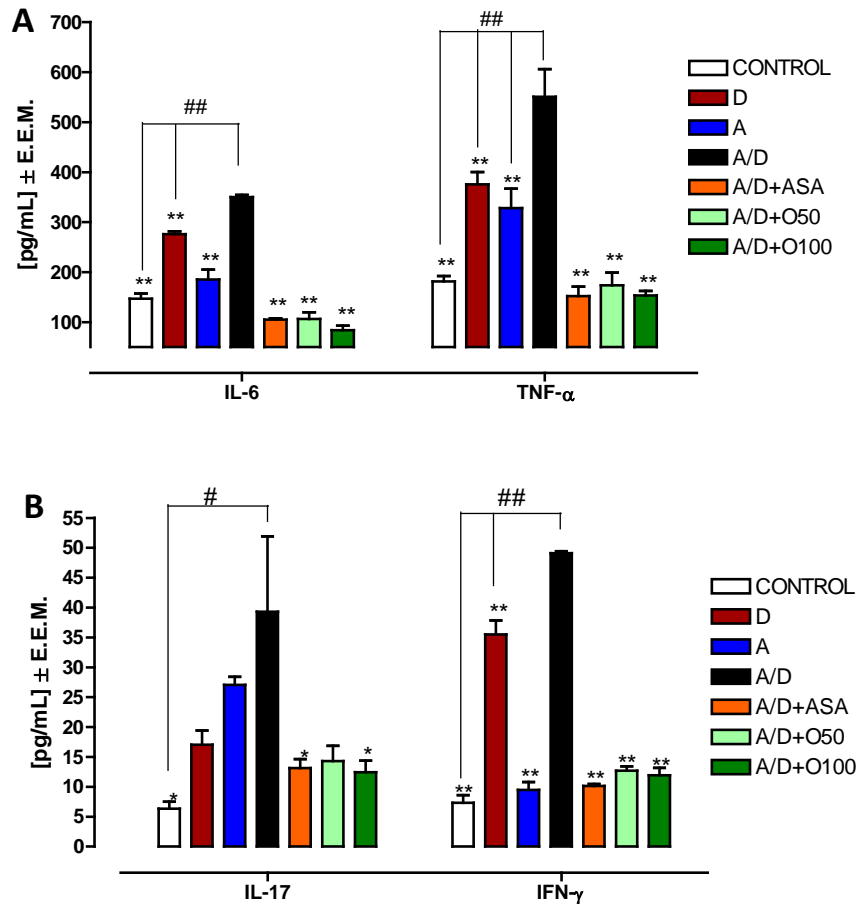
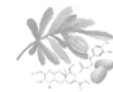


Figura 48. Efecto de oleuropeina (O) sobre la liberación de citocinas en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A: AOM; D: DSS. Cada barra representa la media de las concentraciones de citocinas (pg/mL por mg de proteína) \pm E.E.M. de al menos cuatro experimentos independientes. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * p <0,05, ** p <0,01; significativamente diferente respecto al grupo control: # p <0,05, ## p <0,01 (*t* de Dunnet, n =6-10).

IV.2.4.6. Expresión de COX-2, Bax y Bcl-2

En CCR inducido por AOM/DSS, los resultados obtenidos por western blot revelan que las muestras intestinales pertenecientes a los grupos AOM, DSS y AOM/DSS presentan un aumento de la expresión de COX-2 con respecto al grupo control. Según se muestra en la Figura 49, la administración de oleuropeina tanto a 50 mg/kg como a 100 mg/kg inhibe la expresión de COX-2 en el tejido intestinal, al igual que el tratamiento con 5-ASA.

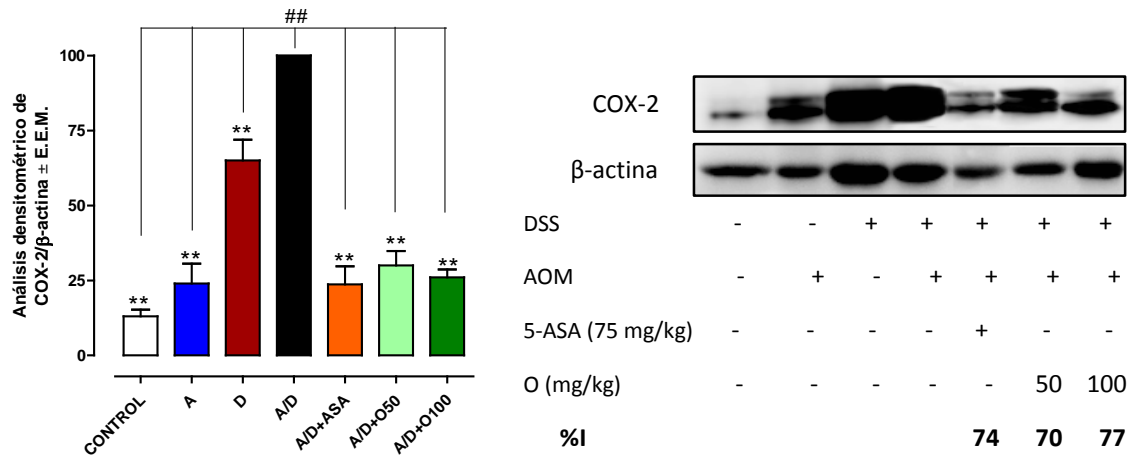


Figura 49. Efecto de oleuropeina (O) sobre COX-2 en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A: AOM; D: DSS. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β-actina y considerando que el grupo AOM/DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n = 6-10$).

Oleuropeina a las dosis ensayadas, al igual que 5-ASA, revierten el efecto de la administración de AOM/DSS, aumentando los niveles de Bax en el tejido intestinal y favoreciendo el proceso de la apoptosis (Figura 50A). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos con respecto a la expresión de Bcl-2 (Figura 50B).

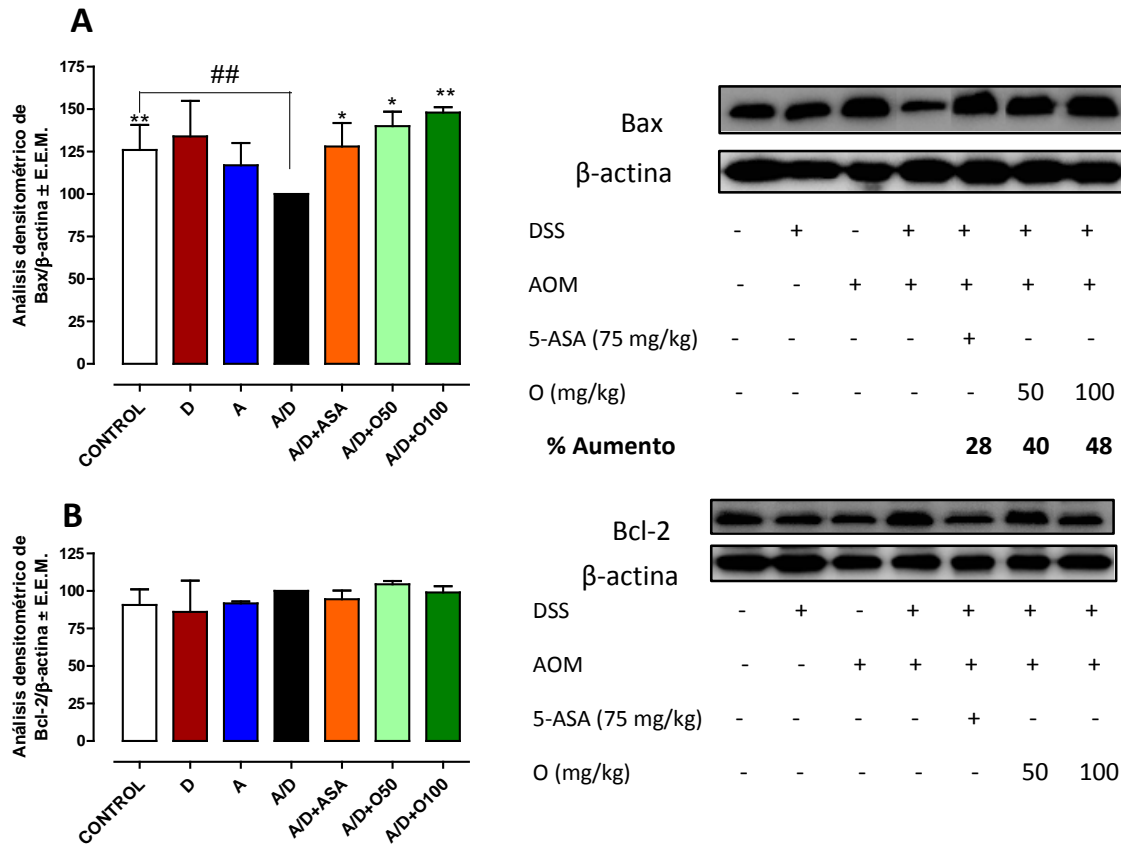
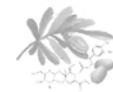
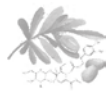


Figura 50. Efecto de oleuropeina sobre (A) Bax y (B) Bcl-2 en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A: AOM, D: DSS. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β-actina y considerando que el grupo AOM/DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n = 6-10$).

IV.2.4.7. Activación de NF-κB, Wnt/β-catenina, STAT3 y PI3K/Akt

En el CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS se produce un desequilibrio en las vías de señalización relacionadas con la aparición de procesos inflamatorios y cancerosos tales como NF-κB, Wnt/β-catenina, STAT3 o PI3K/Akt. La activación de estas vías se detecta mediante western blot en las distintas fracciones proteicas obtenidas de las muestras de colon previamente pulverizadas.

La subunidad p65 NF-κB es activada en el citosol y translocada al núcleo por fosforilación. En la Figura 51A, los grupos DSS, AOM y AOM/DSS muestran un claro incremento de la subunidad p65 NF-κB nuclear en



comparación con el grupo control, y el tratamiento con oleuropeina a 50 mg/kg y 100 mg/kg reduce significativamente los niveles de p65 comparado con el grupo AOM/DSS.

La activación de Wnt/ β -catenina ocurre mediante la fosforilación de la subunidad de β -catenina y su posterior translocación nuclear. Como se observa en la Figura 51B, el grupo DSS no manifiesta cambios significativos en el equilibrio celular de β -catenina en comparación con el grupo control, mientras que la presencia en el núcleo de esta subunidad aumenta de forma significativa en los grupos AOM y AOM/DSS. En cambio, la translocación nuclear de β -catenina en los animales tratados con oleuropeina a 50 mg/kg y 100 mg/kg se ve altamente reducida con respecto al grupo AOM/DSS.

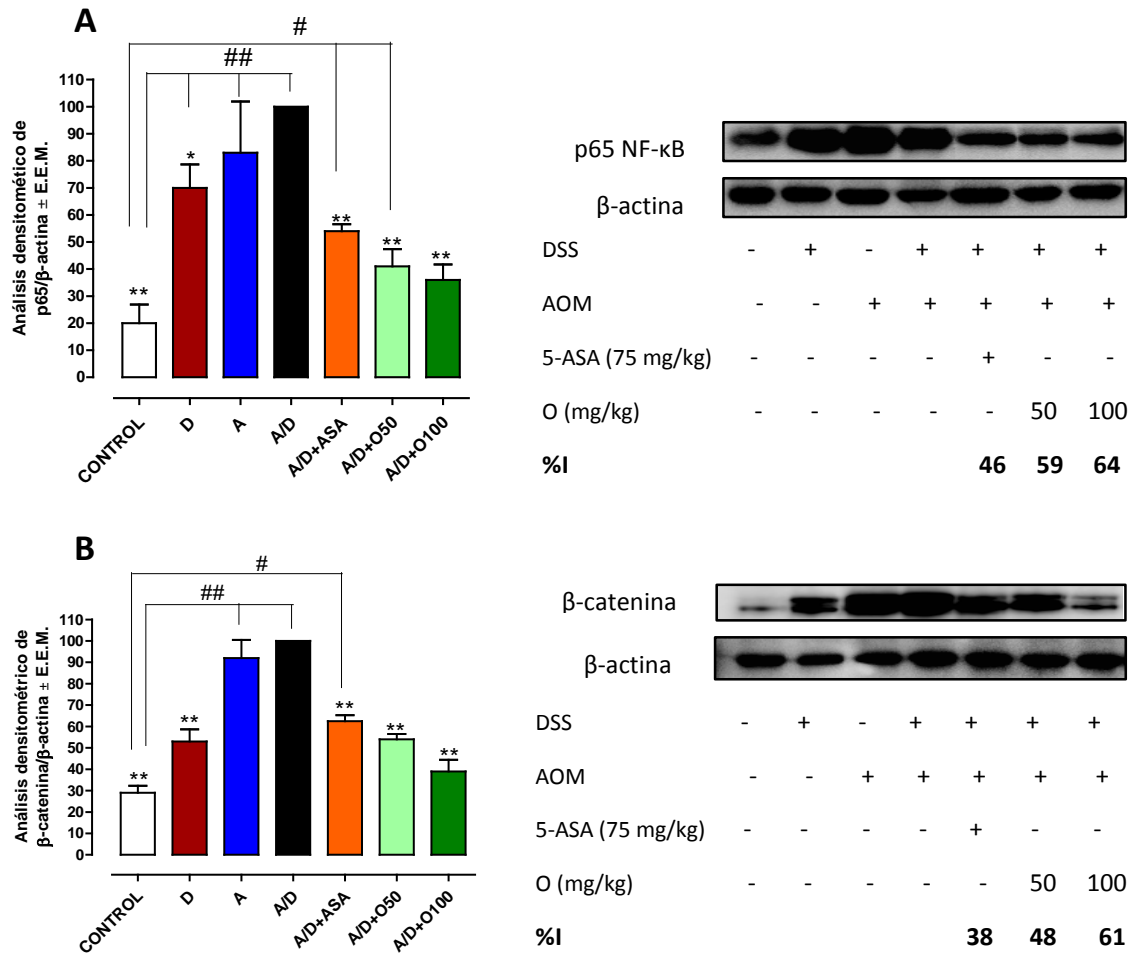
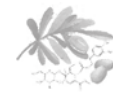


Figura 51. Efecto de oleuropeina (O) sobre la activación nuclear de (A) p65 NF-κB y de (B) β-catenina en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A:AOM; D:DSS. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β-actina y considerando que el grupo AOM/DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n = 6-10$).

Tras ser estimulado, STAT3 se fosforila en el citosol, formando un dímero que se transloca al núcleo y activa la transcripción génica. Se observa que los grupos DSS y AOM no muestran diferencias respecto al grupo control, pero se detectan niveles elevados de STAT3 fosforilado en las muestras del grupo AOM/DSS (Figura 52A). Este efecto se revierte mediante la administración de oleuropeina a 50 mg/kg y 100 mg/kg.

La fosforilación del Akt citosólico implica la activación de numerosas vías implicadas en la inflamación y cáncer. En la Figura 52B, se observa un

incremento de esta subunidad fosforilada en el citosol en los animales del grupo DSS, AOM y AOM/DSS con respecto al grupo control. El tratamiento con oleuropeina es capaz de inhibir la activación de la vía PI3K/Akt, al reducir significativamente la fosforilación de la subunidad Akt con respecto al grupo AOM/DSS.

El tratamiento con 5-ASA reduce la presencia de p65 en el núcleo y los niveles de β -catenina nuclear. Además, inhibe la fosforilación de Akt y STAT3 en el citosol (Figura 51 y Figura 52).

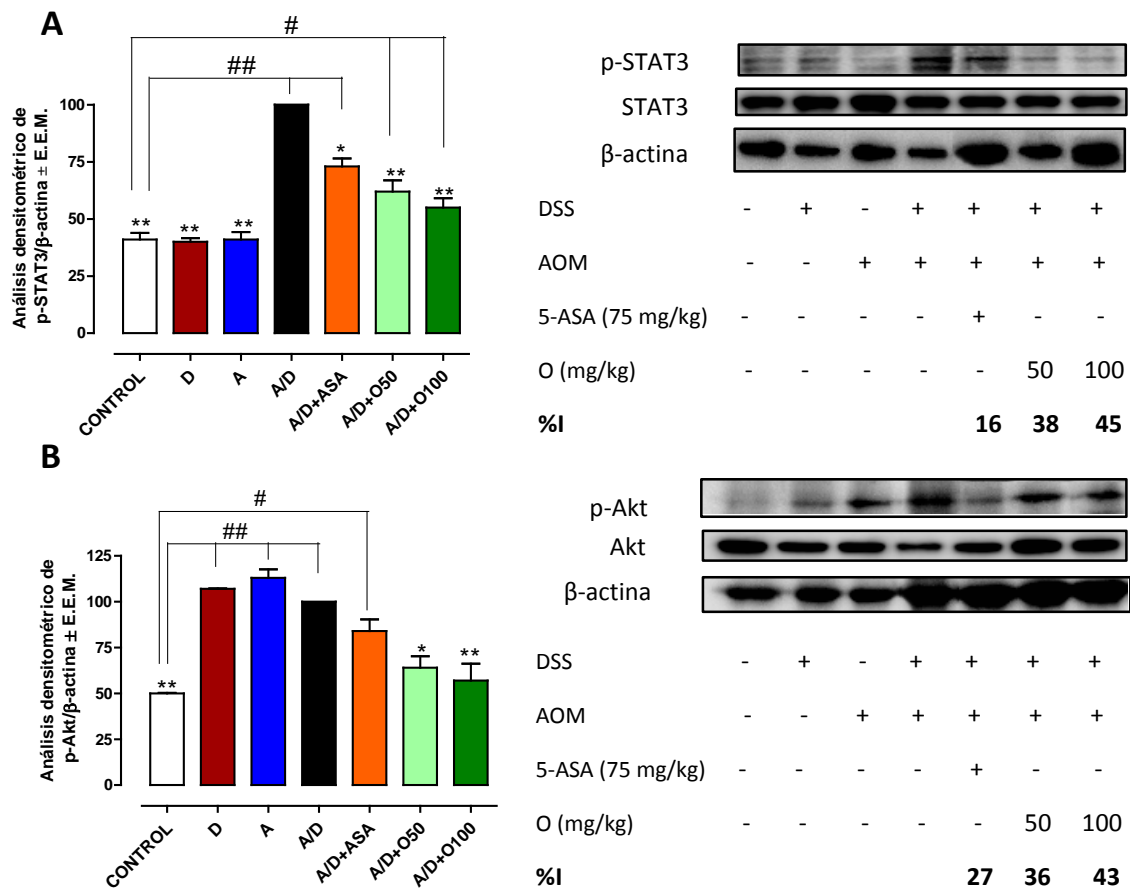


Figura 52. Efecto de oleuropeina (O) sobre la fosforilación en el citosol de (A) STAT3 y (B) Akt en CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. A:AOM; D: DSS. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β -actina y considerando que el grupo AOM/DSS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo AOM/DSS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ (t de Dunnet, n=6-10).



En resumen, oleuropeina ejerce un efecto protector en un modelo de CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS, frente a algunos mediadores de manera dosis-dependiente. En esta experiencia, el tratamiento con oleuropeina mejora los síntomas clínicos de los animales sometidos a AOM/DSS, reduce la incidencia de tumores en el colon, y tal y como se ha observado en los anteriores modelos de inflamación intestinal, inhibe la liberación de mediadores inflamatorios, así como la activación de distintas vías de señalización implicadas en la aparición y desarrollo del CCR.

IV.3. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA *IN VITRO*

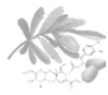
IV.3.1. Efecto sobre macrófagos primarios peritoneales de ratón

Balb/C

Tras realizar algunos experimentos preliminares, se observa que el efecto de oleuropeina sobre la liberación de mediadores proinflamatorios en macrófagos peritoneales es relativamente bajo. Por lo que se elige también hidroxitirosol, metabolito principal de oleuropeina en el intestino, para la realización de las pruebas *in vitro*, en base a su conocido efecto antioxidante y antiinflamatorio. Ambos productos no muestran citotoxicidad a las dosis ensayadas.

IV.3.1.1. Producción de nitritos

La concentración de nitritos es una medida indirecta de la producción de NO debido a la activación celular por un estímulo, en este caso LPS. Tras 24 h, se mide espectrofotométricamente la presencia de nitritos en el sobrenadante del cultivo de las células mediante el reactivo Griess. En la Tabla 26 y en la Figura 53 se observa un aumento de la concentración de



nitritos en las células estimuladas con LPS, con respecto a las células no estimuladas. El tratamiento con oleuropeina (100 μM) e hidroxitirosol (50 y 100 μM) reduce considerablemente la producción de nitritos.

Tabla 26. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la liberación de NO en macrófagos peritoneales. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet, $n=3$).

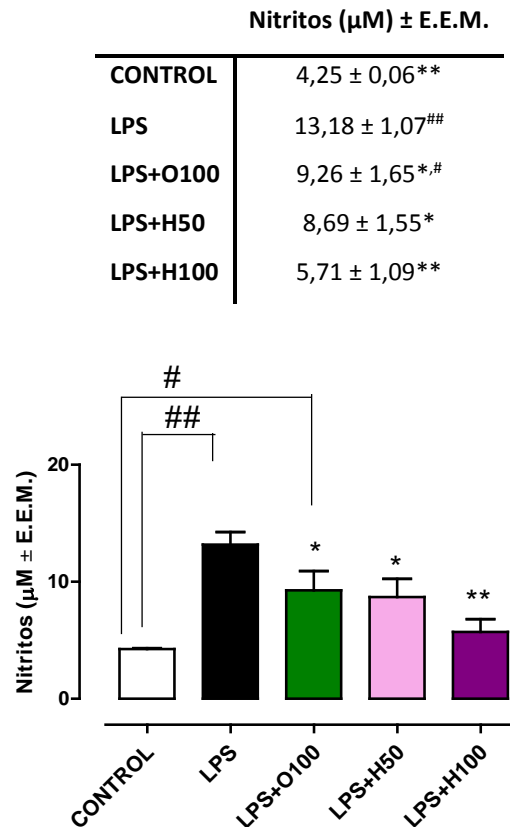


Figura 53. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la liberación de NO en macrófagos peritoneales. Cada barra representa la media de la concentración de nitritos (μM) \pm E.E.M. de al menos cuatro experimentos independientes. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet).

IV.3.1.2. Activación de STAT3

El STAT3 se activa en respuesta a citocinas como IL-6 y factores de crecimiento. Así, tras 30 min de estimulación con IL-6, se detecta un aumento de la fosforilación de STAT3 en la fracción citosólica con respecto a las células no tratadas. Tras 1 h de pre-tratamiento, hidroxitirosol a 50 y



100 μ M reduce la activación de STAT3 en el citosol. Oleuropeina no afecta a la fosforilación de STAT3 (Figura 54).

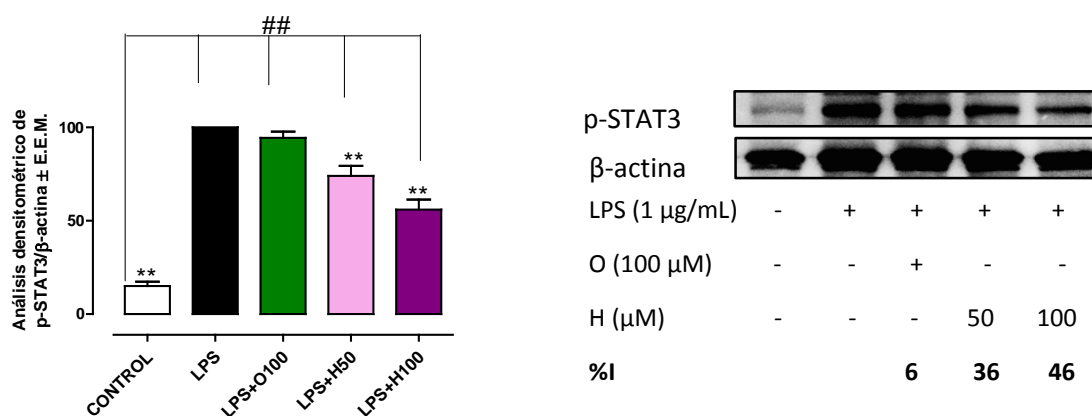


Figura 54. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β -actina y considerando que el grupo LPS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet).

IV.3.1.3. Activación de NF- κ B

Mediante las técnicas de inmunofluorescencia y western blot (Figura 55), se detecta un aumento de la presencia de la subunidad p65 en las fracciones nucleares de los macrófagos, 1 h después del estímulo con LPS. Mientras que hidroxitirosol tanto a 50 como a 100 μ M reduce la translocación de p65 al núcleo, oleuropeina no tiene efecto significativo alguno.

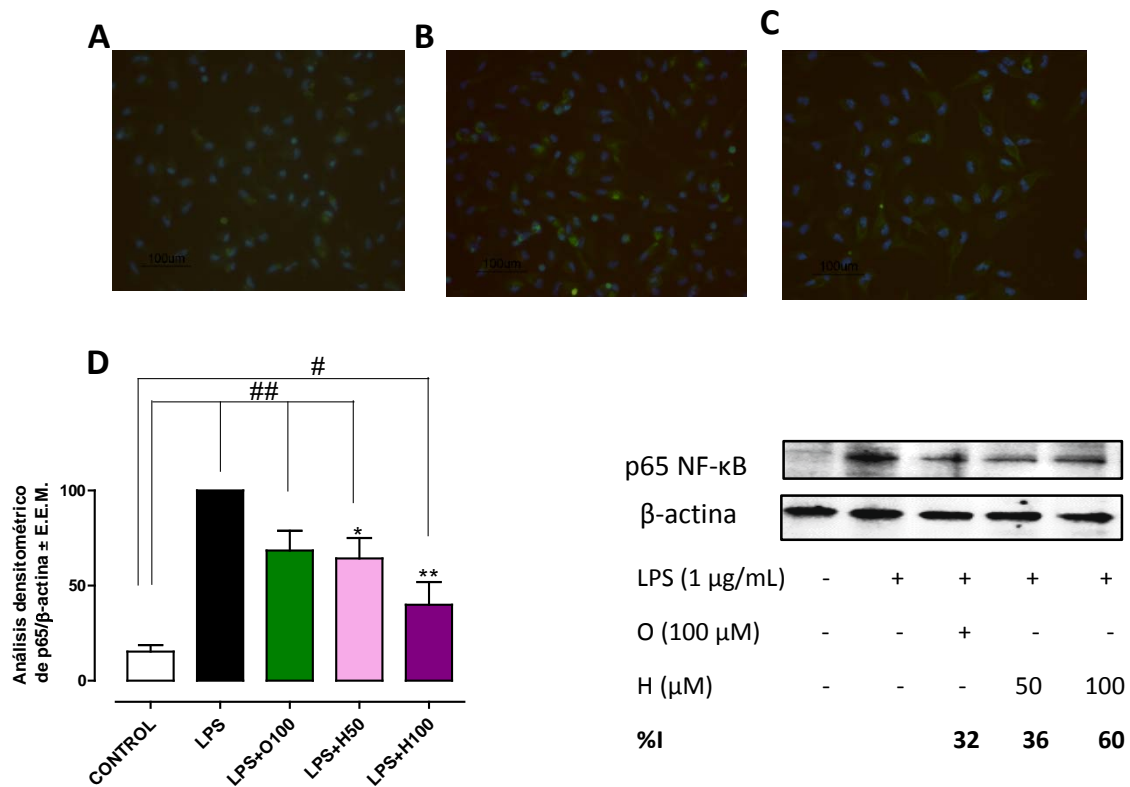


Figura 55. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la translocación al núcleo de la subunidad p65 NF-κB en macrófagos peritoneales. Inmunofluorescencia de (A) control, (B) LPS y (C) LPS+H100. (D) Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β-actina y considerando que el grupo LPS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnett).

IV.3.1.4. Expresión génica y liberación de citocinas

Como consecuencia de su activación, los macrófagos expresan citocinas con la finalidad de activar otros tipos celulares y activarse ellos mismos. Tras 3 h de estímulo con LPS, en la Figura 56 se observa un aumento de la expresión génica de IL-1β, TNF-α e IL-6, determinada mediante RT-PCR. Hecho que se confirma a las 24 h, tras detectar por ELISA un aumento de los niveles de IL-1β, TNF-α e IL-6 en el sobrenadante de los macrófagos estimulados no tratados. En la Figura 56 se observa que sólo hidroxitirosol a la concentración de 100 µM inhibe la expresión génica de estas citocinas (alrededor de 0,8 veces menor con respecto al grupo LPS) y



es capaz de reducir de forma significativa su producción (Tabla 27 y la Figura 57). El tratamiento con oleuropeina a 100 μ M tiende a reducir la liberación de citocinas pero no es estadísticamente significativo.

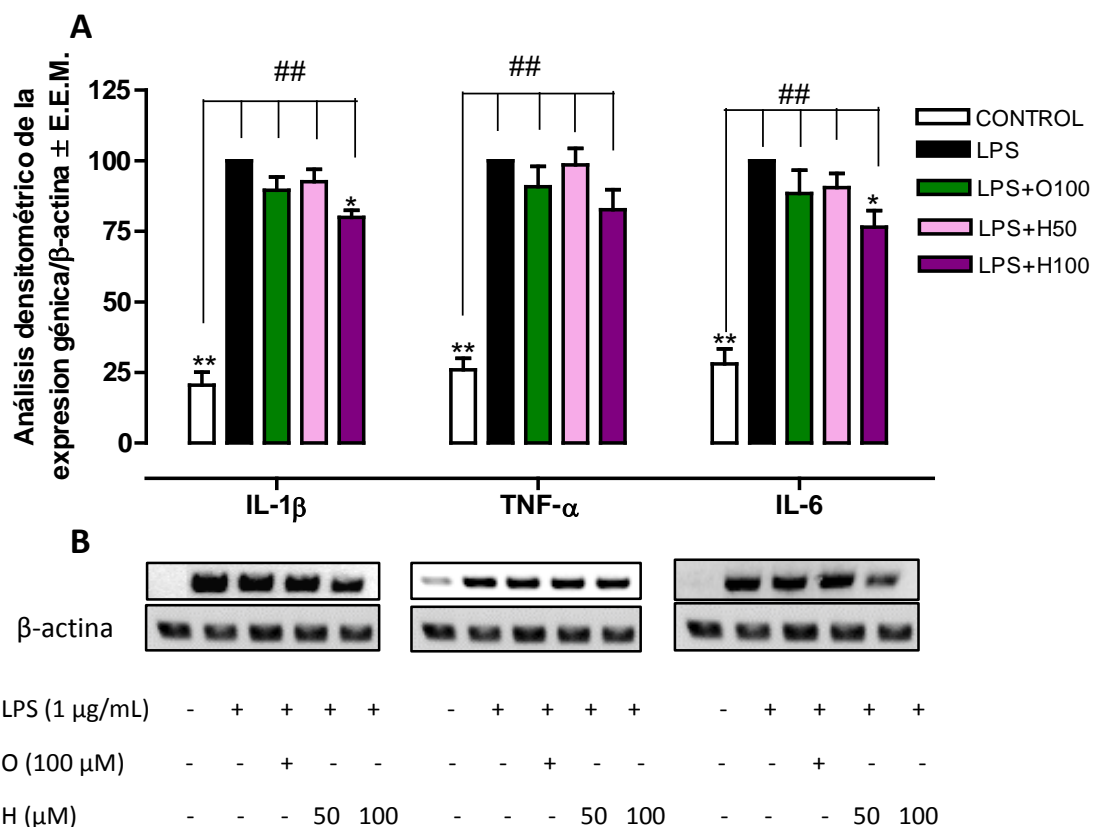


Figura 56. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la expresión génica de citocinas en macrófagos peritoneales. (A) Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de al menos cuatro experimentos independientes, se normalizan con β -actina y considerando que el grupo LPS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: * p <0,05, ** p <0,01; significativamente diferente respecto al grupo control: ## p <0,01 (t de Dunnet). (B) Imagen representativa de la expresión génica de las citocinas por RT-PCR.

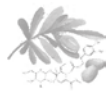


Tabla 27. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la liberación de citocinas por macrófagos peritoneales. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (t de Dunnet).

	(pg/mL)/mg de proteína \pm E.E.M.		
	IL-1 β	TNF- α	IL-6
CONTROL	4,27 \pm 0,33**	8,07 \pm 0,42**	1391,09 \pm 239,69**
LPS	46,83 \pm 2,78##	483,61 \pm 45,08##	69720,35 \pm 8870,07##
LPS+O100	35,17 \pm 5,36*,##	436,58 \pm 37,08##	54546,29 \pm 7860,43##
LPS+H50	29,78 \pm 4,67**,##	382,06 \pm 47,82##	38983,01 \pm 5878,00##
LPS+H100	13,21 \pm 1,49**,#	333,75 \pm 42,41##	34804,84 \pm 5384,69*,##

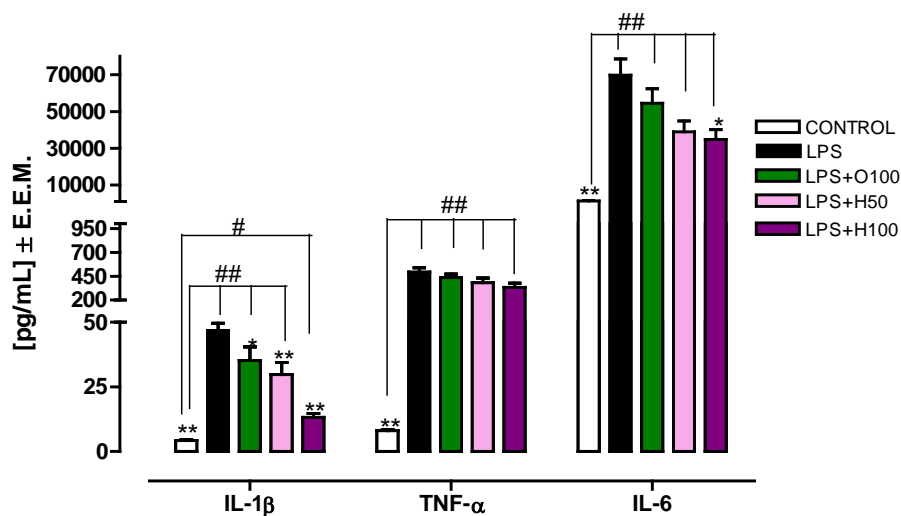


Figura 57. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la liberación de citocinas por macrófagos peritoneales. Cada barra representa la media de la concentración de citocinas (pg/mL por mg de proteína) \pm E.E.M. de al menos cuatro experimentos independientes. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (t de Dunnet).

IV.3.1.5. Expresión de COX-2 e iNOS

La activación de los macrófagos tras un estímulo provoca la expresión de COX-2 e iNOS. En la Figura 58 se observa que el tratamiento con oleuropeina reduce de forma discreta los niveles de COX-2 pero no reduce la expresión de iNOS en macrófagos estimulados con LPS. Por el contrario, hidroxitirosol tanto a 50 μ M como a 100 μ M reduce la expresión de iNOS de forma drástica, pero sin efecto sobre COX-2.

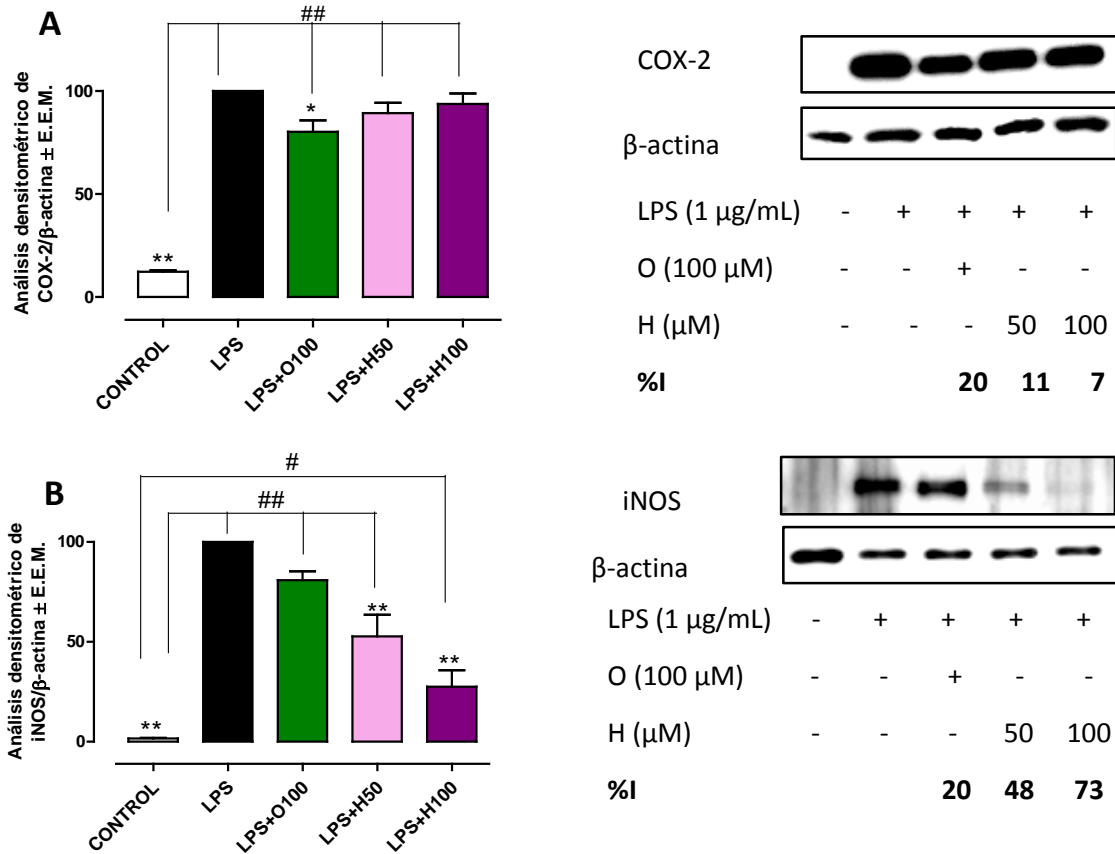
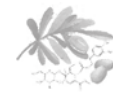


Figura 58. Efecto de oleuropeina (O) e hidroxitirosol (H) sobre la expresión de (A) COX-2 e (B) iNOS en macrófagos peritoneales. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β-actina y considerando que el grupo LPS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet).

En conjunto, estos resultados revelan que hidroxitirosol posee un mayor efecto sobre la activación de los macrófagos peritoneales que oleuropeina, puesto que la mayoría de los mediadores proinflamatorios determinados en esta experiencia son reducidos de manera dosis-dependiente por hidroxitirosol. Este hecho no se observa con oleuropeina, incluso a la dosis más alta ensayada.



IV.3.2. Efecto cicatrizante sobre IEC-18

En este experimento sólo se muestran los resultados correspondientes al tratamiento con oleuropeina, ya que estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio demuestran que hidroxitirosol no ejerce este efecto cicatrizante sobre las IEC-18.

Tras confirmar que oleuropeina no estimula la proliferación celular en IEC-18 mediante el ensayo del MTT (Figura 59), se determina el efecto de oleuropeina en un modelo *in vitro* de cicatrización usando IEC-18. Tal y como se muestra en la Figura 59 y Figura 60, dexametasona reduce la migración de IEC-18, mientras que oleuropeina a 10 μ M y 100 μ M aumenta positivamente la migración celular (57% y 80%, respectivamente), favoreciendo el proceso de cicatrización en IEC-18 (Tabla 28).



Tabla 28. Efecto de oleuropeina (O) sobre la proliferación y cicatrización de IEC-18. Significativamente diferente respecto al grupo dexametasona (Dx): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet).

	Proliferación (%) \pm E.E.M.	Nº células migradas \pm E.E.M.
CONTROL	100,00 \pm 0,00	90,68 \pm 9,75
Dx	89,75 \pm 8,95	75,83 \pm 1,64
O10	103,23 \pm 6,28	118,16 \pm 13,82*
O100	102,51 \pm 8,01	134,4 \pm 7,99**

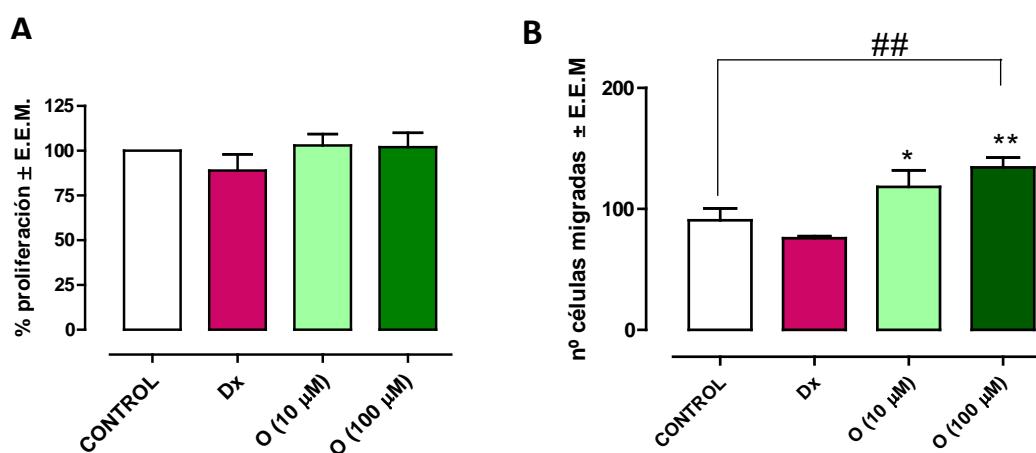


Figura 59. Efecto de oleuropeina (O) sobre la proliferación y cicatrización de IEC-18. (A) Proliferación celular medida por MTT. (B) Cada barra representa la media del número de células migradas en 24 h \pm E.E.M. de al menos cuatro experimentos independientes. Significativamente diferente respecto al grupo dexametasona (Dx): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet)

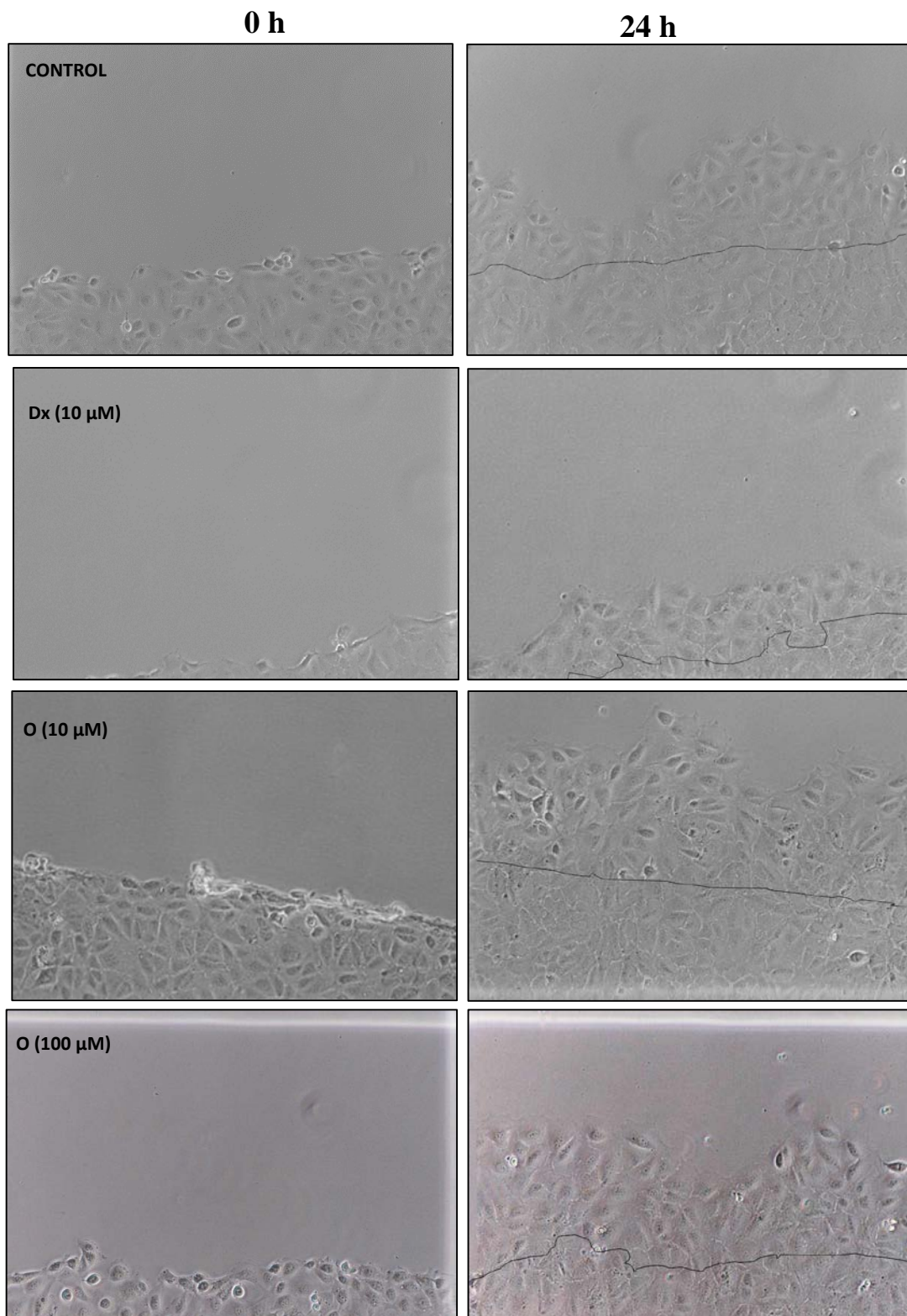
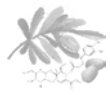
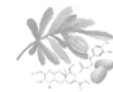


Figura 60. Efecto de oleuropeina (O) sobre la cicatrización de IEC-18 por migración celular.



IV.3.2.1. Expresión de COX-2

La expresión de COX-2 por las IEC-18 responde a la capacidad inmunológica que presentan estas células ante un estímulo externo. Así, la estimulación de IEC-18 con LPS durante 24 h provoca un incremento de la expresión de COX-2, detectado mediante western blot. En la Figura 61, se observa que el tratamiento 1 h antes del estímulo, tanto con oleuropeína a 100 μ M como con el inhibidor de la vía p38 MAPK SB 203580 a 10 μ M, inhibe de forma significativa la producción de COX-2.

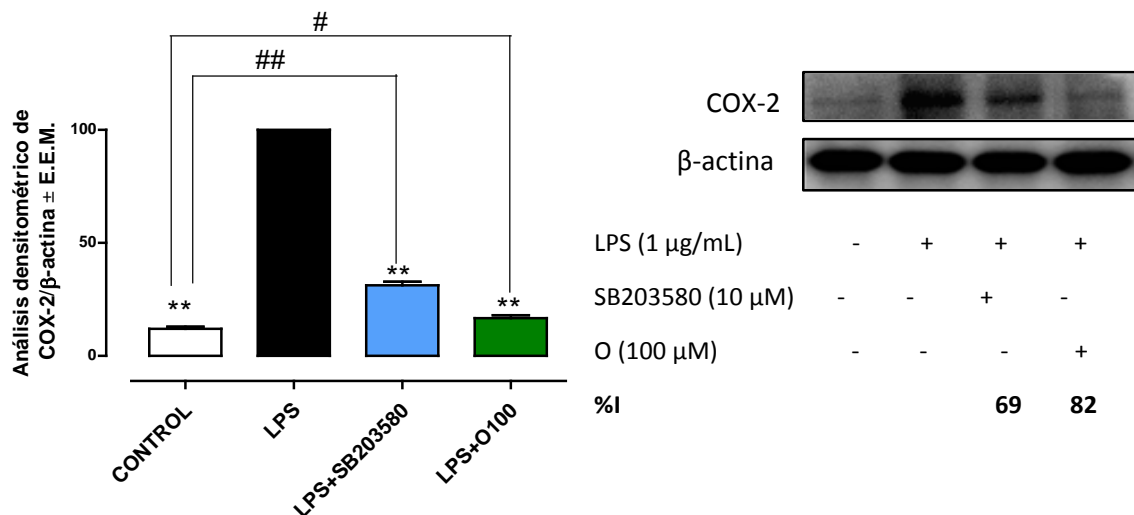
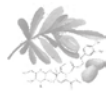


Figura 61. Efecto de oleuropeína (O) sobre COX-2 en IEC-18. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β -actina y considerando que el grupo LPS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet).

IV.3.2.2. Activación de p38 MAPK

Ante una agresión externa, las IEC son capaces de desencadenar una respuesta inmunológica primaria mediante la activación de vías de señalización implicadas en la inflamación, como por ejemplo las MAPK. Tras el estímulo con LPS durante 30 min, se detecta por western blot una



activación de p38 MAPK mediante la fosforilación de la subunidad p38 en el citosol, tal y como se observa en la Figura 62. Oleuropeina a 100 μ M es capaz de inhibir la fosforilación de la subunidad p38 MAPK al igual que el inhibidor específico de p38 MAPK, SB 203580 a 10 μ M.

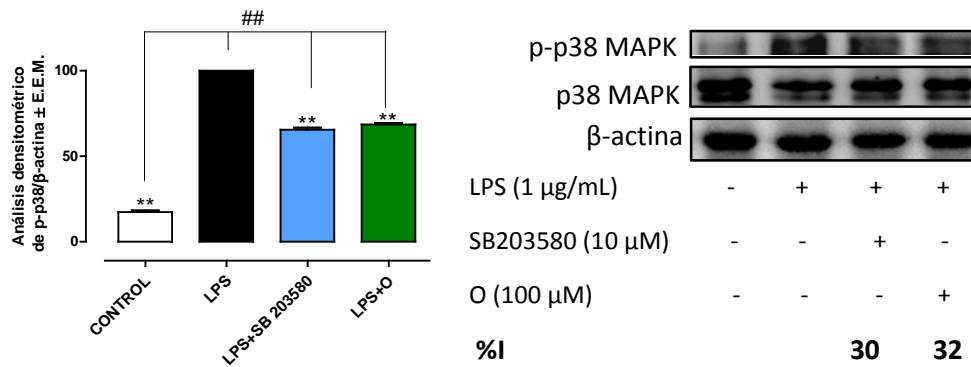


Figura 62. Efecto de oleuropeina (O) sobre la fosforilación de p38 MAPK en IEC-18. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de western blot de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β -actina y considerando que el grupo LPS posee el 100% de expresión. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (*t* de Dunnet).

IV.3.2.3. Expresión génica de anexina A1

Tras 6 h de estímulo con LPS, se observa que el tratamiento con oleuropeina, así como SB 203580, aumentan la expresión génica de anexina A1 con respecto a las células no tratadas. Este resultado indica que este incremento podría estar relacionado con la inhibición de la vía p38 MAPK.

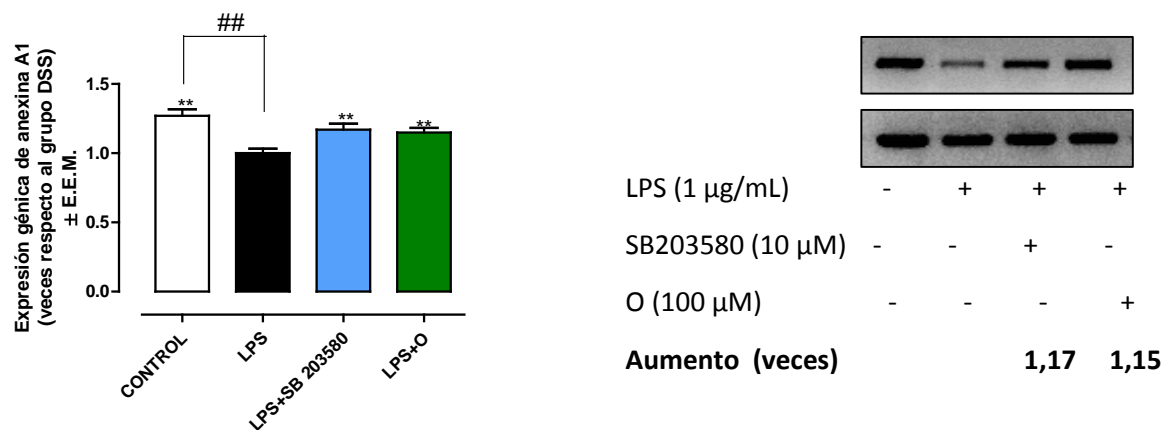
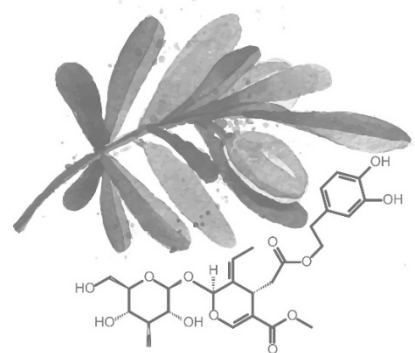
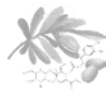


Figura 63. Efecto de oleuropeina (O) sobre la expresión génica de anexina A1 en IEC-18. Cada barra representa la media de los datos del análisis densitométrico de la expresión génica por RT-PCR de al menos cuatro experimentos independientes, se normaliza con β -actina y considerando que el grupo DSS tiene un valor = 1. Significativamente diferente respecto al grupo LPS: ** $p < 0,01$; significativamente diferente respecto al grupo control: ## $p < 0,01$ (t de Dunnett).

En conjunto, estos resultados demuestran que oleuropeina posee un efecto cicatrizante, inhibe la producción de COX-2 y aumenta la expresión génica de anexina A1, probablemente debido a la inhibición de la vía de señalización p38 MAPK.

Discusión





Los compuestos fenólicos representan un grupo de metabolitos secundarios, principalmente de origen vegetal, capaces de neutralizar radicales libres y actuar sobre distintas vías de señalización celular, lo que les confiere propiedades potencialmente útiles para la resolución de procesos inflamatorios. Uno de los campos donde se ha propuesto el empleo de este tipo de compuestos como coadyuvantes de la terapia convencional es en la EII (Frontela y cols., 2010). Un claro exponente es el aceite de oliva o los extractos procedentes de las diferentes partes de olivo. Estos extractos han demostrado poseer propiedades antiinflamatorias en modelos de inflamación intestinal (Sánchez-Fidalgo y cols., 2013). Uno de los componentes identificados y responsable de la actividad farmacológica es la oleuropeina. Este secoiridoide ha sido testado tanto *in vitro* como *in vivo* por sus propiedades antiinflamatorias y quimiopreventivas (Barbaro y cols., 2014; Rahmani y cols., 2014).

En la presente Tesis Doctoral, estos efectos se han podido corroborar *in vivo* en modelos de CU aguda y crónica y en CCR asociado a CU, mediante la administración de oleuropeina por vía oral bien junto al pienso normal, o incorporada en el agua de bebida.

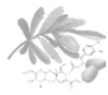
Los modelos de inflamación intestinal inducida por agentes químicos se han convertido en una herramienta crucial para el estudio de la EII. Son modelos de fácil inducción y con la capacidad de controlar inmediatamente el comienzo, la duración y la severidad de la inflamación en el intestino (Perše y Cerar, 2012). El DSS es un polisacárido sulfatado que reproduce en animal de experimentación los características fisiopatológicas de la colitis humana. La adición de DSS al agua de bebida provoca un daño en el intestino grueso muy similar histopatológicamente a la enfermedad en



humanos, y además, es un método bastante fiable para el estudio de terapias farmacológicas. Dependiendo del peso molecular del DSS (40-50 kDa es el rango óptimo), su concentración y la duración de la exposición, se desarrolla una colitis de carácter agudo, crónico o incluso puede inducir una displasia a nivel intestinal. La colitis aguda se induce incorporando DSS al 3-5% en agua de bebida *ad libitum* durante 5-8 días. La colitis crónica se induce mediante varios ciclos de 5-7 días con concentraciones bajas de DSS (1-2%) alternados de períodos de 7-14 días con agua de bebida (Clapper y cols., 2007).

Oleuropeina administrada diariamente por vía oral a la dosis de 2,4 g/kg protege frente a la inflamación intestinal inducida por DSS al 5% durante 7 días. Así, la pérdida de peso, diarrea, sangre en heces y el acortamiento del colon se ve reducida tras el tratamiento con oleuropeina. Además, se comprueba cómo se reduce la infiltración leucocitaria medida a través de la actividad MPO, lo que impide la degradación de la arquitectura del epitelio intestinal.

En la EII están implicadas diferentes citocinas con carácter pro o antiinflamatorio. En la CU inducida por DSS se observa un aumento en la liberación de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y IL-6 en el tejido de colon, las cuales son inhibidas tras el tratamiento con oleuropeina. Por otra parte, no se detectan diferencias significativas entre los niveles de IL-2 e IL-4 en el colon de los ratones del grupo control, DSS o el tratado con oleuropeina. Estos resultados coinciden con los de otros autores que sugieren que dichas citocinas no están implicadas en la inflamación intestinal inducida por DSS (Breese y cols., 1993; Alex y cols., 2009). Respecto a IL-10, su efecto antiinflamatorio queda demostrado en animales



deficientes en IL-10, desarrollando una colitis de forma espontánea, y demostrando por tanto, su papel protector en la inflamación intestinal (Kühn y cols., 1993). En este sentido, oleuropeina podría ejercer en parte su efecto protector a través del aumento de la liberación de IL-10, como se ha determinado en este estudio.

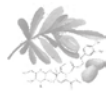
La participación de las vías de señalización NF- κ B, p38 MAPK y STAT3 es característica durante el desarrollo de la colitis (Suzuki y cols., 2001; Hommes y cols., 2002; Hollenbach y cols., 2004; Mitsuyama y cols., 2006; Bai y cols., 2007), regulando la expresión de numerosos genes relacionados con el proceso inflamatorio. En este contexto, oleuropeina reduce la activación de NF- κ B en el tejido de colon, e inhibe la fosforilación de p38 MAPK y STAT3 en el citosol. Este efecto impide que se incremente la expresión de citocinas, COX-2, iNOS o MMP-9, lo que confirma la ya existente relación entre la inhibición de estas vías y la producción de marcadores proinflamatorios.

Diferentes estudios han demostrado el importante papel de iNOS y COX-2 en la inflamación intestinal. La expresión de estas dos proteínas inflamatorias está regulada por distintas vías de señalización, y participan en la disfunción secretora y protectora de la barrera intestinal ante un proceso inflamatorio, contribuyendo a la inflamación del colon en ratones (Zamuner y cols., 2003; Sánchez-Fidalgo y cols., 2013). En la CU se produce un incremento de la expresión de iNOS, con el consiguiente aumento de la producción de NO, que induce la inflamación y la ulcerogénesis. La enzima iNOS es un excelente marcador inflamatorio, pero se asocia tanto al empeoramiento como a la mejora de la CU. De hecho, se ha demostrado este efecto dual en dos modelos distintos de colitis, donde la depleción de



iNOS en ratones tiene un efecto protector en colitis inducida por DSS, pero el proceso se agrava en colitis inducida por ácido sulfónico de trinitroclorobenceno (Singh y cols., 2011). Por otra parte, COX-2 parece tener un efecto protector sobre la mucosa en la inflamación intestinal, tal y como se observa en modelos animales de colitis donde se usan animales deficientes en COX-2 e inhibidores de COX (Ishikawa y cols., 2011). Sin embargo, se observan resultados contradictorios al utilizar celecoxib, un inhibidor selectivo de COX-2, que causa un empeoramiento del daño intestinal. Así, resultados obtenidos por Sklyarov y cols. (2011) evidencian que la inactivación simultánea de COX-2 e iNOS bajo condiciones de CU tiene efectos citoprotectores, lo que sugiere que el desarrollo de fármacos capaces de bloquear de manera combinada ambas proteínas proinflamatorias podría representar una nueva terapia en el tratamiento de la EII. En este estudio, el incremento de la expresión de COX-2 e iNOS en colitis aguda inducida por DSS se ha reducido significativamente por el tratamiento con oleuropeina, que podría relacionarse con la resolución del proceso inflamatorio debido al efecto observado en la mejora de la sintomatología de la colitis.

Las MMP están implicadas en el remodelado del tejido y la destrucción asociados a numerosas condiciones inflamatorias, y su expresión y actividad está incrementada en la mucosa intestinal durante las fases activas de la EII. Entre las proteasas, MMP-9 se encuentra sobreexpresada en pacientes con EII (Siloşi y cols., 2014) y en modelos de colitis inducida por DSS (Oliveira y cols., 2014). Además, se observó una reducción de la severidad de la colitis inducida por DSS en animales deficientes para MMP-9 (Santana y cols., 2006). En concreto en este modelo, la expresión de MMP-9 en el tejido de



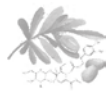
colon se ve disminuida por el tratamiento con oleuropeina. Este resultado podría ser interesante en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para tratar la EII actuando sobre la inhibición de las MMP.

Anexina A1 es una proteína calcio-dependiente de unión a fosfolípidos, mediador endógeno de la señal glucocorticoide con una potente actividad antiinflamatoria. En condiciones normales, anexina A1 se encuentra generalmente en el citoplasma y tras la activación celular, se moviliza a la superficie celular y se secreta (Perretti y D'Acquisto, 2009). Esta proteína es capaz de bloquear la liberación de mediadores inflamatorios mediante la inhibición directa de la activación de fosfolipasa-A2 y la expresión de COX-2 e iNOS (Ferlazzo y cols., 2003). En un modelo de colitis inducida por DSS, animales deficientes en anexina A1 mostraron una mayor susceptibilidad con un incremento en la extensión del daño de la mucosa intestinal, tanto clínica como histopatológicamente (Babbin y cols., 2008). Así, en las muestras de colon de los animales tratados con oleuropeina se observa un aumento de los niveles de ARNm de anexina A1, lo que indica que potencia su expresión y consecuentemente su efecto antiinflamatorio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tang y cols. (2011) para el anestésico propofol, que ejerce un efecto antiinflamatorio al inhibir la vía p38 MAPK, mediado por el aumento de la expresión de anexina A1. Además, Yang y cols. (2006) determinaron que anexina A1 es un inhibidor endógeno de la activación de MAPK y de la expresión de IL-6. En este estudio, oleuropeina también inhibe la fosforilación de p38 MAPK y la liberación de IL-6. Estos resultados podrían sugerir que oleuropeina afecta a la activación de p38 MAPK vía anexina A1.



El estudio realizado *in vitro* con macrófagos peritoneales aislados de ratón y estimulados con LPS sugiere que el efecto antiinflamatorio observado *in vivo* para oleuropeina pudiera estar mediado en parte por uno de sus metabolitos, el hidroxitirosol, ya que, como se indicó previamente, la molécula de oleuropeina llega prácticamente intacta al colon, donde es metabolizada por la microbiota y libera hidroxitirosol (Corona y cols., 2009). A diferencia de su precursor, hidroxitirosol inhibe la activación del NF- κ B y STAT3, reduce los niveles de NO, la expresión génica de IL-1 β , TNF- α e IL-6 y su liberación al medio.

Además del efecto protector en la inflamación aguda, se ha demostrado que oleuropeina administrada a una dosis de 500 mg/kg/día durante 56 días es capaz de disminuir los signos y síntomas típicos que caracterizan a la colitis crónica inducida por DSS. En este modelo, el parámetro peso/longitud se incrementa notablemente debido al edema e inflamación crónica en el colon. La administración de oleuropeina reduce tanto este parámetro como la gravedad asociada a la enfermedad reflejado con un menor IAE. Dicha mejoría también se puede observar a nivel histológico. Tras la administración de DSS, aparecen daños de carácter agudo, con pérdida de criptas y ulceraciones. Durante la fase de recuperación, donde los animales reciben agua de bebida, se reduce la inflamación y se activan los procesos de regeneración de la mucosa para restaurar las lesiones. Sin embargo, tras varias exposiciones a DSS, se desestabilizan los mecanismos de reparación intestinal y la mucosa comienza a presentar una estructura irregular (Clapper y cols., 2007). La pared intestinal presenta una remodelación de la mucosa: úlceras epitelizadas pero con una gran cantidad de tejido fibrótico, lo que implica



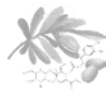
una pérdida de la función tisular. La infiltración celular en la colitis crónica se caracteriza por la presencia de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Oleuropeina mejora la epitelización y reduce las ulceraciones, lo que sugiere un efecto cicatrizante, así como inhibe de la infiltración de células inmunes al tejido intestinal inflamado.

Durante la inflamación intestinal, un complejo entramado de señales celulares desencadena la liberación de mediadores inflamatorios, capaces de activar y modular la respuesta inmunológica. La citocina IL-1 β es una de las responsables de la iniciación y amplificación de la respuesta inmunológica. Aunque se ha demostrado una mejora del daño intestinal con agentes bloqueantes de IL-1 β en modelos agudos (Cominelli y cols., 1992; Siegmund y cols., 2001), se ha propuesto el papel de esta citocina en el mantenimiento de la inflamación ya que puede participar en la cronificación de la enfermedad al activar la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ en un modelo de colitis crónica (Coccia y cols., 2012). Por otra parte, se han encontrado niveles séricos elevados de IL-6 tanto en situaciones inflamatorias de carácter agudo como crónico. IL-6 incrementa la resistencia a la apoptosis en pacientes con CU, lo que contribuye a la cronificación de la inflamación (Atreya y cols., 2000). Además, el bloqueo de IL-6 atenúa los síntomas de colitis inducida por DSS, por lo que la interferencia en la cascada de IL-6 podría ser una terapia potencial para tratar la inflamación intestinal crónica. Una sobreproducción de estas citocinas puede provocar un desequilibrio en la respuesta inmunológica, perpetuando la situación e induciendo una inflamación crónica. La citocina antiinflamatoria IL-10 es producida principalmente por los linfocitos T reguladores y juega un importante papel en la resolución de la inflamación



al reducir la expresión de otros mediadores proinflamatorios, atenuando la inflamación de la mucosa (Rizzo y cols., 2011). Oleuropeina parece modular la activación y la migración de las células del sistema inmunológico mediante la inhibición o activación selectiva de citocinas en el colon, ya que reduce los niveles de IL-6 y IL-1 β mientras que aumenta la expresión de IL-10, efectos que resultan en una mejora de la inflamación.

La activación de la vía de señalización MAPK provoca la liberación de IL-6, TNF- α e IL-1 β por macrófagos y de numerosos mediadores proinflamatorios por el epitelio intestinal. A su vez, éstas citocinas pueden activar esta vía, formando un ciclo que favorece el desarrollo de la EII. Bajo estas condiciones, la inflamación se torna irresoluble y se cronifica. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, oleuropeina inhibe la activación de p38 MAPK tanto en un modelo de inflamación aguda como crónica. Sin embargo, mientras que inhibe la actividad NF- κ B en colitis aguda, no parece ejercer ningún efecto en el proceso crónico. La expresión de genes proinflamatorios dependientes de NF- κ B se regula mediante el tipo celular y el ambiente en el que se encuentre (Pereira y Oakley, 2008), aunque *per se*, puede inducir genes que limiten la duración y la magnitud de la respuesta inflamatoria (Newton y Dixit, 2012). Se ha observado que NF- κ B puede tener efectos antiinflamatorios mediante la manipulación de la expresión de distintos genes, inhibiendo la producción de mediadores proinflamatorios y aumentando la liberación de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Lawrence y Fong, 2010). Además, aunque la activación p50:p65 esté ligada al desarrollo del proceso inflamatorio, Newton y Dixit (2012) sugieren que las subunidades p65 e IKK de NF- κ B pueden proteger frente la



apoptosis y el daño tisular, manteniendo la homeostasis normal del tejido intestinal.

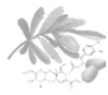
En este estudio se observa también que las diferencias de los niveles de β -catenina entre los distintos grupos son muy poco significativas. Esto podría deberse a que el método empleado no es adecuado para observar cambios en esta vía, pues según Talero y cols. (2011), se necesitan un mayor número de ciclos de DSS para que esta vía se active.

La pérdida del balance entre la expresión de proteínas proinflamatorias y antiinflamatorias contribuye a una cascada inflamatoria en el proceso patogénico de la colitis. Así, COX-2 esta sobreexpresada en el epitelio de colon de los pacientes con CU (Tsatsanis y cols., 2006). La inhibición de la expresión de COX-2 e iNOS, ambas proteínas proinflamatorias en este modelo al igual que en el proceso agudo por parte de oleuropeina, implica una mejora en la colitis crónica que puede deberse, en parte, al efecto que produce sobre las distintas vías de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria. Asimismo, estudios *in vitro* llevados a cabo con la línea celular IEC-18 demuestran que, tras estimular las células con LPS, se produce una activación de la vía p38 MAPK y un aumento de la expresión de COX-2. En estas condiciones experimentales, oleuropeina provoca un moderado bloqueo de la fosforilación de esta vía, así como una reducción de los niveles de COX-2, imitando el efecto obtenido al tratar las IEC-18 con un inhibidor selectivo de la fosforilación de p38 MAPK. Estos resultados sugieren que oleuropeina reduce los niveles de COX-2, en parte, debido a la inhibición de la vía p38 MAPK.

Las continuas agresiones en el epitelio intestinal debidas a la cronicidad del proceso inflamatorio en la EII, provocan la alteración de los



procesos de cicatrización epitelial en el intestino, dificultando el proceso de cierre de heridas y aumentando la producción de tejido fibrótico, con la consecuente pérdida de funcionalidad. Además, el tratamiento con corticoides puede dificultar la cicatrización de las úlceras, mediante la reducción de la migración de las células y retrasando el proceso de restitución epitelial. Por eso, se requiere la búsqueda de nuevas terapias que favorezcan la correcta reparación del epitelio intestinal en pacientes con EII. Diferentes estudios indican que anexina A1 está implicada en el proceso de reparación epitelial, al observar que animales deficientes en anexina A1 en IEC muestran un déficit en la cicatrización de la mucosa intestinal, mientras que su administración exógena mejora la recuperación de las heridas (Leoni y cols., 2013). De acuerdo con estos resultados, en el modelo de colitis crónica inducida por DSS, que implica un desequilibrio en los procesos de cicatrización intestinal debido a la exposición prolongada y alternada del DSS, se observa un aumento significativo de la expresión génica de anexina A1 en el colon de los animales tratados con oleuropeina, evidenciando, una vez más, el efecto potenciador de oleuropeina sobre la liberación de anexina A1, pudiendo activar los procesos de cicatrización y regeneración epitelial. Así pues, oleuropeina facilita la cicatrización *in vitro*, observando un incremento significativo de la migración celular a las 24 h con respecto al control, sin afectar al proceso de proliferación. Además, se observa que el tratamiento con oleuropeina aumenta la expresión génica de anexina A1 en estas células, lo que a su vez se relaciona con una inhibición de la vía p38 MAPK. Esto puede confirmar que oleuropeina mejora el proceso de cicatrización al estimular la producción de anexina A1 en el epitelio intestinal. Estos resultados son muy prometedores ya que las recientes terapias farmacológicas en la EII van encaminadas a mejorar estos



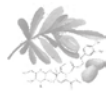
procesos, e incluso Leoni y cols. (2015) demuestran que la administración de micropartículas de un análogo de anexina A1 mejora el proceso de restitución epitelial en heridas en el colon realizadas tras una cirugía, lo que abre nuevas alternativas para el tratamiento de la EII. De la misma manera, recientes estudios sugieren que la activación del factor NF- κ B es necesaria para inducir el proceso de cicatrización (Carvalho y cols., 2014), por lo que su inhibición podría dificultar la reepitelización de las úlceras intestinales. En estudios realizados por Rodrigues y cols. (2012) y Andújar y cols. (2013) se observa que los tratamientos utilizados para mejorar este proceso no inhiben sino que incluso incrementan la activación de NF- κ B. Es por ello que el hecho de que oleuropeina no inhiba NF- κ B en el modelo de colitis crónica podría estar también relacionado con la capacidad de mejorar la cicatrización, aunque se requiere de más estudios para verificar esta hipótesis.

Debido a la potenciación de mecanismos antiinflamatorios endógenos observados tras el tratamiento de oleuropeina, como el incremento de IL-10 o de anexina A1, se plantea determinar el efecto de oleuropeina sobre Nrf-2, factor que activa la expresión y la coordinación de una batería de genes defensivos, que codifican para enzimas detoxificantes y proteínas antioxidantes. La disrupción de esta vía provoca un aumento de la susceptibilidad al estrés oxidativo y, en consecuencia, al daño inflamatorio en el tejido. Nrf-2 se activa, pasa al núcleo, e induce la expresión de enzimas antioxidantes, además de ejercer un efecto antiinflamatorio al regular la expresión de mediadores como las citocinas IL-6, IL-1 β o TNF- α (Yao y cols., 2014). El relevante papel de Nrf-2 lo demostraron Khor y cols. en 2006, observando que animales deficientes en este factor eran mucho más



susceptibles a la colitis inducida por DSS que las cepas salvajes. En nuestro estudio, el grupo DSS experimenta una reducción de los niveles de Nrf-2 sugiriendo que se produce un fallo en el sistema de auto-defensa celular durante el proceso inflamatorio. Sin embargo, al administrar oleuropeina, la expresión de Nrf-2 es superior incluso al grupo control, lo que indica que, en concordancia con los anteriores resultados, este compuesto estimula los procesos antiinflamatorios y antioxidantes propios del organismo.

Es conocido el hecho de que la inflamación crónica presente en la CU es uno de los factores que pueden desencadenar CCR (Yashiro, 2014). Así, tras observar el efecto antiinflamatorio y protector de oleuropeina en los distintos modelos de inflamación intestinal inducida por DSS, se procede a evaluar su efecto y los mecanismos moleculares en un modelo de CCR inducido por AOM y DSS. Tras la inyección de AOM y exposición a tres ciclos de DSS al 1,5% se observa una pérdida significativa del peso de los animales acompañada del desarrollo de tumores en el colon. Este estudio demuestra por primera vez que oleuropeina reduce de forma efectiva la inflamación asociada a la colitis y disminuye la multiplicidad de tumores, tal y como se refleja en una mejora de los síntomas clínicos, del IAE y de la incidencia de displasias en el colon. Este efecto protector se confirma con una menor intensidad del daño tisular y alteraciones a nivel nuclear. Estudios epidemiológicos han demostrado la asociación entre las dietas ricas en los compuestos fenólicos del aceite de oliva y una menor ratio de mortalidad de cáncer (Bernini y cols., 2013). También se ha descrito que la administración diaria de estos polifenoles protege frente a colitis crónica inducida por DSS (Sánchez-Fidalgo y cols., 2013), y es efectiva frente al CCR



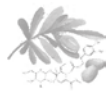
asociado a colitis tras 15 ciclos de exposición a DSS en ratas (Sánchez-Fidalgo y cols., 2010).

Se ha propuesto el uso de 5-ASA a una dosis de 75 mg/kg como fármaco de referencia, ya que en estudios previos ha demostrado un claro efecto quimiopreventivo en este modelo (Clapper y cols., 2008). En los animales tratados con 5-ASA se observa un empeoramiento clínico durante el primer ciclo de DSS. Sin embargo, al final del experimento el tratamiento con éste fármaco muestra un efecto protector en concordancia con estudios anteriores (Clapper y cols., 2008), con una reducción de los parámetros histológicos e inflamatorios, una menor formación de tumores y una clara inhibición de vías de señalización clave implicadas en el CCR. 5-ASA es un fármaco ampliamente utilizado para el mantenimiento de la remisión en pacientes con CU, debido a su eficacia probada y los pocos efectos adversos que presenta comparado con otros tratamientos, aunque su mecanismo de acción no esté completamente esclarecido y no se encuentre establecida la dosis óptima de 5-ASA por día (Hauso y cols., 2015). Algunos estudios han demostrado que la administración de 2-2,4 g/día es suficiente para tratar la CU moderada, pero pacientes con brotes frecuentes necesitan ser tratados con altas dosis de 5-ASA (4-4,8 g/día) para mitigar los síntomas de la CU severa (D'Argenio y cols., 1994; Feagan y Macdonald, 2012). Debido a la colitis tan agresiva observada durante el primer ciclo de DSS en nuestro experimento, se contempla el hecho de que la dosis de 5-ASA fuera suficiente para mostrar el efecto quimiopreventivo a largo plazo, pero demasiado baja para tratar la severa inflamación intestinal producida por el DSS. Otra hipótesis podría ser que 5-ASA no es efectivo en algunos modelos animales de colitis (Fedorak y cols., 1990), y



un reciente estudio demuestra que la exposición a DSS perjudica el metabolismo del tejido de colon, reduciendo la biotransformación a su metabolito mayoritario, un derivado acetil (Ac-5-ASA). Este resultado podría explicar, a su vez, por qué algunos pacientes son refractarios a estas terapias (Ramírez-Alcántara y Montrose, 2014).

Uno de los marcadores tempranos de CCR es el acúmulo de β -catenina. Esta proteína presenta un importante papel en la regulación de la proliferación celular. Es frecuente encontrar mutaciones de β -catenina en modelos de CCR inducidos por agentes químicos. El AOM provoca mutaciones en los codones 33 y 41 de β -catenina, ambos sitios importantes para la fosforilación de GSK-3 β , así como los codones 32 y 34, que podrían afectar también a este proceso. Estos cambios producen alteraciones en la distribución nuclear y un aumento de la expresión citoplasmática de β -catenina (Takahashi y cols., 1998), en concordancia con la distribución anormal celular de esta proteína en el CCR asociado a colitis en humanos (Aust y cols., 2001), y sugiriendo que la vía wnt/ β -catenina juega un importante papel en el desarrollo del CCR tanto en animales como en humanos (Pandurangan, 2013). En los animales tratados con oleuropeina se ha comprobado como el incremento de β -catenina está revertido. A nivel molecular parece ser que bloquea la translocación al núcleo de β -catenina, afectando a la expresión de los genes relacionados con la activación de la transcripción inducida por β -catenina, como se observa en la reducción de los niveles de COX-2. La expresión de COX-2 está aumentada en procesos inflamatorios y tiene un papel crítico en el cáncer intestinal, debido a la producción de prostaglandinas, que actúan como mediadores proinflamatorios en la última fase de la carcinogénesis. (Li y cols., 2014)



Además, se ha demostrado que la administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), reduce la incidencia de cáncer en algunos modelos de CCR (Williams y cols., 1999).

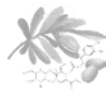
El efecto represor de oleuropeina mostrado sobre el NF- κ B en la colitis aguda inducida por DSS, se ha observado también en este estudio. NF- κ B está relacionado con numerosos procesos fisiológicos y patogénicos, especialmente en la modulación de la inflamación. Aunque el papel de NF- κ B en CU y EC no está totalmente esclarecido, varios estudios describen diferentes mecanismos por los que NF- κ B puede participar en el desarrollo del CCR asociado a colitis, como la inhibición de IKK β , que reduce la incidencia de tumores en animales (Greten y cols., 2004). Además, en nuestro caso, oleuropeina reduce la liberación de mediadores inflamatorios relacionados con la activación de NF- κ B. Por ejemplo, citocinas como TNF- α e IL-6 son moléculas clave relacionadas con la progresión del CCR. TNF- α actúa como primera señal para desencadenar la respuesta inflamatoria, pero también facilita el crecimiento tumoral, el reclutamiento celular, la angiogénesis y la invasión (Balkwill, 2009). Por su parte, IL-6 activa STAT3, el cual provoca la expresión de proteínas antiapoptóticas, incrementando la resistencia de las células inflamatorias a la muerte celular programada, y perpetuando la inflamación crónica (Atreya y Neurath, 2005). Kim y cols. (2013) han demostrado que tras la activación de la vía JAK1-STAT3-Oct4, IL-6 promueve la conversión de células sanas a células cancerígenas. Además, puesto que modula la fosforilación de STAT3, un aumento de IL-6 en el ambiente inflamatorio provoca una activación continua de esta vía. En nuestro estudio, oleuropeina inhibe la producción de IL-6 en el tejido intestinal y reduce la presencia de STAT3 fosforilado en el núcleo, por lo que



podría romper este círculo de retroalimentación positivo, aunque se necesitan más estudios para determinar su mecanismo exacto.

Con el fin de establecer el efecto proapoptótico de oleuropeína, se estudia si el efecto antitumoral observado está relacionado con dicho proceso, afectando a la expresión de las proteínas implicadas en el proceso de la apoptosis. La subfamilia Bcl-2, son proteínas antiapoptóticas y promueven la supervivencia celular, mientras que miembros de otra subclase, como Bax, son proapoptóticos y activan la muerte celular programada. Mediante la activación del factor p53, el aumento de la expresión de Bax y/o la regulación a la baja de Bcl-2 forman poros a través de la membrana mitocondrial y favorecen la apoptosis. Los animales tratados con oleuropeína muestran un incremento de la expresión de Bax, lo que sugiere que oleuropeína puede actuar sobre esta vía, regulando el proceso de apoptosis celular en el intestino (Watson, 2006). Asimismo, se sabe que p53 reprime la fosforilación de Akt por PI3K, una vía de señalización implicada en la supervivencia celular. En nuestro estudio, oleuropeína inhibe la fosforilación de Akt, pero no se detectan cambios en la translocación de p53 al núcleo. Son resultados en cierto modo contradictorios, pero por otra parte, sí que se ha determinado *in vitro* que oleuropeína activa la vía p53 reduciendo la apoptosis (Cárdeno y cols., 2013).

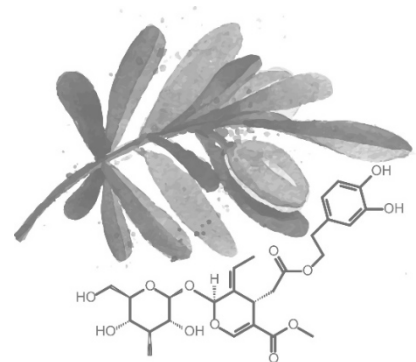
Se ha sugerido que existe una comunicación cruzada entre el desarrollo de CCR y el subtipo de células T colaboradoras, la respuesta Th17, las cuales, mediante la liberación de citocinas, crean un ambiente inflamatorio y estimulan la aparición y la progresión del tumor en algunos modelos de CCR. Particularmente, en el modelo de CCR inducido por AOM



y DSS, se ha demostrado que animales deficientes en IL-17A expresan niveles más bajos de IL-6, TNF- α e IFN- γ , desarrollan una colitis menos agresiva, así como menos tumores y con menor tamaño que los animales de cepa salvaje, demostrando un claro papel de las citocinas Th17 (Hyun y cols., 2012). En este sentido, oleuropeina inhibe el incremento de los niveles tisulares de IL-17 e IFN- γ en el modelo de CCR, reduce la población celular de CD4⁺ROR γ t⁺ y de CD4⁺ROR γ t⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺ en la *lamina propria* y disminuye la liberación de IL-17A e IFN- γ en el tejido intestinal inflamado en colitis aguda inducida por DSS. Estos resultados muestran que el efecto de oleuropeina sobre la inflamación podría producirse mediante la modulación de sistema inmune.

En conjunto, oleuropeina puede ser considerada como un buen agente antiinflamatorio capaz de proteger frente a la CU, tanto aguda como crónica, reduciendo además la incidencia de tumores en el CCR asociado a CU, pero no la prevalencia. A nivel molecular, oleuropeina afecta a numerosas vías de señalización implicadas en los procesos inflamatorios, pero se destaca el incremento que produce tanto *in vivo* como *in vitro* de mediadores antiinflamatorios como IL-10, anexina A1 y Nrf-2. Además, se abre una nueva vía de investigación en la búsqueda de fármacos capaces de modular la respuesta inflamatoria Th17 y que pudiera ser útil en la terapéutica humana.

Conclusiones





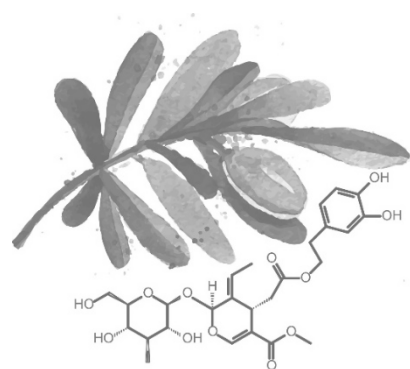
1. El secoiridoide fenólico oleuropeina administrado por vía oral, incorporado en la dieta o disuelto en el agua de bebida, protege a los ratones frente a la colitis ulcerosa aguda y crónica inducidas por DSS, así como frente al cáncer colorrectal asociado a colitis inducido por AOM/DSS.
2. En el modelo de colitis aguda inducida por DSS, oleuropeina administrada en la dieta al 1% protege frente a la inflamación intestinal como demuestra la mejoría de los parámetros histológicos (menor infiltración, reducción de la ulceración y edema). A nivel molecular, marcadores inflamatorios como citocinas, COX-2, iNOS y MMP-9 están reducidos debido a la inhibición de las vías de señalización NF- κ B, p38 MAPK y STAT3.
3. Se ha descrito por primera vez que oleuropeina, administrada a la dosis de 100 mg/kg, modula la respuesta Th17 reduciendo las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ ROR γ t⁺ y linfocitos CD4⁺ ROR γ t⁺ IFN- γ ⁺ IL-17A⁺ en la *lamina propria* de los animales colíticos, así como la concentración de IL-17 e IFN γ en el tejido inflamado.
4. En el modelo de colitis crónica inducida por DSS, oleuropeina incorporada en la dieta al 0,25% durante 56 días, estimula los mecanismos antiinflamatorios endógenos al aumentar la expresión de Nrf-2, la liberación de IL-10 y la expresión génica de anexina A1. A este efecto se suma la inhibición de diferentes mediadores proinflamatorios y de la vía de señalización p38 MAPK.
5. Oleuropeina a 10 y 100 μ M promueve la cicatrización *in vitro* en IEC-18, al incrementar la velocidad de migración. Así mismo, reduce la expresión

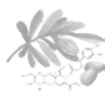


de COX-2 y la activación de p38 MAPK tras estimular las células con LPS, efectos que podrían estar relacionados con un incremento en la expresión génica de anexina A1. Por otra parte, este efecto cicatrizante se ha observado en el análisis histológico de los ratones colíticos crónicos. En este caso, la reepitelización de la mucosa intestinal podría estar favorecida además por la no inhibición del NF- κ B.

6. Aunque no se ha observado una disminución de la prevalencia del CCR asociado a colitis inducido por AOM/DSS, la administración de oleuropeina en el agua de bebida a 100 mg/kg durante 70 días, reduce de forma dosis dependiente la incidencia de tumores. Los resultados sugieren que en el mecanismo molecular está implicada la inhibición de diferentes vías de señalización características del proceso tumoral como β -catenina y PI3K/Akt.

Bibliografía

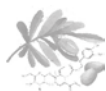




1. Abe R, Beckett J, Abe R, Nixon A, Rochier A, Yamashita N, Sumpio B. Olive oil polyphenol oleuropein inhibits smooth muscle cell proliferation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011; 41:814-820.
2. Acquaviva R, Di Giacomo C, Sorrenti V, Galvano F, Santangelo R, Cardile V, Gangia S, D'Orazio N, Abraham NG, Vanella L. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int J Oncol.* 2012; 41:31-38.
3. Adcock IM, Ito K, Barnes PJ. Glucocorticoids: effects on gene transcription. *Proc Am Thorac Soc.* 2004; 1:247-254.
4. Al-Azzawie HF, Alhamdani MS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.* 2006; 78:1371-1377.
5. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15:341-352.
6. Amiot, M, Fleuriet, A, Macheix, J. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry.* 1989; 28:67-69.
7. Amor KT, Ryan C, Menter A. The use of cyclosporine in dermatology: part I. *J Am Acad Dermatol.* 2010; 63:925-946.
8. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagacé C, Scott R, Amininejad L, Bumpstead S, Baidoo L, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Büning C, Colombel JF, Denson LA, De Vos M. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet.* 2011; 43:246-252.
9. Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, Constantinou M, Agalias A, Magiatis P, Skaltsounis AL, Kamber E, Tsantili-Kakoulidou A, Kremastinos DT. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr.* 2006; 136:2213-2219.
10. Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos DT. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42:549-558.



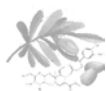
11. Andreadou I, Mikros E, Ioannidis K, Sigala F, Naka K, Kostidis S, Farmakis D, Tenta R, Kavantzias N, Bibli SI, Gikas E, Skaltsounis L, Kremastinos DT, Iliodromitis EK. Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 69:4-16.
12. Andreadou I, Benaki D, Efentakis P, Bibli SI, Milioni AI, Papachristodoulou A, Zoga A, Skaltsounis AL, Mikros E, Iliodromitis EK. The natural olive constituent oleuropein induces nutritional cardioprotection in normal and cholesterol-fed rabbits: comparison with preconditioning. *Planta Med.* 2015; 81:655-663.
13. Andújar I, Recio MC, Bacelli T, Giner RM, Ríos JL. Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with I κ B degradation thus inhibiting translocation of NF- κ B to the nucleus. *Br J Pharmacol.* 2010; 160:376-388.
14. 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; 59:6474-6483.
15. 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; doi: 10.1155/2012/271606.
16. Andújar I, Ríos JL, Giner RM, Recio MC. Shikonin promotes intestinal wound healing in vitro via induction of TGF- β release in IEC-18 cells. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 49:637-641.
17. Anter J, Fernández-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Demyda-Peyras S, Moreno-Millán M, Alonso-Moraga A, Muñoz-Serrano A, Luque de Castro MD. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutat Res.* 2011; 723:165-170.
18. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann 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; 6:583-588.
19. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2005; 28:187-196.



20. Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chew K, Ferrell L, Florendo C, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Löhrs U, Waldman FM. Altered distribution of beta-catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancers. *Mod Pathol*. 2001; 14:29-39.
21. Babbitt BA, Laukoetter MG, Nava P, Koch S, Lee WY, Capaldo CT, Peatman E, Severson EA, Flower RJ, Perretti M, Parkos CA, Nusrat A. Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *J Immunol*. 2008; 181:5035-5044.
22. Bai A, Hu P, Chen J, Song X, Chen W, Peng W, Zeng Z, Gao X. Blockade of STAT3 by antisense oligonucleotide in TNBS-induced murine colitis. *Int J Colorectal Dis*. 2007; 22:625-635.
23. Bali EB, Ergin V, Rackova L, Bayraktar O, Küçükboyacı N, Karasu Ç. Olive leaf extracts protect cardiomyocytes against 4-hydroxynonenal-induced toxicity in vitro: comparison with oleuropein, hydroxytyrosol, and quercetin. *Planta Med*. 2014; 80:984-992.
24. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:361-371.
25. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, Balsano C. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:18508-18524.
26. Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007; 23:16-20.
27. Benson JM, Peritt D, Scallon BJ, Heavner GA, Shealy DJ, Giles-Komar JM, Mascelli MA. Discovery and mechanism of ustekinumab: a human monoclonal antibody targeting interleukin-12 and interleukin-23 for treatment of immune-mediated disorders. *MAbs*. 2011; 3:535-545.
28. 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; 84:1459-1469.
29. Bernini R, Merendino N, Romani A, Velotti F. Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Curr Med Chem*. 2013; 20:655-670.



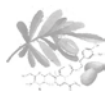
30. Biancone L, Calabrese E, Petruzzello C, Pallone F. Treatment with biologic therapies and the risk of cancer in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2007; 4:78-91.
31. Biasi F, Astegiano M, Maina M, Leonarduzzi G, Poli G. Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease. *Curr Med Chem.* 2011; 18:4851-4865.
32. 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.
33. Birrell MA, McCluskie K, Wong S, Donnelly LE, Barnes PJ, Belvisi MG. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. *FASEB J.* 2005; 19:840-841.
34. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51:971-974.
35. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012; 142:46-54.
36. Bousoño C, Ramos, E. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Bol Pediatr.* 2006; 46:91-99.
37. Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology.* 1993; 78:127-131.
38. Bryant RV, Brain O, Travis SP. Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2015; 50:90-112.
39. Camacho-Barquero L, Villegas I, Sánchez-Calvo JM, Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol.* 2007; 7:333-342.



40. Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Rosillo MA, Alarcón de la Lastra C. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 α . *Nutr Cancer*. 2013; 65:147-156.
41. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:622-629.
42. Carroll RE, Benya RV, Turgeon DK, Vareed S, Neuman M, Rodriguez L, Kakarala M, Carpenter PM, McLaren C, Meyskens FL Jr, Brenner DE. Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011; 4:354-364.
43. Carvalho L, Jacinto A, Matova N. The Toll/NF- κ B signaling pathway is required for epidermal wound repair in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; doi: 10.1073/pnas.1408224111
44. Chandar AK, Singh S, Murad MH, Peyrin-Biroulet L, Loftus EV Jr. Efficacy and Safety of Natalizumab and Vedolizumab for the Management of Crohn's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21:1695-1708.
45. Chande N, Tsoulis DJ, MacDonald JK. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; doi: 10.1002/14651858.
46. Chaparro M, Gisbert J. Papel de los fármacos tiopurínicos en la colitis ulcerosa. *Gastroenterol Hepatol*. 2011; 34:30-35.
47. Charoenprasert S, Mitchell A. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem*. 2012; 60:7081-7095.
48. Chimento A, Casaburi I, Rosano C, Avena P, De Luca A, Campana C, Martire E, Santolla MF, Maggiolini M, Pezzi V, Sirianni R. Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2014; 58:478-489.
49. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011; 60:788-798.



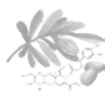
50. Citronberg J, Bostick R, Ahearn T, Turgeon DK, Ruffin MT, Djuric Z, Sen A, Brenner DE, Zick SM. Effects of ginger supplementation on cell-cycle biomarkers in the normal-appearing colonic mucosa of patients at increased risk for colorectal cancer: results from a pilot, randomized, and controlled trial. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013; 6:271-281.
51. Clapper ML, Cooper HS, Chang WC. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin*. 2007; 28:1450-1459.
52. Clapper ML, Gary MA, Coudry RA, Litwin S, Chang WC, Devarajan K, Lubet RA, Cooper HS. 5-aminosalicylic acid inhibits colitis-associated colorectal dysplasias in the mouse model of azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14:1341-1347.
53. Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, Maloy KJ. IL-1 β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4⁽⁺⁾ Th17 cells. *J Exp Med*. 2012; 209:1595-1609.
54. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology*. 2007; 132:52-65.
55. Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology*. 1992; 103:65-71.
56. Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R, Carlini EA. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*. 2000; 35:45-54.
57. Corona G, Tzounis X, Assunta Dessì M, Deiana M, Debnam ES, Visioli F, Spencer JP. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic Res*. 2006; 40:647-658.
58. Corona G, Spencer JP, Dessì MA. Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health*. 2009; 25:285-293.



59. Corridonia D, Arseneau KO, Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Inmunol letters*. 2014; 161:231–235.
60. Coskun M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Front Med (Lausanne)*. 2014; 25:1-24.
61. Crohn BRH. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci*. 1925; 170:220-228.
62. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an *in vivo* model of inflammation. *J Clin Invest*. 1993; 92:2675-2682.
63. Cruz-Correa M, Shoskes DA, Sanchez P, Zhao R, Hylind LM, Wexner SD, Giardiello FM. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006; 4:1035-1038.
64. 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; 72:221-229.
65. Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle P. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem Int*. 2011; 58:700-707.
66. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011; 365:1713-1725.
67. D'Argenio G, Cosenza V, Sorrentini I, De Ritis F, Gatto A, Delle Cave M, D'Armiento FP, Mazzacca G. Butyrate, mesalamine, and factor XIII in experimental colitis in the rat: effects on transglutaminase activity. *Gastroenterology*. 1994; 106:399-404.
68. Dassopoulos T, Sultan S, Falck-Ytter YT, Inadomi JM, Hanauer SB. American Gastroenterological Association Institute technical review on the use of thiopurines, methotrexate, and anti-TNF- α biologic drugs for the induction and maintenance of remission in inflammatory Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2013; 145:1464-1478.
69. De Bock M, Derraik JG, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, Hofman PL, Cutfield WS. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS One*. 2013; doi: 10.1371/journal.pone.0057622.



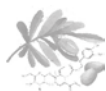
70. De Ludicibus S, Stocco G, Martelossi S, Londero M, Ebner E, Pontillo A, Lionetti P, Barabino A, Bartoli F, Ventura A, Decorti G. Genetic predictors of glucocorticoid response in pediatric patients with inflammatory bowel diseases. *J Clin Gastroenterol*. 2011; doi: 10.1097/MCG.0b013e3181e8ae93
71. De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49:405-430.
72. De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57:445-449.
73. De la Puerta R, Martínez Domínguez ME, Ruíz-Gutiérrez V, Flavill JA, Hoult JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life Sci*. 2001; 69:1213-1222.
74. 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; 26:335-341.
75. Dell'Agli M, Maschi O, Galli GV, Fagnani R, Dal Cero E, Caruso D, Bosisio E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *Br J Nutr*. 2008; 99:945-951.
76. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SP, European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis*. 2010; 4:28-62.
77. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel JF, Allez M, D'Haens G, D'Hoore A, Mantzaris G, Novacek G, Oresland T, Reinisch W, Sans M, Stange E, Vermeire S, Travis S, Van Assche G. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis*. 2012; 6:991-1030.
78. Ding Y, Yao H, Yao Y, Fai LY, Zhang Z. Protection of dietary polyphenols against oral cancer. *Nutrients*. 2013; 5:2173-2191.



79. Diomede L, Rigacci S, Romeo M, Stefani M, Salmona M. Oleuropein aglycone protects transgenic *C. elegans* strains expressing A β 42 by reducing plaque load and motor deficit. *PLoS One*. 2013; doi: 10.1371/journal.pone.0058893.
80. Domitrović R, Jakovac H, Marchesi VV, Šain I, Romić Ž, Rahelić D. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacol Res*. 2012; 65:451-464.
81. Dryden GW, Lam A, Beatty K, Qazzaz HH, McClain CJ. A pilot study to evaluate the safety and efficacy of an oral dose of (-)-epigallocatechin-3-gallate-rich polyphenon E in patients with mild to moderate ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19:1904-1912.
82. Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, Chamillard M, Desreumaux P. PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2006; 55:1341-1349.
83. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006; 314:1461-1463.
84. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, Kooy-Winkelaar EM, Koning F, Zwaginga JJ, Fidder HH, Verhaar AP, Fibbe WE, van den Brink GR, Hommes DW. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 2010; 59:1662-1669.
85. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001; 48:526-535.
86. Eaden JA. Review article: the data supporting a role for aminosalicylates in the chemoprevention of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 2:15-21.
87. Eaton JE, Silveira MG, Pardi DS, Sinakos E, Kowdley KV, Luketic VA, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, Harnois D, Jorgensen R, Petz J, Lindor KD. High-dose ursodeoxycholic acid is associated with the development of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106:1638-1645.



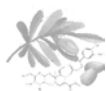
88. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis*. 2007; 44:256-262.
89. El NS, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Reviews*. 2009; 67:632–638.
90. Elamin MH, Daghestani MH, Omer SA, Elobeid MA, Virk P, Al-Olayan EM, Hassan ZK, Mohammed OB, Aboussekhra A. Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food Chem Toxicol*. 2013; 53:310-316.
91. Epstein J, Docena G, MacDonald TT, Sanderson IR. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. *Br J Nutr*. 2010; 103:824-832.
92. Escandell JM, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Gil-Benso R, Ríos JL. Dihydrocucurbitacin B inhibits delayed type hypersensitivity reactions by suppressing lymphocyte proliferation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 322:1261-1268.
93. Fares R, Bazzi S, Baydoun SE, Abdel-Massih RM. The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. *Plant Foods Hum Nutr*. 2011; 66:58-63.
94. Farkas K, Molnár T, Szepes Z. Ability of different rescue therapies to save the bowel in acute, severe, steroid-refractory ulcerative colitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 8:695-702.
95. Feagan BG, Coteur G, Tan S, Keininger DL, Schreiber S. Clinically meaningful improvement in health-related quality of life in a randomized controlled trial of certolizumab pegol maintenance therapy for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104:1976-1983.
96. Feagan BG, Macdonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; doi: 10.1002/14651858.CD000544.
97. Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, Parente L. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol*. 2003; 3:1363-1369.



98. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2002; 23:795-780.
99. Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Hogan SP. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *J Immunol*. 2004; 172:5664-5675.
100. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:13780-13785.
101. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut*. 2002; 50:485-489.
102. Frontela C, Canali R, Virgili F. Use of dietary phenols to modulate inflammatory bowel response. *Gastroenterol Hepatol*. 2010; 33:307-312.
103. Garcea G, Berry DP, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:120-125.
104. García Morales OH, Pereira Roche N, Flores Sánchez RM. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed*. 1998; 17:190-197.
105. Gariboldi P, Jommi G, and Verotta L. Secoiridoids from *Olea europea*. *Phytochem*. 1986; 25:865-869.
106. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014; 13:3-10.
107. 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*. 2011; 74:1079-1084.
108. Gonzalez M, Zarzuelo A, Gamez MJ, Utrilla MP, Jimenez J, Osuna I. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med*. 1992; 58:513-515.
109. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004; 118:285-296.



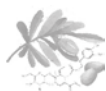
110. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol.* 2013; 35:229-244.
111. Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, Failli P, Berti A, Casamenti F, Stefani M. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PLoS One.* 2013; doi: 10.1371/journal.pone.0071702.
112. Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334:769-778.
113. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häslér R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007; 39:207-211.
114. Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology.* 2009; 59:45-53.
115. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P, ACCENT I Study Group. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet.* 2002; 359:1541-1549.
116. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, Panaccione R, Wolf D, Pollack P. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology.* 2006; 130:323-333.
117. Hauso Ø, Martinsen TC, Waldum H. 5-Aminosalicylic acid, a specific drug for ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2015; 50:933-941.
118. Hawkey C, Allez M, Ardizzone S, Clark M, Clark L, Colombel JF, Danese S, Farge-Bancel D, Labopin M, Lindsay J, Norman A, Onida F, Ricart E, Rogler G, Rovira M, Russell N, Satsangi J, Travis S, Tyndall A, Vermeire S. Clinical and endoscopic improvement following hemopoietic stem cell transplantation in the ASTIC trial. *J Crohns Colitis.* 2013; 7:S4.



119. He ZY, Shi CB, Wen H, Li FL, Wang BL, Wang J. Upregulation of p53 expression in patients with colorectal cancer by administration of curcumin. *Cancer Invest.* 2011; 29:208-213.
120. 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; 26:162-169.
121. Hindorf U, Johansson M, Eriksson A, Kvifors E, Almer SH. Mercaptopurine treatment should be considered in azathioprine intolerant patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009; 29:654-661.
122. Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I, Rotter V, Wink DA, Appella E, Harris CC. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:143-148.
123. Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J.* 2004; 18:1550-1552.
124. Holtmeier W, Zeuzem S, Preiss J, Kruis W, Böhm S, Maaser C, Raedler A, Schmidt C, Schnitker J, Schwarz J, Zeitz M, Caspary W. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of *Boswellia serrata* in maintaining remission of Crohn's disease: good safety profile but lack of efficacy. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:573-582.
125. Hommes D, 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.
126. Howells LM, Berry DP, Elliott PJ, Jacobson EW, Hoffmann E, Hegarty B, Brown K, Steward WP, Gescher AJ. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011; 4:1419-1425.
127. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001; 411:599-603.



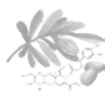
128. Humpel N, Jones SC. Gaining insight into the what, why and where of complementary and alternative medicine use by cancer patients and survivors. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2006; 15:362-368.
129. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:276-285.
130. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*. 2009; 125:171-180.
131. Hyun YS, Han DS, Lee AR, Eun CS, Youn J, Kim HY. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*. 2012; 33:931-936.
132. Ikegami T, Matsuzaki Y. Ursodeoxycholic acid: Mechanism of action and novel clinical applications. *Hepatol Res*. 2008; 38:123-131.
133. Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A, Britti D, Cuzzocrea S. The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clin Nutr*. 2011; 30:533-540.
134. Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Morittu VM, Procopio A, Britti D, Cuzzocrea S. Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011; 339:859-869.
135. Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A, Perri E, Britti D, Cuzzocrea S. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83:1413-1426.
136. Irving GR, Iwuji CO, Morgan B, Berry DP, Steward WP, Thomas A, Brown K, Howells LM. Combining curcumin (C3-complex, Sabinsa) with standard care FOLFOX chemotherapy in patients with inoperable colorectal cancer (CUFOX): study protocol for a randomised control trial. *Trials*. 2015; doi: 10.1186/s13063-015-0641-1.
137. Ishikawa TO, Oshima M, Herschman HR. Cox-2 deletion in myeloid and endothelial cells, but not in epithelial cells, exacerbates murine colitis. *Carcinogenesis*. 2011; 32:417-426.



138. Janahmadi Z, Nekooeian AA, Moaref AR, Emamghoreishi M. Oleuropein offers cardioprotection in rats with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Toxicol.* 2015; 15:61-68.
139. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997; 275:218-220.
140. Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem Biol Interact.* 2008; 176:88-98.
141. Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem.* 2009; 57:8798-8780.
142. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012; 10:639-645.
143. Jian YT, Mai GF, Wang JD, Zhang YL, Luo RC, Fang YX. Preventive and therapeutic effects of NF-kappaB inhibitor curcumin in rats colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *World J Gastroenterol.* 2005; 11:1747-1752.
144. Jiang Y, Turgeon DK, Wright BD, Sidahmed E, Ruffin MT, Brenner DE, Sen A, Zick SM. Effect of ginger root on cyclooxygenase-1 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in colonic mucosa of humans at normal and increased risk for colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2013; 22:455-460.
145. Jin H, Gong W, Zhang C, Wang S. Epigallocatechin gallate inhibits the proliferation of colorectal cancer cells by regulating Notch signaling. *Onco Targets Ther.* 2013; 6:145-153.
146. Kaiser GC, Yan F, Polk DB. Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor kappaB activation in mouse colonocytes. *Gastroenterology.* 1999; 116:602-609.
147. Kaistha A, Levine J. Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2014; 44:328-334.
148. Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafyllidis JK, Dedoussis GV, Andrikopoulos NK. Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients



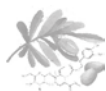
- with Crohn's disease treated with mastic. *World J Gastroenterol*, 2007; 13:6031-6036.
149. Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK, Dedoussis GV, Andrikopoulos NK. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2007; 13:748-753.
150. Kandrór V, Mayer L. Chapter 60 – Inflammatory Bowel Diseases. N. Rose & I. Mackay, 2014.
151. Khan N, Mukhtar H. Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29:435-445.
152. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, Abdallah DM, Nassar NN, Okpanyi SN, Kreuter MH. Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung*. 2002; 52:797-802.
153. Khor TO, Huang MT, Kwon KH, Chan JY, Reddy BS, Kong AN. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res*. 2006; 66:11580-11584.
154. Kim YH, Kwon HS, Kim DH, Cho HJ, Lee HS, Jun JG, Park JH, Kim JK. Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8:1695-1702.
155. Kim SY, Kang JW, Song X, Kim BK, Yoo YD, Kwon YT, Lee YJ. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cell Signal*. 2013; 25:961-969.
156. Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J Nutr*. 2009; 139:2079-2086.
157. Krebs S, Omer TN, Omer B. Wormwood (*Artemisia absinthium*) suppresses tumour necrosis factor alpha and accelerates healing in patients with Crohn's disease - A controlled clinical trial. *Phytomedicine*. 2010; 17:305-309.
158. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993; 75:263-274.
159. Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2015; 16:3350-3376.



160. Lang A, Salomon N, Wu JC, Kopylov U, Lahat A, Har-Noy O, Ching JY, Cheong PK, Avidan B, Gamus D, Kaimakliotis I, Eliakim R, Ng SC, Ben-Horin S. Curcumin in Combination With Mesalamine Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015; doi: 10.1016/j.cgh.2015.02.019.
161. Langhorst J, Wulfert H, Lauche R, Klose P, Cramer H, Dobos GJ, Korzenik J. Systematic review of complementary and alternative medicine treatments in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2015; 9:86-106.
162. Larmonier CB, Uno JK, Lee KM, Karrasch T, Laubitz D, Thurston R, Midura-Kiela MT, Ghishan FK, Sartor RB, Jobin C, Kiela PR. Limited effects of dietary curcumin on Th-1 driven colitis in IL-10 deficient mice suggest an IL-10-dependent mechanism of protection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; doi: 10.1152/ajpgi.90365.2008.
163. Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42:519-523.
164. Lee KJ, Inoue M, Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S. Coffee consumption and risk of colorectal cancer in a population-based prospective cohort of Japanese men and women. *Int J Cancer*. 2007; 121:1312-1318.
165. Leoni G, Alam A, Neumann PA, Lambeth JD, Cheng G, McCoy J, Hilgarth RS, Kundu K, Murthy N, Kusters D, Reutelingsperger C, Perretti M, Parkos CA, Neish AS, Nusrat A. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J Clin Invest*. 2013; 123:443-445.
166. Leoni G, Neumann PA, Kamaly N, Quiros M, Nishio H, Jones HR, Sumagin R, Hilgarth RS, Alam A, Fredman G, Argyris I, Rijcken E, Kusters D, Reutelingsperger C, Perretti M, Parkos CA, Farokhzad OC, Neish AS, Nusrat A. Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. *J Clin Invest*. 2015; 125:1215-1227.
167. Li W, Hua B, Saud SM, Lin H, Hou W, Matter MS, Jia L, Colburn NH, Young MR. Berberine regulates AMP-activated protein kinase signaling pathways and inhibits colon tumorigenesis in mice. *Mol Carcinog*. 2014; doi: 10.1002/mc.2217.
168. Liao NS, Ren JA, Fan CG, Wang GF, Zhao YZ, Li JS. Efficacy of polyglycosides of *Tripterygium wilfordii* in preventing postoperative recurrence of Crohn disease. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2009; 12:167-169.



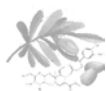
169. Liu L, Liu YL, Liu GX, Chen X, Yang K, Yang YX, Xie Q, Gan HK, Huang XL, Gan HT. Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by blocking STAT3 signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2013; 17:314-320.
170. Lopetuso LR, Petito V, Cufino V, Arena V, Stigliano E, Gerardi V, Gaetani E, Poscia A, Amato A, Cammarota G, Papa A, Sgambato A, Gasbarrini A, Scaldaferrì 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; 45:1017-1021.
171. Luccarini I, Ed Dami T, Grossi C, Rigacci S, Stefani M, Casamenti F. Oleuropein aglycone counteracts A β 42 toxicity in the rat brain. *Neurosci Lett.* 2014; 558:67-72.
172. Luccarini I, Grossi C, Rigacci S, Coppi E, Pugliese AM, Pantano D, la Marca G, Ed Dami T, Berti A, Stefani M, Casamenti F. Oleuropein aglycone protects against pyroglutamylated-3 amyloid- β toxicity: biochemical, epigenetic and functional correlates. *Neurobiol Aging.* 2015; 36:648-663.
173. Malik NSA, Bradford JM. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae.* 2006; 110:274-278.
174. Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M, Zappia V. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J Nutr Biochem.* 2004; 15:461-466.
175. Marín M, Giner RM, Ríos JL, Recio M del C. Protective effect of apocynin in a mouse model of chemically-induced colitis. *Planta Med.* 2013; 79:1392-1400.
176. Markowitz J, Grancher K, Kohn N, Lesser M, Daum F. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2000; 119:895-902.
177. Martín AR, Villegas I, Sánchez-Hidalgo M, de la Lastra CA. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol.* 2006; 147:873-885.
178. Martin DA, Bolling BW. A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases. *Food Funct.* 2015; 6:1773-1786.



179. Martínez-Montiel MP, Casis-Herce B, Gómez-Gómez GJ, Masedo-González A, Yela-San Bernardino C, Piedracoba C, Castellano-Tortajada G. Pharmacologic therapy for inflammatory bowel disease refractory to steroids. *Clin Exp Gastroenterol*. 2015; 8:257-269.
180. Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*. 2005; 54:1481-1491.
181. McSharry K, Dalzell AM, Leiper K, El-Matary W. Systematic review: the role of tacrolimus in the management of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 34:1282-1294.
182. Mehraein F, Sarbishegi M, Aslani A. Evaluation of effect of oleuropein on skin wound healing in aged male BALB/c mice. *Cell J*. 2014; 16:25-30.
183. Mehraein F, Sarbishegi M, Aslani A. Therapeutic effects of oleuropein on wounded skin in young male BALB/c mice. *Wounds*. 2014; 26:83-88.
184. Melnicoff MJ, Horan PK, Morahan PS. Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation. *Cell Immunol*. 1989; 118:178-191.
185. Mentor-Marcel RA, Bobe G, Sardo C, Wang LS, Kuo CT, Stoner G, Colburn NH. Plasma cytokines as potential response indicators to dietary freeze-dried black raspberries in colorectal cancer patients. *Nutr Cancer*. 2012; 64:820-825.
186. Mijatovic SA, Timotijevic GS, Miljkovic DM, Radovic JM, Maksimovic-Ivanic DD, Dekanski DP, Stosic-Grujicic SD. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *Int J Cancer*. 2011; 128:1955-1965.
187. Mitsuyama K, Matsumoto S, Rose-John S, Suzuki A, Hara T, Tomiyasu N, Handa K, Tsuruta O, Funabashi H, Scheller J, Toyonaga A, Sata M. STAT3 activation via interleukin 6 trans-signalling contributes to ileitis in SAMP1/Yit mice. *Gut*. 2006; 55:1263-1269.
188. Mosele JI, Martín-Peláez S, Macià A, Farràs M, Valls RM, Catalán Ú, Motilva MJ. Faecal microbial metabolism of olive oil phenolic compounds: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Mol Nutr Food Res*, 2014; 58:1809-1819.
189. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55-63.
190. 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.



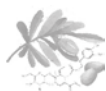
191. Mulder CJ, Fockens P, Meijer JW, van der Heide H, Wiltink EH, Tytgat GN. Beclomethasone dipropionate (3 mg) versus 5-aminosalicylic acid (2 g) versus the combination of both (3 mg/2 g) as retention enemas in active ulcerative proctitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996; 8:549-553.
192. Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*. 2006; 67:1849-1855.
193. Nagtegaal ID. Current concepts of colorectal cancer resection pathology. *Histopathology*. 2015; 66:102-111.
194. Nechuta S, Shu XO, Li HL, Yang G, Ji BT, Xiang YB, Cai H, Chow WH, Gao YT, Zheng W. Prospective cohort study of tea consumption and risk of digestive system cancers: results from the Shanghai Women's Health Study. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96:1056-1063.
195. Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, Brown D, Robinson M, Bourne T. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): *in vitro* comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13:1323-1332.
196. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; doi: 10.1101/cshperspect.a006049.
197. Nguyen AV, Martinez M, Stamos MJ, Moyer MP, Planutis K, Hope C, Holcombe RF. Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. *Cancer Manag Res*. 2009; 1:25-37.
198. Nguyen PM, Putoczki TL, Ernst M. STAT3-Activating Cytokines: A Therapeutic Opportunity for Inflammatory Bowel Disease. *J Interferon Cytokine Res*. 2015; doi: 10.1089/jir.2014.0225.
199. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007; 133:1670-1689.
200. Núñez-Sánchez MA, González-Sarrías A, Romo-Vaquero M, García-Villalba R, Selma MV, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Dietary phenolics against colorectal cancer-From promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs. *Mol Nutr Food Res*. 2015; doi: 10.1002/mnfr.201400866.



201. Nussbaum N, Altomare I. The neoadjuvant treatment of rectal cancer: a review. *Curr Oncol Rep.* 2015; 17:434-443.
202. Ogata H, Matsui T, Nakamura M, Iida M, Takazoe M, Suzuki Y, Hibi T. A randomised dose finding study of oral tacrolimus (FK506) therapy in refractory ulcerative colitis. *Gut.* 2006; 55:1255-1262.
203. Oh S, Gwak J, Park S, Yang CS. Green tea polyphenol EGCG suppresses Wnt/ β -catenin signaling by promoting GSK-3 β - and PP2A-independent β -catenin phosphorylation/degradation. *Biofactors.* 2014; 40:586-595.
204. Ohkusa, T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* 1985; 82:1327-36.
205. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990; 98:694-702.
206. Okayasu I, Ohkusa T, Kajiura K, Kanno J, Sakamoto S. Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut.* 1996; 39:87-92.
207. Oliveira LG, Cunha AL, Duarte AC, Castañón MC, Chebli JM, Aguiar JA. Positive correlation between disease activity index and matrix metalloproteinases activity in a rat model of colitis. *Arq Gastroenterol.* 2014; 51:107-112.
208. Osim EE, Mbajiorgu EF, Mukarati G, Vaz RF, Makufa B, Munjeri O, Musabayane CT. Hypotensive effect of crude extract *Olea africana* (Oleaceae) in normo and hypertensive rats. *Cent Afr J Med.* 1999; 45:269-274.
209. Pandurangan AK. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013, 14:2201-2205.
210. Pardi DS, Loftus EV Jr, Kremers WK, Keach J, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology.* 2003; 124:889-893.
211. Park S, Choi Y, Um SJ, Yoon SK, Park T. Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. *J Hepatol.* 2011; 54:984-993.
212. Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, West KP, Booth TD, Perloff M, Crowell JA, Brenner DE, Steward WP, Gescher AJ, Brown K.



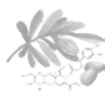
- Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 2010; 70:7392-7399.
213. Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40:1425-1430.
214. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:62-70.
215. Perrinjaquet-Moccetti T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Bradl B, Aydogan C. Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytother Res.* 2008; 22:1239-1242.
216. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol.* 2012; doi: 10.1155/2012/718617.
217. Philpott, DJ, Sorbara, MT, Robertson, SJ, Croitoru, K, Girardin, SE. NOD proteins: Regulators of inflammation in health and disease. *Nature Reviews Immunology.* 2014; 14:9-23.
218. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 1991; 325:928-937.
219. Poullis A, Foster R, Shetty A, Fagerhol MK, Mendall MA. Bowel inflammation as measured by fecal calprotectin: a link between lifestyle factors and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 2004; 13:279-284.
220. 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.
221. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2004; 15:415-436.
222. Puel C, Quintin A, Agalias A, Mathey J, Obled C, Mazur A, Davicco MJ, Lebecque P, Skaltsounis AL, Coxam V. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Br J Nutr.* 2004; 92:119-127.
223. Rahmani AH, Albutti AS, Aly SM. Therapeutics role of olive fruits/oil in the prevention of diseases via modulation of anti-oxidant, anti-tumour and genetic activity. *Int J Clin Exp Med,* 2014, 7:799-808.



224. Ramírez-Alcántara V, Montrose MH. Acute murine colitis reduces colonic 5-aminosalicylic acid metabolism by regulation of N-acetyltransferase-2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014; doi: 10.1152/ajpgi.00389.2013.
225. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J.* 2009; 11:495-510.
226. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008; 22:659-661.
227. Recio MC, Giner RM, Máñez S, Talens A, Cubells L, Gueho J, Julien HR, Hostettmann K, Rios JL. Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum monticolum* depending on single or repeated local TPA administration. *Planta Med.* 1995; 61:502-504.
228. Recio MC, Prieto M, Bonucelli M, Orsi C, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta Med.* 2004; 70:414-420.
229. Recio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Curr Med Chem.* 2012; 19:2088-2103.
230. Reinisch W, Sandborn WJ, Hommes DW, D'Haens G, Hanauer S, Schreiber S, Panaccione R, Fedorak RN, Tighe MB, Huang B, Kampman W, Lazar A, Thakkar R. Adalimumab for induction of clinical remission in moderately to severely active ulcerative colitis: results of a randomised controlled trial. *Gut.* 2011; 60:780-787.
231. Fedorak RN, Empey LR, MacArthur C, Jewell LD. Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology.* 1990; 98:615-625.
232. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JJ, Duerr RH, Cho JH. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.* 2007; 39:596-604.
233. Rizzo A, Pallone F, Monteleone G, Fantini MC. Intestinal inflammation and colorectal cancer: a double-edged sword? *World J Gastroenterol.* 2011; 17:3092-3100.



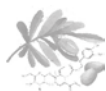
234. Rodrigues HG, Vinolo MA, Magdalon J, Vitzel K, Nachbar RT, Pessoa AF, dos Santos MF, Hatanaka E, Calder PC, Curi R. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. *J Invest Dermatol.* 2012; 132:208-215.
235. Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev.* 2009; 67:363-378.
236. Rose WA 2nd, Sakamoto K, Leifer CA. Multifunctional role of dextran sulfate sodium for in vivo modeling of intestinal diseases. *BMC Immunol,* 2012; 13:41-54
237. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2009; 58:1629-1636.
238. Ruiz-Meana M, García-Dorado D. Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol.* 2009; 62:199-209.
239. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005; 353:2462-2476.
240. Rutgeerts P, Van Assche G, Sandborn WJ, Wolf DC, Geboes K, Colombel JF, Reinisch W; EXTEND Investigators, Kumar A, Lazar A, Camez A, Lomax KG, Pollack PF, D'Haens G. Adalimumab induces and maintains mucosal healing in patients with Crohn's disease: data from the EXTEND trial. *Gastroenterology.* 2012; 142:1102-1111.
241. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Kamm MA, Williams CB, Price AB, Talbot IC, Forbes A. Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2006; 130:1030-1038.
242. Ryan D, Robards K, Lavee S. Changes in phenolic content of olive during maturation. *Internat J Food Science and Technol.* 1999; 34:265-274.
243. Ryu SJ, Choi HS, Yoon KY, Lee OH, Kim KJ, Lee BY. Oleuropein suppresses LPS-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cell and zebrafish. *J Agric Food Chem.* 2015; 63:2098-2105.



244. 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; 54:365-371.
245. Sales-Campos H, Basso PJ, Alves VB, Fonseca MT, Bonfá G, Nardini V, Cardoso CR. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2015; 48:96-107.
246. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17:362-381.
247. Samsami-Kor M, Daryani NE, Asl PR, Hekmatdoost A. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study. *Arch Med Res*. 2015; doi: 10.1016/j.arcmed.2015.05.005.
248. Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Cárdeno A, Talero E, Sánchez-Hidalgo M, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Clin Nutr*. 2010; 29:663-673.
249. Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, de la Lastra CA. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *J Nutr Biochem*. 2013; 24:1401-1413.
250. Sánchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14:4280-4288.
251. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel JF, Panaccione R, D'Haens G, Li J, Rosenfeld MR, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007; 146:829-838.
252. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh DG, Panaccione R, Wolf D, Kent JD, Bittle B, Li J, Pollack PF. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut*. 2007; 56:1232-1239.
253. Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, Colombel JF, D'Haens G, Wolf DC, Kron M, Tighe MB, Lazar A, Thakkar RB. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2012; 142:257-265.



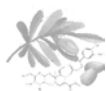
254. Sandborn WJ, Feagan BG, Marano C, Zhang H, Strauss R, Johans J, Adedokun OJ, Guzzo C, Colombel JF, Reinisch W, Gibson PR, Collins J, Järnerot G, Hibi T, Rutgeerts P, y PURSUIT-SC Study Group. Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2014; 146:85-95.
255. Sandborn WJ, Bosworth B, Zakko S, Gordon GL, Clemmons DR, Golden PL, Rolleri RL, Yu J, Barrett AC, Bortey E, Paterson C, Forbes WP. Budesonide foam induces remission in patients with mild to moderate ulcerative proctitis and ulcerative proctosigmoiditis. *Gastroenterology*. 2015; 148:740-750.
256. Sands BE, Blank MA, Patel K, van Deventer SJ, ACCENT II Study. Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to infliximab in the ACCENT II Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004; 2:912-920.
257. Santana A, Medina C, Paz-Cabrera MC, Díaz-Gonzalez F, Farré E, Salas A, Radomski MW, Quintero E. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:6464-6472.
258. Santos MM, Piccirillo C, Castro PM, Kalogerakis N, Pintado ME. Bioconversion of oleuropein to hydroxytyrosol by lactic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28:2435-2440.
259. Sarbishegi M, Mehraein F, Soleimani M. Antioxidant role of oleuropein on midbrain and dopaminergic neurons of substantia nigra in aged rats. *Iran Biomed J*. 2014; 18:16-22.
260. Sarlos P, Kovesdi E, Magyar L, Banfai Z, Szabo A, Javorhazy A, Meleg B. Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014; 5:304-321.
261. Servili M, Esposto S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*. 2009; 17:76-84.
262. Shapiro H, Singer P, Halpern Z, Bruck R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut*. 2007; 56:426-435.
263. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ, Steward WP. Pharmacodynamic and



- pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:1894-1900.
264. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM, Pirmohamed M, Gescher AJ, Steward WP. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:6847-6854.
265. 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.* 2002; 2:8-15
266. Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci.* 2004; 27:489-495.
267. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin,* 2014; 64:104-117.
268. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:13249-13254.
269. Siloși I, Boldeanu MV, Mogoantă SȘ, Ghiluși M, Cojocaru M, Biciușcă V, Cojocaru IM, Avrănescu CS, Gheonea DI, Siloși CA, Turculeanu A. Matrix metalloproteinases (MMP-3 and MMP-9) implication in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55:1317-1324.
270. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV Jr, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005; 19 Suppl A:5A-36A.
271. Singh K, Chaturvedi R, Barry DP, Coburn LA, Asim M, Lewis ND, Piazuelo MB, Washington MK, Vitek MP, Wilson KT. The apolipoprotein E-mimetic peptide COG112 inhibits NF-kappaB signaling, proinflammatory cytokine expression, and disease activity in murine models of colitis. *J Biol Chem.* 2011; 286:3839-3850.
272. Singh R, Akhtar N, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. *Life Sci.* 2010; 86:907-918.



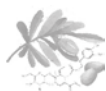
273. Singh UP, Singh NP, Busbee B, Guan H, Singh B, Price RL, Taub DD, Mishra MK, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Alternative medicines as emerging therapies for inflammatory bowel diseases. *Int Rev Immunol*. 2012; 31:66-84.
274. Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Andò S, Maggiolini M, Pezzi V. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54:833-840.
275. Sklyarov AY, Panasyuk NB, Fomenko IS. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol*. 2011; 62:65-73.
276. Söderlund S, Brandt L, Lapidus A, Karlén P, Broström O, Löfberg R, Ekblom A, Askling J. Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2009; 136:1561-1567.
277. Soetikno RM, Lin OS, Heidenreich PA, Young HS, Blackstone MO. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc*. 2002; 6:48-54.
278. Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, Kirk S, Gardiner K. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comp Clin Pathol*. 2010; 19:235-239.
279. Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J Ethnopharmacol*. 2003; 84:299-305.
280. Steinbach EC, Plevy SE. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2014; 20:166-167.
281. Stingl JC, Ettrich T, Muche R, Wiedom M, Brockmöller J, Seeringer A, Seufferlein T. Protocol for minimizing the risk of metachronous adenomas of the colorectum with green tea extract (MIRACLE): a randomised controlled trial of green tea extract versus placebo for nutripvention of metachronous colon adenomas in the elderly population. *BMC Cancer*. 2011; doi: 10.1186/1471-2407-11-360.
282. Stintzing S. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Rep*, 2014; doi: 10.12703/P6-108



283. Sumiyoshi M, Kimura Y. Effects of olive leaf extract and its main component oleuropein on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice. *Phytother Res.* 2010; 24:995-1003.
284. Sun CL, Yuan JM, Koh WP, Lee HP, Yu MC. Green tea and black tea consumption in relation to colorectal cancer risk: the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis.* 2007; 28:2143-2148.
285. 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. 193:471-481.
286. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* 1983; 132:345-352.
287. Suzuki E, Yorifuji T, Takao S, Komatsu H, Sugiyama M, Ohta T, Ishikawa-Takata K, Doi H. Green tea consumption and mortality among Japanese elderly people: the prospective Shizuoka elderly cohort. *Ann Epidemiol.* 2009; 19:732-739.
288. Swaminath A, Taunk R, Lawlor G. Use of methotrexate in inflammatory bowel disease in 2014: A User's Guide. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2014; 5:113-121.
289. Takahashi M, Fukuda K, Sugimura T, Wakabayashi K. Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Res.* 1998; 58:42-46.
290. 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.
291. Tang A, Li N, Li X, Yang H, Wang W, Zhang L, Li G, Xiong W, Ma J, Shen S. Dynamic activation of the key pathways: linking colitis to colorectal cancer in a mouse model. *Carcinogenesis.* 2012; 33:1375-1383.
292. Tang J, Chen X, Tu W, Guo Y, Zhao Z, Xue Q, Lin C, Xiao J, Sun X, Tao T, Gu M, Liu Y. Propofol inhibits the activation of p38 through up-regulating the expression of annexin A1 to exert its anti-inflammation effect. *PLoS One.* 2011; doi: 10.1371/journal.pone.0027890



293. Tao QS, Ren JA, Ji ZL, Li JS, Wang XB, Jiang XH. Maintenance effect of polyglycosides of *Tripterygium wilfordii* on remission in postoperative Crohn disease. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2009; 12:491-493.
294. Triantafyllidi A, Xanthos T, Papalois A, Triantafyllidis JK. Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2015; 28:210-220.
295. Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38:1654-1661.
296. Tunca B, Tezcan G, Cecener G, Egeli U, Ak S, Malyer H, Tumen G, Bilir A. *Olea europaea* leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012; 138:1831-1844.
297. Vecchi Brumatti L, Marcuzzi A, Tricarico PM, Zanin V, Girardelli M, Bianco AM. Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. *Molecules*. 2014; 19:21127-21153.
298. Visioli F, Galli C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci*. 1994; 55:1965-1971.
299. Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*. 1995; 117:25-32.
300. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 247:60-64.
301. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 247:60-64.
302. Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 278:797-799.
303. Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr*. 2002; 132:409-417.
304. Wang L, Geng C, Jiang L, Gong D, Liu D, Yoshimura H, Zhong L. The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis. *Eur J Nutr*. 2008; 47:235-243.

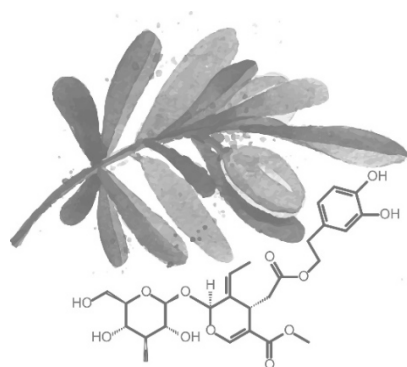


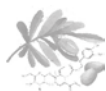
305. Wang LS, Arnold M, Huang YW, Sardo C, Seguin C, Martin E, Huang TH, Riedl K, Schwartz S, Frankel W, Pearl D, Xu Y, Winston J 3rd, Yang GY, Stoner G. Modulation of genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer in humans by black raspberries: a phase I pilot study. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:598-610.
306. Wang LS, Burke CA, Hasson H, Kuo CT, Molmenti CL, Seguin C, Liu P, Huang TH, Frankel WL, Stoner GD. A phase Ib study of the effects of black raspberries on rectal polyps in patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2014; 7:666-674.
307. Wang YF, Ou-Yang Q, Xia B, Liu LN, Gu F, Zhou KF, Mei Q, Shi RH, Ran ZH, Wang XD, Hu PJ, Wu KC, Liu XG, Miao YL, Han Y, Wu XP, He GB, Zhong J, Liu GJ. Multicenter case-control study of the risk factors for ulcerative colitis in China. *World J Gastroenterol.* 2013; 19:1827-1833.
308. Watson AJ. An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; 57:107-121.
309. Westbrook AM, Wei B, Braun J, Schiestl RH. Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer Res.* 2009; 69:4827-4834.
310. Wilkins T, Jarvis K, Patel J. Diagnosis and management of Crohn's disease. *Am Fam Physician.* 2011; 84:1365-1375.
311. Williams C, Shattuck-Brandt RL, DuBois RN. The role of COX-2 in intestinal cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 889:72-83.
312. Wine E, Mack DR, Hyams J, Otley AR, Markowitz J, Crandall WV, Leleiko N, Muise AM, Griffiths AM, Turner D. Interleukin-6 is associated with steroid resistance and reflects disease activity in severe pediatric ulcerative colitis. *J Crohns Colitis.* 2013; 7:916-922.
313. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007; 448:427-434.
314. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2001; 107:135-142.
315. Yang YC, Lii CK, Lin AH, Yeh YW, Yao HT, Li CC, Liu KL, Chen HW. Induction of glutathione synthesis and heme oxygenase 1 by the flavonoids butein and phloretin is mediated through the ERK/Nrf2 pathway and protects against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51:2073-2081.



316. Yang YH, Toh ML, Clyne CD, Leech M, Aeberli D, Xue J, Dacumos A, Sharma L, Morand EF. Annexin 1 negatively regulates IL-6 expression via effects on p38 MAPK and MAPK phosphatase-1. *J Immunol.* 2006; 177:8148-8153.
317. Yao J, Wu J, Yang X, Yang J, Zhang Y, Du L. Oleuropein induced apoptosis in HeLa cells via a mitochondrial apoptotic cascade associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase. *J Pharmacol Sci.* 2014; 125:300-311.
318. Yao J, Zhao L, Zhao Q, Zhao Y, Sun Y, Zhang Y, Miao H, You QD, Hu R, Guo QL. NF- κ B and Nrf2 signaling pathways contribute to wogonin-mediated inhibition of inflammation-associated colorectal carcinogenesis. *Cell Death Dis.* 2014; doi: 10.1038/cddis.2014.221.
319. Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:16389-16397.
320. Zamuner SR, Warriar N, Buret AG, MacNaughton WK, Wallace JL. Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. *Gut.* 2003; 52:1714-1720.
321. Zhao G, Yin Z, Dong J. Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *J Ethnopharmacol.* 2009; 125:265-268.

Anexos





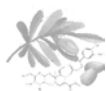
ANEXO I: MATERIAL DE LABORATORIO

Agitador magnético	IKA RCT Basic
Agitador orbital	Gyro-Rocker STR 9
Balanza de precisión	Sartorius
Baño termostatado con agitación	Julabo
Baño ultrasonidos	Bransonic
Cámara de contaje	Neubauer improved, Marenfield ZM Coulter Counter®
Campana de flujo laminar (SCSIE)	Telsar Bio-II-A V6.03
Centrífugas	Eppendorf 5810 R Mikro 200, Hettich
Citómetro de flujo	BD FACS
Espectrofotómetro	Victor™ X3 2030 Multiplate Reader Perkin-Elmer
Estufa termostatada	Selecta
Fuente de alimentación para electroforesis	APS-301, Amersham Biosciences
Homogeneizador	Politrón, Kinematica
Incubador (SCSIE)	Hepa Class 00, Thermo Electron Corp
Material fungible de cultivos celulares	Nunc, Sarstedt, BD Discardit® II
Material quirúrgico	Fine Science Tools
Mezclador de vórtice	IKA Vortex Genius 3
Microscópios (SCSIE)	Nikon Eclipse TE2000-S Nikon Eclipse E800
pH-metro	Crison micro pH-2001
Pipetas automáticas de diferente volumen	Eppendorf Research Labnet, BioPette Multicanal BioPette Repetidora Bibby Step, Bibby Sterilin Ltd
Sistema de electroforesis vertical y transferencia húmeda	Mini PROTEAN® Tetra cell, Bio Rad
Termociclador	Mastercycler Personal, Eppendorf
Termomezclador	Thermomixer confort, Eppendorf
Transiluminador	LAS-3000 mini
Tubos de polipropileno 0,5, 1,5, 15 y 50 mL	Sarstedt



ANEXO II: REACTIVOS

SIGMA ALDRICH	
13-acetato de 12- O-tetradecanoilforbol (TPA)	Dimetilsulfóxido
4-nitrofenol-acetil-β-D-glucosamina (NAG)	Ditiotreitol (DTT)
Acetona	Dodecilsulfato sódico (SDS)
Ácido 4-(2-hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico (HEPES)	Fluoruro de fenilmetilsufonilo (PMSF)
ácido 5-aminosalicílico (ASA)	Hidroxitirosol
Ácido acético	Ionomicina
Ácido bórico	Leupeptina
Ácido clorhídrico	Lipopolisacárido de E.coli (LPS)
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Metanol
Ácido sulfúrico	Nonidet NP-40
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	O-fenilendiamina (OPD)
Agar	Oleuropeina
Agarosa	Otras sales inorgánicas
Albúmina sérica bovina	Pepstatina
Anticuerpo secundario anti-cabra	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)
Anticuerpo secundario anti-conejo	p-fomaldehido
Anticuerpo secundario anti-ratón	Reactivo de Bradford
Aprotinina	Reactivo de Griess
Azoximetano (AOM)	RedTaq® Ready Mix™ PCR Reaction Mix
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	SB 203580
Bromuro de Etidio	Tetrametilbencidina (TMB)
Dexametasona	Tioglicolato
Dextrano sulfato sódico	Tween® 20
Dimetilformamida (DMF)	Tritón X-100



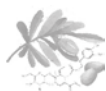
INVITROGEN/GIBCO	
Cebadores (excepto β-actina)	Tampón fosfato salino (PBS) estéril
Medio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM)	Penicilina/Estreptomicina
Tripsina	Anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 de cabra anti- IgG de conejo
Medio Roswell Park Memorial Institute	
OTROS	
Reactivos	Casa comercial
Anticuerpo anti-CD4-	eBioscience
Anticuerpo anti-IFN-γ	Biolegend
Anticuerpo anti-IL-17A	Biolegend
Anticuerpo anti-RORγt	eBioscience
Cebador aleatorio Roth Hexanucleotide Random-Primer Mix	Carl Roth GmbH
Cebador Oligo(dT)15	Promega
Cebador β-actina (ratón)	R&D Systems
Cóctel de inhibidores de proteasas	Roche
Colagenasa D	Roche
Dextrano sulfato sódico (DSS) (36-50 kDa)	MP Biomedical
Dispasa II	Roche
DNAasa	Roche
Etanol	Scharlau
Hidróxido de amonio (NH$_4$OH)	Scharlau
Kit de Avidina-biotina	Vector Laboratories inc.
Kit de ELISA per a la determinación de IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-4, IL-2, IL-17, TNF-α de ratón	eBioscience
Kit de extracción de proteína citoplasmática y nuclear ProteoJectTM	Fermentas
Kit de permeabilización celular	BD bioscience
Kit de transcripción reversa AffinityScript MultiTemp	Agilent
Kit RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Leche en polvo desnatada	Central Lechera Asturiana
Membrana de PVDF HybondTM-P	GE Healthcare



Mezcla de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP)	PeqLab
Patrón de proteína de peso molecular	Bio-Rad
Percoll	GE healthcare
Reactivo de quimioluminiscencia	Merck Millipore
Tampón de carga desnaturizante reductor	Thermo Scientific
Vectashield	Vector Laboratories Inc.

ANTICUERPOS

Anticuerpo 1º	Laboratorio	Bloqueo	Dilución	Anticuerpo 2º
Anti-COX-2	Millipore	Leche 5%	1:4000	Anti-IgG conejo
Anti-iNOS	Millipore	BSA 3%	1:1000	Anti-IgG conejo
Anti-MMP-9	Sigma Aldrich	Leche 5%	1:10000	Anti-IgG cabra
Anti-NF-κB p65	Millipore	Leche 5%	1:1000	Anti-IgG conejo
Anti-p38 MAPK	Millipore	Leche 5%	1:1000	Anti-IgG conejo
Anti-p-p38 MAPK	Cell Signaling	BSA 3%	1:1000	Anti-IgG conejo
Anti-β-actina	Sigma Aldrich	Leche 5%	1:10000	Anti-IgG conejo
Anti-STAT3	Santa Cruz	Leche 5%	1:500	Anti-IgG ratón
Anti-p-STAT3	Cell Signaling	BSA 3%	1:2000	Anti-IgG conejo
Anti-Akt	Cell Signaling	Leche 5%	1:1000	Anti-IgG conejo
Anti-p-Akt	Cell Signaling	BSA 3%	1:1000	Anti-IgG conejo
Anti-β-catenina	Millipore	Leche 5%	1:20000	Anti-IgG conejo
Anti-Bax	Santa Cruz	Leche 5%	1:500	Anti-IgG cabra
Anti-Bcl-2	Santa Cruz	Leche 5%	1:500	Anti-IgG cabra
Anti-Nrf-2	Santa Cruz	Leche 5%	1:500	Anti-IgG conejo



ANEXO III: COMPOSICIÓN DE TAMPONES

III.1. Preparación de tampón Laemmli

Tampón Laemmli	1.0 M Tris pH 6.8	2,0 mL
	SDS al 20%	3,2 mL
	β -mercaptoetanol	1,6 mL
	Glicerol	3,2 mL
	Azul de bromofenol	1,0 mg
	Agua (c.s.p.)	16 mL

III.2. Preparación de los tampones de lisis de intestinos para western blot

Tampón de Lisis A	HEPES pH 7,8	10 mM
	KCl	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Ditiotreitol	0,5 mM
	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	0,5 mM
	Aprotinina	1 μ g/mL
	Leupeptina	1 μ g/mL
	Pepstatina A	1 μ g/mL
	Inhibidor polivalente de proteasas	1 comp/10 mL
	NaF	25 mM
	Na ₂ VO ₄	2 mM
Tampón de Lisis B	HEPES pH 7,8	20 mM
	NaCl	400 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	EDTA pH 8	0,2 mM
	Glicerol	25%
	Ditiotreitol	0,5 mM
	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	0,5 mM
	Aprotinina	1 μ g/mL
	Leupeptina	1 μ g/mL
	Pepstatina A	1 μ g/mL
	Inhibidor polivalente de proteasas	1 comp/10 mL
	NaF	25 mM
	Na ₂ VO ₄	2 mM



III.3. Preparación de los geles para western blot

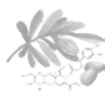
Stacking gel (5% acrilamida)	Solución acrilamida/bis-acrilamida 30% v/w	330 µL
	1 M Tris HCl pH 6,8	250 µL
	SDS 10%	20 µL
	Persulfato amónico al 10%	20 µL
	TEMED	2 µL
	Agua (c.s.p.)	2 mL

Running gel	10% acrilamida	8% acrilamida
Solución acrilamida/bis-acrilamida 30% v/w	3,3 mL	2,7 mL
1 M Tris Base pH 8,3	2,5 mL	2,5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
Persulfato amónico al 10%	100 µL	100 µL
TEMED	4 µL	4 µL
Agua (c.s.p.)	10 mL	10 mL

III.4. Preparación de tampones para electroforesis y transferencia de western blot

Tampón de electroforesis 10x	Tris Base	30,3 g
	Glicina	144,0 g
	SDS	10,0 g
	Agua (c.s.p.)	1 L

Tampón de transferencia 10x	Tris Base	30,3 g
	Glicina	144,0 g
	Agua (c.s.p.)	1 L
	Añadir 20% de metanol para preparar tampón de transferencia al 1x	

**III.5. Preparación de tampones para PCR**

tampón TAE	Tris Base	242 g
	Ácido acético glacial	57,1 mL
	EDTA 500 mM pH 8	100 mL
	Agua (c.s.p.)	1 L
Gel de agarosa 1%	Agarosa	1 g
	Tampón TAE	100 mL

III.6. Preparación de tioglicolato al 3%

Tioglicolato 3%	Tioglicolato	30g
	Agua destilada (c.s.p.)	1000 mL
	<i>Llevar a hervir la solución para disolver el medio</i>	
	<i>Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min</i>	
<i>Almacenar 3 meses</i>		



ANEXO IV: AUTORIZACIONES PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

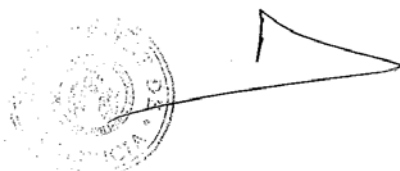
VNIVERSITAT
D VALÈNCIA
Vicerectorat d'Investigació i Política Científica

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

CERTIFICA:

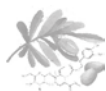
Que, reunido el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal el día 9 de febrero de 2009, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal, presentado en el proyecto titulado "Fenoles de origen natural en el tratamiento y prevención de la 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·lèfon: (96) 386 41 09
Fax: (96) 386 42 24
e-mail: vicerec.investigacio@uv.es



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

VICERRECTOR D'INVESTIGACIÓ I TÈCNIQUES AVANÇADES

D. Enrique Font Bisier, Profesor Titular de Zoología y Secretario del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

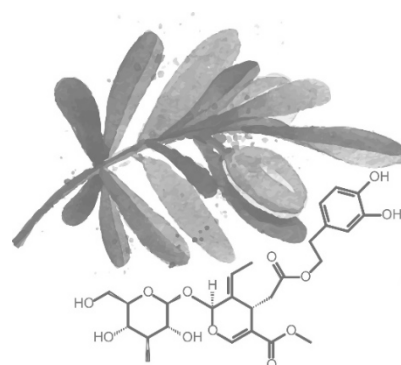
Que, reunido el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética de la Universitat de València el día 13 de febrero de 2012, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal A1328853373111 titulado "Antiinflamatorios de origen natural en la prevención de cáncer colorectal asociado a colitis ulcerosa. Búsqueda de Nuevos compuestos por cribado virtual y estudio farmacológico", cuya investigadora principal es Dña. M^a Carmen Recio Iglesias.

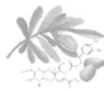
En Valencia, a 5 de marzo de 2012.



Enrique Font

Summary





Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are considered to be the principal inflammatory disorders included under the general category of inflammatory bowel disease (IBD). Although its exact aetiology is unknown, genetic and environmental factors, an abnormal immune response, and the contribution of intestinal microflora seem to be essential for the development of IBD. Management of the disease involves pharmacological therapies (anti-inflammatory drugs, antibiotics and so called biological agents) or even surgery in critical patients. Several epidemiological studies have indicated that UC and CD are important risk factors for the development of colorectal cancer (CRC), one of the most common malignant tumors (Siegel *et al.*, 2014). The latest hypothesis is that long-term, chronic colitis creates a favourable environment for CRC initiation and promotion along with tumor growth and progression, while simultaneously influencing metastatic processes. Around 25-40% of patients with UC who have not undergone a prophylactic colectomy will develop CRC after 40 years of disease (Grivennikov, 2013). Because the symptoms of the disease greatly diminish the quality of life for IBD patients, prevention and treatment of IBD and CRC is of crucial importance. Unfortunately, the diverse treatments that have shown to ameliorate the symptoms of the disease to date are associated with many negative side effects; moreover, not all patients are responsive to therapy (Rose WA 2nd *et al.*, 2012). These problems underscore the urgent need for new treatment strategies for the various features of IBD in order to improve the quality of life of these patients avoiding acute relapses, reducing chronic intestinal inflammation and prevent against complications such as the development of CRC.

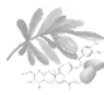


In this context, the use of complementary and alternative medicine has resurfaced in the last years and it has been addressed to patients with chronic diseases. The principal objective is reduce the diseases-related symptoms or the adverse effects generated by the conventional treatments. These therapies include the traditional medicine, based in the use of medicinal plants and their products. Although its use is viewed with scepticism by the western medical community, medicinal plant extracts are an important source of potential therapeutic agents for the pharmaceutical industry (Recio *et al.*, 2012).

Our research group has extensive experience in evaluating the anti-inflammatory activity of plants compounds, not only for extracts, but also for pure products (Recio *et al.*, 1995; Cuéllar *et al.*, 2001; Sala *et al.*, 2002; Recio *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005; Escandell *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 2008; Andújar *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2011), and at present, we are focused in the study of phenolic compounds as a protective agents against IBD (Andújar *et al.*, 2011; Andújar *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 2013).

Oleuropein is a phenolic secoiridoid present in olive leaves and in immature olive fruits of olive tree (*Olea europaea* L., Oleaceae). This compound reaches large intestine where undergo rapid degradation by the colonic microflora, yielding hydroxytyrosol as the major end product (Corona *et al.*, 2006). Oleuropein is a powerful antioxidant (Visioli *et al.*, 1998), since it possesses an *o*-dihydroxyl substitution pattern, which confers a high antioxidant activity partly due to its hydrogen-donation capacity.

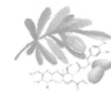
Administration of oleuropein has also been demonstrated to have anti-inflammatory effects. Several studies have shown that an olive oil



polyphenol-enriched diet, which includes oleuropein, protects against DSS-induced chronic colitis in mice (Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2013). Furthermore, *in vitro*, it interferes with the induction of the NF- κ B signalling pathway in intestinal cells by reducing the translocation of p65 to the nucleus and binding to DNA, with subsequent inhibition of the expression of adhesion molecules and enzymes such as MMP-9. Oleuropein also ameliorates inflammation in ovariectomized rats (Puel *et al.*, 2004), and reduces IL-1 β and TNF- α levels in carragenin-induced pleuritis (Impellizzeri *et al.*, 2011).

It has also been observed anti-proliferative and anti-tumor properties of oleuropein by the induction of apoptosis in different cancer cell lines. This compound has been shown to limit the growth of and induces apoptosis in HT-29 cells through activation of the p53 pathway, adapting the HIF- α response to hypoxia (Cárdeno *et al.*, 2013). Oleuropein also down-regulates phosphorylation of Akt in prostatic cell line (Acquaviva *et al.*, 2012), and increases the expression of both caspase 3 and Bax while reducing Bcl-2 and survivin, a potent anti-apoptotic protein, in estrogen-resistant breast cancer cells (MDA-MB-231) (Elamin *et al.*, 2013).

Of the different animal models of experimental colitis that have been developed to study the molecular and cellular mechanisms of inflammation and immunological disease, one of the most commonly used is that of DSS-induced colitis model in rodents. This model induces a colonic inflammation with close clinical and histological similarity to human UC and is frequently used to evaluate the effect of novel anti-inflammatory drugs. Depending on the doses of DSS and the duration of experiment, the inflammatory process can be acute or chronic, progressing to CRC. Oral administration of DSS at 3-5% during 5-7 days in drinking water induces an acute colon inflammation



accompanied by diarrhea, rectal bleeding, body weight loss and shortening of the colorectum (Solomon *et al.*, 2010). In contrast, repeated cycles of 1-2% DSS induce a chronic inflammation in the intestine, producing histological changes (including crypt loss) and perpetuating inflammation. Each cycle includes a phase in which animals are administered DSS, which causes acute IBD injury with crypt loss and ulceration, followed by a recovery phase in which animals are given drinking water alone. During this phase, mucosal regeneration acts to repair the intestinal damage. However, after several exposures to DSS, the intestinal repair mechanisms are destabilized and the mucosa begins to show irregular epithelial structure. This compromises the correct functioning of intestinal mucosa and allows the entry of harmful substances, thus enhancing the immunological response and aggravating the situation. This chronic exposure to DSS sporadically can lead to CRC, but the cancer incidence is rather low, only 15-20% of mice develop CRC (Clapper *et al.*, 2007). Because of that, administration of AOM, a carcinogen agent with specific intestine tropism, followed by repeated cycles of DSS exposure leads to CRC with an incidence of 100% in mice, taking this a model well-suited for testing chemopreventive agents against CRC-associated colitis (Grivennikov, 2013).

Thus, the main objective of the present Doctoral Thesis was to demonstrate the potential protective effect of oleuropein against IBD, especially on CU. Thus, we carried out the following experiments:

- Study of the *in vivo* anti-inflammatory effect of oleuropein in an acute DSS-induced colitis model.



- Set up of an experimental protocol of lymphocytes T isolation from *lamina propria* and study of the modulatory effect of oleuropein on Th17 response.
- Study of the *in vivo* anti-inflammatory effect of oleuropein in a chronic DSS-induced colitis model.
- Set up of an AOM/DSS-induced CRC and test the chemopreventive activity of oleuropein.
- Evaluation of the effect of oleuropein and hydroxytyrosol on macrophage primary cultures and intestinal epithelial cells.

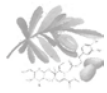
In the model of acute colitis, Balb/c mice given 5% DSS in drinking water for 7 days developed symptoms of colitis. Animals treated with a standard diet supplemented with 1% oleuropein (consumed daily 2.4 g/kg) exhibited a significant reduction of the severity of the colitis as assessed by colon shortening, mg/cm ratio (Table 10 and Figure 19) and disease activity index (DAI) score (Table 11 and Figure 20). Colons were explanted in RPMI medium, and the levels of NO and TNF- α were determined in colon culture supernatants 24 h later. Both markers were significantly reduced in those mice fed with oleuropein, compared to colitic mice (Table 12 and Figure 21). The intestinal damage was evaluated by a histological analysis of colon tissue sections stained with hematoxylin and eosin. Oleuropein-fed mice showed greatly reduced numbers of infiltrating cells, degree of mucosal injury and edema, in comparison with mice exposed to DSS (Figure 22). Consistent with these histological findings, the increase in colonic myeloperoxidase (MPO) activity in colitic mice, was significantly reduced by the administration of oleuropein (Table 13 and Figure 23).



Pro-inflammatory mediators like cytokines play a pivotal role in the pathogenesis of IBD, by the recruitment and activation of the different immune cells. The increment of IL-6, IL-1 β and TNF- α concentration detected in colon tissue of DSS group, was reduced by the treatment of oleuropein. It was not observed any difference in IL-2 and IL-4 levels between the different groups, while an increase in IL-10 concentration, a purported anti-inflammatory cytokine, was observed in colon tissue from mice treated with oleuropein (Table 14 and Figure 24). Moreover, oleuropein reduced the inflammatory markers COX-2, iNOS and MMP-9 expression in colon tissue (Figure 25).

In order to determine a possible molecular mechanism of oleuropein, the presence of nuclear p65 NF- κ B subunit, cytosolic p38 MAPK and STAT 3 phosphorylation was assessed by western blot analysis. Oleuropein reversed the increase of nuclear p65 NF- κ B subunit, and inhibited the phosphorylation of p38 and STAT3 observed in colon tissue of colitic mice (Figure 26, Figure 27 and Figure 28, respectively). Oleuropein also induced an increase of gene expression of annexin A1, an endogenous anti-inflammatory molecule (Figure 29).

These results clearly demonstrated that oleuropein protects against DSS-induced acute colitis. The low cell infiltration on colon tissue by treatment with oleuropein could ameliorate histological damage, and the inhibition of the involved pathways could be the key of the anti-inflammatory activity of oleuropein, as we could observe in the reduction of cytokine release and COX-2, iNOS and MMP-9 expression. Furthermore, the inhibition of p38 MAPK might be related by the increase of the



expression of annexin A1 (Yang *et al.*, 2006), being a possible target of this compound.

We also investigated the effect of oleuropein on Th17 response in an acute DSS-induced colitis model. In this experiment, exposure of the animals to 3% DSS during 7 days provoked an acute colitis in C57BL/6 mice. Oleuropein treatment was given daily in drinking water at 100 mg/kg. FACS analysis of cells taken from the colonic *lamina propria* revealed that treatment with oleuropein significantly reduced the percentage of CD4⁺ RORγt⁺ cells and CD4⁺ RORγt⁺IL-17⁺IFN-γ⁺ cells, compared to the colitic mice (Table 17 and Figure 32). A marked reduction of IL-17A and IFN-γ levels were also observed in colon tissue from oleuropein-fed mice (Table 18 and Figure 34).

These results demonstrate for the first time that oleuropein could exert a modulatory effect on immune system, acting directly on the recruitment and activation of the Th17 response in *lamina propria* of colitic mice.

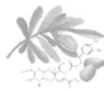
The anti-inflammatory effect of oleuropein was also tested in a chronic DSS-induced colitis in mice. C57BL/6 mice were exposed to four repeated cycles of DSS in drinking water followed by 7-day rest period. Animals receiving a standard diet supplemented with 0.25% of oleuropein for 56 days exhibited a decrease of inflammatory symptoms as reflected by improvement of DAI score (Table 19 and Figure 35) and the weight/length ratio, an important indicator of colon inflammation. Histological analyses of the samples from the DSS-treated mice showed typical inflammatory changes in colonic architecture, including mucosal ulceration, crypt damage, edema, and cell infiltration into mucosal tissue. Colon tissue



sections from mice fed with oleuropein exhibited far fewer infiltrating cells, a significantly lower degree of mucosal injury, and less edema (Figure 36). In our study, the increases in MPO, NAG, and EPO activity observed in the colonic tissue of DSS-treated mice (Bento *et al.*, 2012) were reduced by the administration of oleuropein, confirming the inhibitory effect of this compound on inflammatory cell infiltration (Table 20 and Figure 37). Moreover, oleuropein treatment significantly inhibited the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β production, both involved in the initiation and amplification of the immune system. Whereas augmented IL-10 levels, as it did in the acute model (Table 21 and Figure 38). In concordance with this study, Western blot analyses also revealed that oleuropein significantly down-regulated COX-2 and iNOS expression (Figure 39).

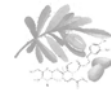
It was observed that this compound reduced cytosolic phosphorylation of p38 MAPK in colon tissue, and increased the expression of Nrf-2, a protective nuclear factor involved in endogenous antioxidant processes (Figure 40). However, oleuropein had not significant effect on nuclear translocation of p65 NF- κ B subunit and β -catenin (Figure 41). As it was demonstrated in acute colitis, annexin A1 gene expression in colonic tissue was also reduced in chronic DSS-treated mice in comparison with the control group and it was significantly increased by oleuropein treatment (Figure 42).

Thus, we have demonstrated the anti-inflammatory effect of oleuropein in a chronic DSS-induced colitis, with histological features amelioration and a reduction of inflammatory cell infiltration. The blockade of p38 MAPK pathway by oleuropein could be linked to the inhibition of



inflammation-related mediators and the increase of annexin A1. Moreover, the increase of the Nrf-2 expression by treatment with oleuropein indicates that this compound could not only inhibit inflammatory processes, but also activate endogenous mechanisms to protect against intestinal inflammation.

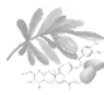
The chronic inflammatory environment present in IBD could derive in malignant processes like CRC (Tang *et al.*,2012). Since we observed the protective effect of oleuropein on DSS-induced acute and chronic intestinal inflammation models, an AOM/DSS-induced CRC model in C57BL/6 mice was carried out to determine the potential chemopreventive activity of this compound. CRC was induced by an intraperitoneal injection of AOM (7.5 mg/kg) on day -7 followed by 4 cycles of 1.5% DSS starting on day 0. Oleuropein was given daily at 50 and 100 mg/kg dissolved in drinking water since day -7. After 63 days, treatment with this compound ameliorated body weight loss and diarrhea/rectal bleeding throughout the experiment, with a clear tendency towards a stabilized body weight and a reduced presence of diarrhea and blood in feces, as evaluated by the DAI score (Table 22 and Figure 43). At the end of the experiment, oleuropein protected from colon shortening and reduced colon weight/length ratio in mice (Table 23 and Figure 44). Histological analysis of hematoxylin and eosin-stained colon sections showed that oleuropein also ameliorated the colon inflammation, protected from epithelial damage and inhibited tumor formation. The incidence of colonic neoplasms was also diminished in oleuropein-treated mice (Figure 45 and Figure 46). These results were supported by the reduction of intestinal cell proliferation by inhibiting ki-67 expression measured by immunochemistry (Table 24 and Figure 47).



Regarding inflammatory mediators, oleuropein also had an inhibitory effect on the release of the inflammatory cytokines IL-6, TNF- α , IL-17A and IFN- γ in colon tissue, (Table 25 and Figure 48). Oleuropein exhibited an inhibitory effect on COX-2 expression (Figure 49) and augmented the pro-apoptotic Bax levels, but had not significant effect on Bcl-2 (Figure 50).

Signalling pathways such p65 NF- κ B, Wnt/ β -catenin, STAT3 and PI3K/Akt are involved in AOM/DSS colon tumor generation, since their activation lead to increase cell proliferation and block the apoptosis processes. Oleuropein showed a marked effect on these pathways, since it reduced the translocation to the nucleus of p65 NF- κ B and β -catenin subunits (Figure 51), and the cytosolic phosphorylation of STAT3 and PI3K/Akt (Figure 52).

We have demonstrated the chemopreventive effect of oleuropein in an AOM/DSS-induced CRC model in mice. The mice treated with oleuropein showed an amelioration of clinical symptoms associated to CRC, as well as a reduction of histopathologic changes and incidence of tumors. In this case, we observed an inhibition of key pathways implicated in tumor appearance and growth as NF- κ B, β -catenin, STAT3 and Akt, some of them also inhibited in the other models by oleuropein. This inhibitory effect could also explain the modulation of mediators implicated in cancer like cytokines, COX-2 or Bax. Moreover, numerous studies suggest cross-communication between the appearance of CRC and an activation of a novel subtype of T helper cells, the Th17 response. Particularly, in AOM/DSS-induced CRC model, it has been demonstrated that IL-17A-deficient animals produce reduced levels of IL-6, TNF- α and IFN- γ , develop milder colitis as well as fewer and smaller tumors than wild-type mice,



showing a clear role of Th17 cytokines (Hyun *et al.*, 2012). The modulation of Th17 response produced by oleuropein in DSS-acute colitis could also have been reproduced in this model, but more studies have to undertake to demonstrate this hypothesis.

Oleuropein (100 μM) and its metabolite hydroxytyrosol (50 μM and 100 μM) were also tested on isolated peritoneal macrophages stimulated with LPS, in order to determine their effect on releasing inflammatory mediators. While oleuropein showed a slight effect on the macrophage activation, it only exerted a reduction of COX-2 expression; hydroxytyrosol reduced iNOS expression and the subsequent production of NO (Table 26 and Figure 53). The latter led to a significant reduction of STAT3 phosphorylation (Figure 54) in a dose-dependent manner and NF- κB p65 expression in the nuclear extract of LPS-stimulated cells as revealed by immunofluorescence and western blot analysis (Figure 55). Hydroxytyrosol also exerted a significant decrease in the IL-6 and IL-1 β gene expression after 3 h of LPS stimulation at 100 μM (Figure 56), and the release of IL-1 β , IL-6, and TNF α at 24 h to the medium (Table 27 and Figure 57).

The results observed on peritoneal macrophages by hydroxytyrosol reinforce the hypothesis that this metabolite, produced by the colonic transformation of oleuropein, could also be implicated on the protective effect against intestinal inflammation.

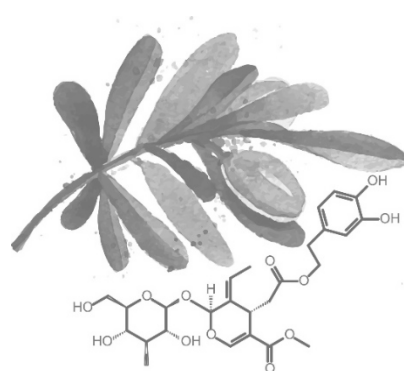
Novel therapeutic strategies for IBD are guided to improve intestinal healing mechanisms, as they are impaired because of the continuous inflammatory damage. In this context, a wound healing assay using IEC-18 cells was performed to demonstrate the cell migratory activity of oleuropein at 10 μM and 100 μM , with a positive effect on wound-induced

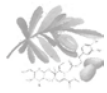


healing migration, enhancing wound closure as compared to dexamethasone (Table 28, Figure 59 and figure 60). Oleuropein at 100 μ M also inhibited COX-2 expression (Figure 61), p38 MAPK phosphorylation (Figure 62) and incremented the gene expression of annexin A1 (Figure 63) in LPS-stimulated IEC-18 cells. These results demonstrated that oleuropein could participate in the accelerated-closing effect on wound healing, as it has been shown that annexin A1 ameliorates healing intestinal processes (Leoni *et al.*, 2015). The lack of effect of oleuropein on NF- κ B in chronic colitis could be related with the increase of healing mechanisms, as the inhibition of this pathway could difficult the closure processes (Carvalho *et al.*, 2014; Andujar *et al.*, 2013), but more studies have to be carried out to investigate this potential mechanism.

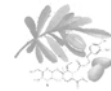
In conclusion, we demonstrated that oleuropein has an anti-inflammatory effect on acute and chronic colitis, and a chemopreventive activity on colitis-associated CRC, possibly due to the inhibition of the signalling pathways involved in these inflammatory disorders. Oleuropein could be a potential protective/preventive agent in the treatment of IBD and CU-associated CRC.

Conclusions





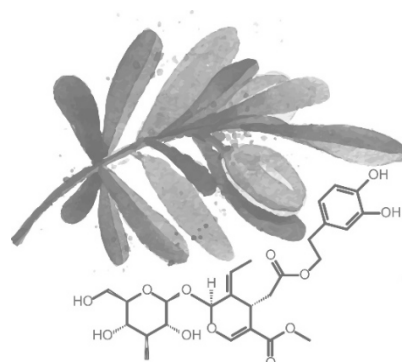
7. The phenolic secoiridoid oleuropein, when orally administered, incorporated to the diet or dissolved in drinking water, protects mice against DSS-induced acute and chronic ulcerative colitis, as well as against colitis-associated colorectal cancer induced by AOM/DSS.
8. In the DSS-induced acute colitis model, oleuropein administered in the diet at 1% for 7 days protects against intestinal inflammation, as shown by amelioration of histological parameters (low cell infiltration, reduction of ulceration and edema). Concerning the presence of inflammatory mediators, different cytokines, COX-2, iNOS and MMP-9 are reduced due to the inhibition of NF- κ B, p38 MAPK and STAT3 signalling pathways.
9. It has been described for the first time that oleuropein, administered in water at a dose of 100 mg/kg, modulates Th17 response, by reducing lymphocytes subpopulations CD4⁺ ROR γ t⁺ and CD4⁺ ROR γ t⁺ IFN- γ ⁺ IL-17A⁺ in the *lamina propria* of colitic mice, as well as the IL-17A and IFN- γ concentration in inflamed tissue.
10. In the DSS-induced chronic colitis model, oleuropein administered in the diet at 0.25% during 56 days, stimulates endogenous anti-inflammatory mechanisms by increasing Nrf-2 expression, IL-10 release and annexin A1 gene expression. In addition to this effect, the inhibition of the different pro-inflammatory markers and p38 MAPK signalling pathway was observed.
11. Oleuropein at 10 y 100 μ M promotes the healing *in vitro* process in IEC-18 cells, by increasing the migration rate. Moreover, it reduces COX-2 expression and p38 MAPK activation after LPS stimulation. These effects could be related to a gene over-expression of annexin A1. On the other hand, this healing effect has been observed in the histological analysis of



colitic mice. In this context, the intestinal mucosa reepithelization may be favoured because of the lack of influence on NF- κ B.

12. Although the prevalence of AOM/DSS-induced colitis-associated CRC has not decreased, the administration of oleuropein in drinking water at 100 mg/kg during 70 days, reduces in a dose-dependent manner the incidence of tumors. The results suggest that the inhibition of different signalling pathways like those of β -catenin and PI3K/Akt, has been involved in the molecular mechanism of oleuropein.

Published
articles



Oleuropein Ameliorates Acute Colitis in Mice

Elisa Giner,[†] Isabel Andújar,[†] M. Carmen Recio,[†] José Luis Ríos,[†] José Miguel Cerdá-Nicolás,[‡] and Rosa M. Giner^{*†}

[†]Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Valencia) Spain

[‡]Departament de Patologia, Facultat de Medicina, Universitat de València, Av. Blasco Ibáñez, 15, 46010 Valencia, Spain

ABSTRACT: Oleuropein, the major secoiridoid in olive tree leaves, possesses a wide range of health promoting properties. It has recently been shown to exhibit anti-inflammatory activity. We have evaluated the effect of oleuropein on dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice in order to provide insight into its mechanisms of action. Oral administration of oleuropein notably attenuated the extent and severity of acute colitis while reducing neutrophil infiltration; production of NO, IL-1 β , IL-6, and TNF- α ; expression of iNOS, COX-2, and MMP-9; and the translocation of the NF- κ B p65 subunit to the nucleus in colon tissue. In LPS-stimulated peritoneal macrophages, the oleuropein metabolite, hydroxytyrosol, was shown to inhibit NO production, iNOS expression, NF- κ B p65 subunit translocation, mRNA expression, and the release of IL-1 β , IL-6, and TNF- α . These results suggest that the effect of oleuropein on DSS-induced colitis is associated with a decrease in the production of interleukins and expression of proteins, principally through reduction of NF- κ B activation.

KEYWORDS: oleuropein, dextran sulfate sodium, colitis, rutin, hydroxytyrosol

■ INTRODUCTION

Human intake of naturally occurring phenolics is associated with a reduced risk of certain diseases because of their effects as antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic and anti-cell proliferator agents. Oleuropein (3,4-dihydroxyphenylethanolenic acid glucoside) is the main secoiridoid of the leaves (up to 6–9% of dry matter) and unprocessed olive drupes of *Olea europaea* (Oleaceae), however, the most abundant phenols in extra virgin olive oil and table olives are the nonpolar oleuropein- and ligstroside-aglycons, formed by enzymatic removal of glucose, and the polar compounds hydroxytyrosol and tyrosol, end products of their hydrolysis.¹ Olive tree leaves have been used in the human diet as an extract, herbal tea or a powder for its potential beneficial effects.² Oleuropein is not absorbed in the small intestine, but undergoes rapid degradation in the large intestine to yield hydroxytyrosol.^{3,4} Oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol have been reported as powerful antioxidant, antiangiogenic and anticancer agents.^{5,6} An olive oil polyphenolic extract containing oleuropein and hydroxytyrosol exerted chemopreventive effects in the large intestine by inhibiting p38/CREB and cyclooxygenase (COX)-2 expression, signaling pathways responsible for colorectal cancer development.⁷ Oleuropein inhibited proliferation of MCF-7 breast cancer cells by interfering with extracellular regulated kinase (Erk)1/2 activation,⁸ and exerted antiproliferative and antiapoptotic effects on human colorectal cancer cells SW620 with a mechanism no fatty acid synthase mediated, a key anabolic enzyme in colon carcinoma development.⁹ Oleuropein has also demonstrated anti-inflammatory effect, by inhibiting interleukin (IL)-1 β and prostaglandin (PG)E₂ release in human whole blood cultures,¹⁰ and its aglycon caused a significant reduction on IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α production, expression of adhesion molecules and nitric oxide (NO) synthesis in a mouse carrageenan-induced pleurisy model.¹¹

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic intestinal inflammatory disorder with unknown etiology, which includes ulcerative colitis (UC) and Crohn disease (CD). Ulceration and inflammation of the intestinal mucosa with leukocyte infiltration are the common histological changes associated with IBD. One of the most important signaling pathways implicated in IBD is the activation of nuclear factor (NF)- κ B,¹² generating increased levels of inflammatory mediators, such as IL-6, IL-1 β and TNF- α , and COX-2, iNOS and metalloproteinase (MMP) expression. Different animal models of experimental colitis have been developed to study the molecular and cellular mechanisms of inflammation and immunological disease; one of these is the dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis model in rodents, that induces colonic inflammation with clinical and histological similarity to human UC and is frequently used to evaluate the effect of novel anti-inflammatory drugs. Depending on the doses of DSS and the duration of experiment, the inflammatory process can be acute or chronic, progressing to colorectal cancer. Oral DSS administration in the drinking water induces a colon inflammation accompanied by diarrhea, rectal bleeding, body weight loss and shortening of the colorectum.¹³ Although increasing evidence has come light to the mechanisms of the inflammation and immune responses in the IBD process and a number of therapeutic approaches targeting inflammatory mediators implicated are available, new treatment approaches are still necessary.

A growing body of evidence indicates that polyphenols can modulate intestinal inflammation,¹⁴ supporting these types of plant secondary metabolites as promising candidates among

Received: September 13, 2011

Revised: November 18, 2011

Accepted: November 24, 2011

Published: November 24, 2011

natural preventive/protective treatments of IBD. Although a number of studies have investigated the effects of phenolic compounds on intestinal inflammation, as pure molecules or as plant extracts, little information is available in the literature concerning the efficacy of oleuropein. The aim of the present study is to assess the efficacy of oleuropein on DSS-induced colitis model in mice, therefore to gain insight into the mechanism of action and pharmacological value of oleuropein as regards the inflammatory mediators involved in IBD, histological analyses have been carried out along with an analysis of the different proinflammatory cytokines important for exacerbation of IBD, and iNOS, COX-2, MMP-9 expression and p65 translocation to the nucleus found in colonic tissue affected by DSS.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Unless otherwise specified, all chemicals including oleuropein and biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Baker (Deventer, Holland). Dextran sulfate sodium (36–50 kDa) was purchased from MP Biomedical (France). Specific antibodies for β -actin and MMP-9 were also obtained from Sigma-Aldrich, and antibodies recognizing iNOS and COX-2 were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA) and Cayman (Ann Arbor, MI, USA), respectively. Anti-p65 polyclonal antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). ELISA kits for cytokines were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA).

Animals. All animal care and experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Valencia, Spain. Female BALB/c mice (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain), 6–8 weeks of age weighing 18–20 g were acclimatized under a 12 h light/dark cycle at 22 °C and 60% humidity, for 7 days before the experiments, and fed with a standard laboratory rodent diet and water ad libitum.

Isolation and Culture of Mouse Peritoneal Macrophages.

Two milliliters of 3% thioglycolate broth was injected into peritoneal cavities of BALB/c mice. After 4 days, peritoneal macrophages were harvested by washing with 10 mL of phosphate-buffered saline (PBS), centrifuged at 240g for 5 min at 4 °C, seeded onto a 6-well plate at a density of 1.5×10^6 cells per well in DMEM supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U mL^{-1}) and streptomycin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) and then cultured at 37 °C under a humidified atmosphere of 5% CO_2 .¹⁵ After incubation for 2 h, macrophages were treated with the vehicle alone or various concentrations of oleuropein or hydroxytyrosol ($50 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$) for 1 h and then stimulated with lipopolysaccharide (LPS, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 h. Following incubation, cells were scraped and the cytosolic and nuclear protein fractions were extracted with the aid of the Proteojet cytosolic and nuclear extraction kit (Fermentas, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), used according to the manufacturer's instructions. The protein concentration of samples was determined by Bradford's method. Proteins and cell-free supernatants collected were stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until use. The cytotoxicity of compounds on cells was performed spectrophotometrically at 490 nm by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.¹⁶ The percentage of viability was calculated as the relation of viable cell number/total cell number $\times 100$.

Induction of Dextran Sulfate Sodium (DSS) Colitis and Treatment. Acute colitis was induced by supplementing drinking water with 5% (w/v) DSS for 7 days.¹⁷ The animals were randomly assigned to one of four treatment groups: control (mice received drinking water and control diet), DSS group (mice received 5% DSS in drinking water and control diet), DSS+O group (mice received 5% DSS in drinking water and diet supplemented with 1% oleuropein) and DSS+R group (mice received 5% DSS in drinking water and diet supplemented with 2% rutin). The diet was prepared as described previously,¹⁸ by mixing powdered food with products (1% oleuropein and 2% rutin, final content). When it was completely homogenized, water (0.65 mL g^{-1} of diet) and microwave-melted agar (0.2% final

content in the diet) were added and mixed. The food was dried for 24 h and divided into portions based on an estimated consumption of 4 g of dry matter/mouse/day. Mice were sacrificed at day 8 by cervical dislocation and their colons removed. 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 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until use.

Disease Activity Index (DAI). DAI was used to assess the severity of colitis (Table 1). Three times a week, mice were checked by

Table 1. Scoring System To Calculate the Disease Activity Index (DAI)^a

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

^aDAI value is calculated as the sum of scores of weight loss, stool consistency and blood in feces.

monitoring body weight. At the end of the experiment, stool consistency (presence of diarrhea) and gross rectal bleeding (measured by visible fecal blood and macroscopic examination of the anus) were evaluated.

Histological Analysis. Colons were cut along the vertical axis and rolled up in a spiral starting from the distal (duodenal) margin. Then, they were fixed in 4% buffered formaldehyde, paraffin embedded, sectioned and stained with hematoxylin and eosin. Severity of colitis was assessed using a histological disease score. Eight randomly selected fields (magnification $\times 100$) in each section were observed and graded as above in a blinded fashion by an expert pathologist. The mean in each section was calculated by scoring the grades in eight fields (Table 2).

Table 2. Histologic Scoring System for DSS-Induced Colitis^a

score	description
	Severity of Inflammation
0	none
1	mild
2	moderate
3	severe
	Extent of Inflammation
0	none
1	mucosa
2	mucosa and submucosa
3	transmural
	Crypt Damage
0	none
1	1/3 damaged
2	2/3 damaged
3	crypts lost, surface epithelium present
4	crypts and surface epithelium lost

^aScores were calculated by adding the score for the three parameters, giving a maximum score of 10.

The pathological manifestations were graded as follows: severity of inflammation (0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe), extent of inflammation (0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe) and crypt damage (0 = none, 1 = 1/3 damaged, 2 = 2/3 damaged, 3 = crypt lost, surface epithelium present, 4 = crypt lost and surface epithelium lost). The overall histological score was the sum of the three evaluations (maximal score of 10).

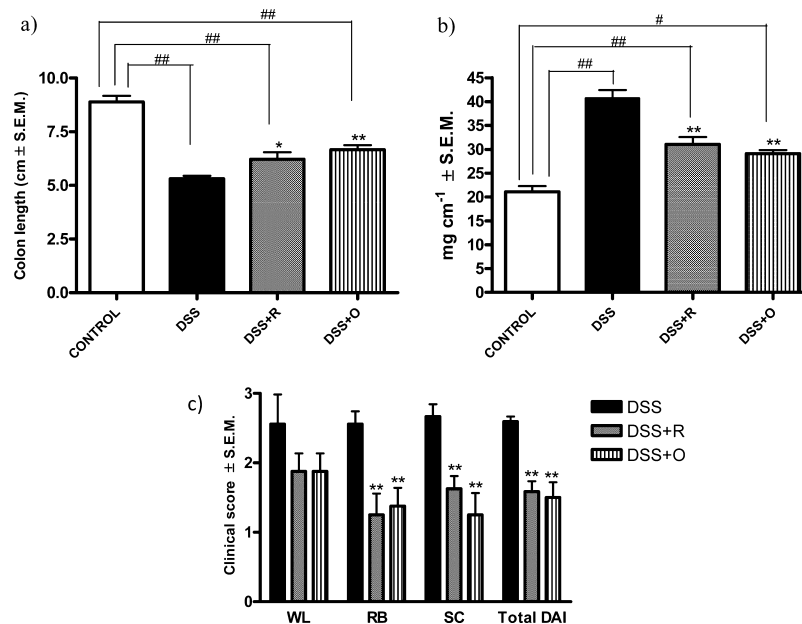


Figure 1. Effects of oleuropein in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Colitis was induced by drinking 5% DSS water for 7 days. Mice were sacrificed at day 8, and colons were harvested. (a) Colon lengths in each group measured at the end of the experiment (day 8). (b) Weight:length ratio. (c) Disease activity index (DAI) scored at day 8 using the following parameters: weight loss (WL), rectal bleeding (RB) and stool consistency (SC). Each bar chart shows the mean \pm SEM for at least four independent experiments ($n = 10$ animals for each experiment). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the DSS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA following by Dunnett's t test.

Colonic Tissue Culture. Colon tissue was washed with RPMI-1640 medium (Invitrogen, Langley, OK, USA), supplemented with 2% FBS, 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 μ g mL⁻¹ streptomycin. Then, tissues were cut into small pieces (1 cm approximately), placed in a 24-well culture plate with RPMI-1640 medium containing 10% FBS and antibiotics, and incubated in 5% CO₂-air-humidified atmosphere at 37 °C for 24 h.¹⁹

Determination of NO Production. NO concentration in the colonic tissue culture media and macrophage-free supernatants was measured at 570 nm using a Labsystems Multiskan MCC/340 plate reader (Helsinki, Finland) by means of the Griess reagent.²⁰

Interleukin-1 β , Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Production. The colons were thawed, grounded to powder in a mortar, weighed and then suspended (20% w/v) in PBS containing 0.1% Nonidet NP-40 buffer, homogenized, sonicated for 30 s and centrifuged at 20000g for 10 min at 4 °C. Supernatants were collected and assayed, as well as those from macrophage-free supernatants, for IL-1 β , IL-6 and TNF- α by use of specific enzyme immunoassay kits, used according to the manufacturer's instructions. The amount of cytokines was expressed as pg mL⁻¹ per mg of protein.

Measurement of Myeloperoxidase (MPO) Activity in Colonic Tissue. The colons were thawed, grounded to powder in a mortar, weighed and then suspended (10% w/v) in 80 mM sodium phosphate buffer (pH = 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), sonicated for 30 s and centrifuged at 11000g for 20 min at 4 °C. The assay mixture was performed in a 96-well plate, adding 30 μ L of supernatant, 100 μ L of PBS, 85 μ L of 0.22 M sodium phosphate buffer (pH = 5.4) and 15 μ L of 0.017% H₂O₂. The reaction was started by adding 20 μ L of 18.4 mM of tetramethylbenzidine dissolved in 8% dimethylformamide and incubating at 37 °C for 3 min. The reaction was stopped by the addition of 30 μ L of sodium acetate 1.46 M (pH = 3) on ice, and MPO activity was determined spectrophotometrically at 630 nm. MPO activity was expressed as the amount of enzyme necessary to produce a change in absorbance of 1.0 unit g⁻¹ of tissue.²¹

Cytosolic and Nuclear Protein Extraction. Proteins from powdered tissue samples were extracted by using a buffer A, containing 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 1 μ g mL⁻¹ aprotinin, 1 μ g mL⁻¹ leupeptin and

1 μ g mL⁻¹ pepstatin, pH = 7.9. After that, the samples were sonicated, added 0.5% Nonidet NP-40 solution and incubated on ice 45 min. The lysates were centrifuged at 2500g for 10 min at 4 °C, and the supernatants, corresponding to cytosolic fraction, were collected and stored at -80 °C. After that, pellets were resuspended with 500 μ L of buffer B containing 20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.5 mM PMSF, 1 μ g mL⁻¹ aprotinin, 1 μ g mL⁻¹ leupeptin, and 1 μ g mL⁻¹ pepstatin A (pH = 7.9). Samples were incubated 30 min on ice and centrifuged at 20000g for 15 min, and supernatants, corresponding to nuclear fraction, were collected and stored at -80 °C.¹⁵ The protein concentration of samples was determined by Bradford's method.

Western Blot Analysis. Equal amounts of protein (25 μ g) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, England, U.K.). The membranes were then blocked with PBS-0.05% Tween 20 containing 6% w/v defatted milk for 2 h. For COX-2, iNOS, MMP-9, the membranes were incubated with the respective polyclonal antibodies (1:1000 dilution); for NF- κ B p65, the membranes were incubated with anti-p65 polyclonal antibody (1:500, Santa Cruz); for β -actin, the membranes were incubated with anti- β -actin polyclonal antibody (1:12000 dilution, Sigma-Aldrich). The blots were washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat immunoglobulin G (1/20000) (Cayman). Finally, the immunoreactive bands were visualized with the aid of an enhanced chemiluminescence system (Millipore). To unify Western blot densitometry results in the processed images, data from the DSS group (or, in the case of peritoneal macrophages, from the LPS-stimulated cell group) were taken as reference and assigned the value 100. Relative percentages of the other groups were then calculated and represented graphically.¹⁵

RNA Extraction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Peritoneal macrophages (5×10^5) were pretreated with oleuropein and hydroxytyrosol (50 μ M and 100 μ M) for 1 h and then stimulated with LPS (1 μ g mL⁻¹) for 4 h. Cells were collected and total RNA was extracted with the aid of RNeasy mini spin columns (Qiagen, Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. The concentration of the extracted RNA

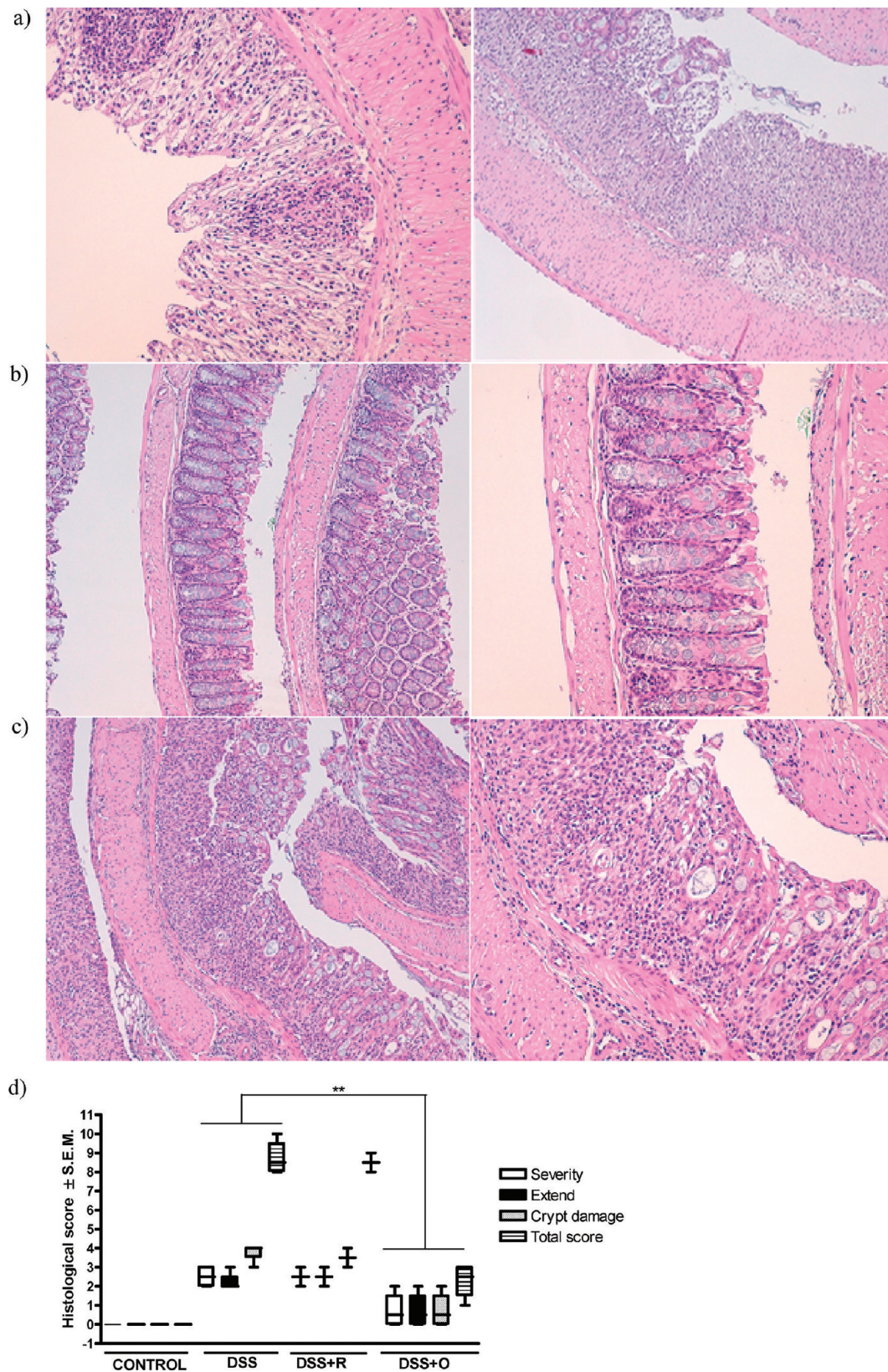


Figure 2. Effects of oleuropein on histological manifestation in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Hematoxylin and eosin staining images of representative colons are shown at the same magnification (100x). (a) DSS. (b) DSS+O. (c) DSS+R. (d) Histological scores were evaluated. Each bar chart represents the mean \pm S.E.M. for at least four independent experiments ($n = 10$ animals for each experiment). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the DSS group; using one-way ANOVA following by Dunnett's t test.

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. Aliquots of 500 ng of RNA were transformed to first strand complementary DNA (cDNA), and 1 μ L of the resulting cDNA was

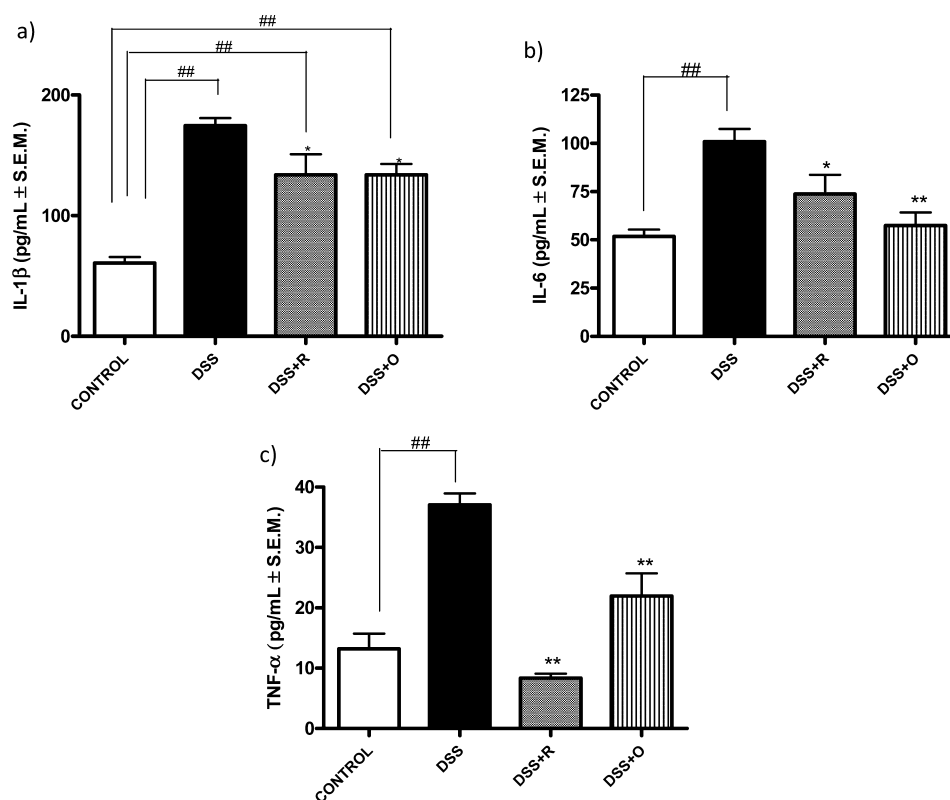


Figure 3. Effects of oleuropein on cytokine levels in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Mice were sacrificed at day 8, and harvested colon tissues were powdered in a mortar with liquid nitrogen. The cytokine levels in colonic homogenates were determined by ELISA. The amount of cytokines was expressed as pg mL⁻¹ per mg of protein. (a) IL-1 β levels. (b) IL-6 levels. (c) TNF- α levels. Each bar chart represents mean \pm SEM for at least 3 independent experiments ($n = 7$ animals for each experiment). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the DSS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA following by Dunnett's t test.

mixed with 12.5 μ L of Red Taq mix and 1 μ M primers (Invitrogen) and completed to 25 μ L with RNase free water of IL-6 (sense, 5'-ATGCTGGTGACAACC ACGGCC-3'; antisense, 5'-GGCATAACG-CACTAGGTTTGGCCGA-3'), TNF- α (sense, 5'-AGCCCCACGTCG-TAGCAAACCAC-3'; antisense, 5'-TAGACGTGCCCGGACT CCGC'), IL-1 β (sense, 5'-GCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGCA-3'; antisense, 5'-AGCGACCTGTCTTGCCGAGG-3') and β -actin (sense, 5'-GCAGAGCAAGAGAGCATCC-3'; antisense, 5'-CTGTGGT-GGTGAAGCTGTAG-3'). The thermocycler conditions were 94 $^{\circ}$ C for 1 min, with an annealing temperature of 60 $^{\circ}$ C for 1 min and an elongation temperature of 72 $^{\circ}$ C for 1 min for the first 30 cycles, followed by an elongation temperature of 72 $^{\circ}$ C for 10 min. After the reaction was completed, the amplified product was removed from the tubes and run on 2% agarose gel in TAE buffer (4.84 g L⁻¹ Tris base, 1.144 mL L⁻¹ glacial acetic acid, 2 mL L⁻¹ EDTA 0.5 mM, pH = 8.5).²⁰

Statistical Analysis. The results are expressed as the mean \pm standard error values. Statistical significance was determined with a one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's t -test for multiple comparisons.

Software. 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).

RESULTS

Effect of Oleuropein on DSS-Induced Colitis. Water consumption and diet were checked three times a week; no differences among the various experimental groups were observed. Mice given 5% DSS in drinking water for 7 days developed colitis symptoms without mortality. Animals in the treatment groups consumed either 2.4 g of oleuropein kg⁻¹ or

3.7 g of rutin kg⁻¹ daily, which in humans is equivalent to 194.0 mg kg⁻¹ or 302.3 mg kg⁻¹, respectively, according to the human equivalent formula.²² Having established that consuming these amounts daily for 7 days did not affect the viability of the mice, we proceeded to examine the effects on various manifestations of acute DSS-induced colitis, including body weight loss, diarrhea, bloody stools, edematous inflammation in the colon, and shortening of the colon.¹³ Weight loss was monitored at 0, 4, and 8 days; diarrhea and blood in stools were both monitored on day 8. Treatment with DSS dramatically reduced colon length, increased colon wet weight caused by edema, and produced severe diarrhea and rectal bleeding in comparison with mice that received regular drinking water (control). Treatment with oleuropein or the reference drug rutin significantly reduced colon shortening and the mg/cm ratio; however, they were only mildly effective in preventing body weight loss. Overall, the DAI score, an indicator of the severity of intestinal inflammation, which was 0 in control mice, was significantly lower in mice treated with oleuropein or rutin than in DSS mice (Figure 1).

Histological Evaluation. Histological analyses of the samples from the DSS-treated mice showed typical inflammatory changes in colonic architecture, including mucosal ulceration, crypt damage, edema, and cell infiltration into mucosal tissue (Figure 2a). Compared to those taken from DSS mice, colon tissue sections from mice fed with oleuropein exhibited far fewer infiltrating cells, a significantly lower degree of mucosal injury, and less edema (Figure 2b). Rutin produced no significant effect, although inflammatory cell infiltration, edema, and crypt damage were all slightly attenuated (Figure 2c). The total histological score determined as indicated in Table 2 is given in Figure 2d.

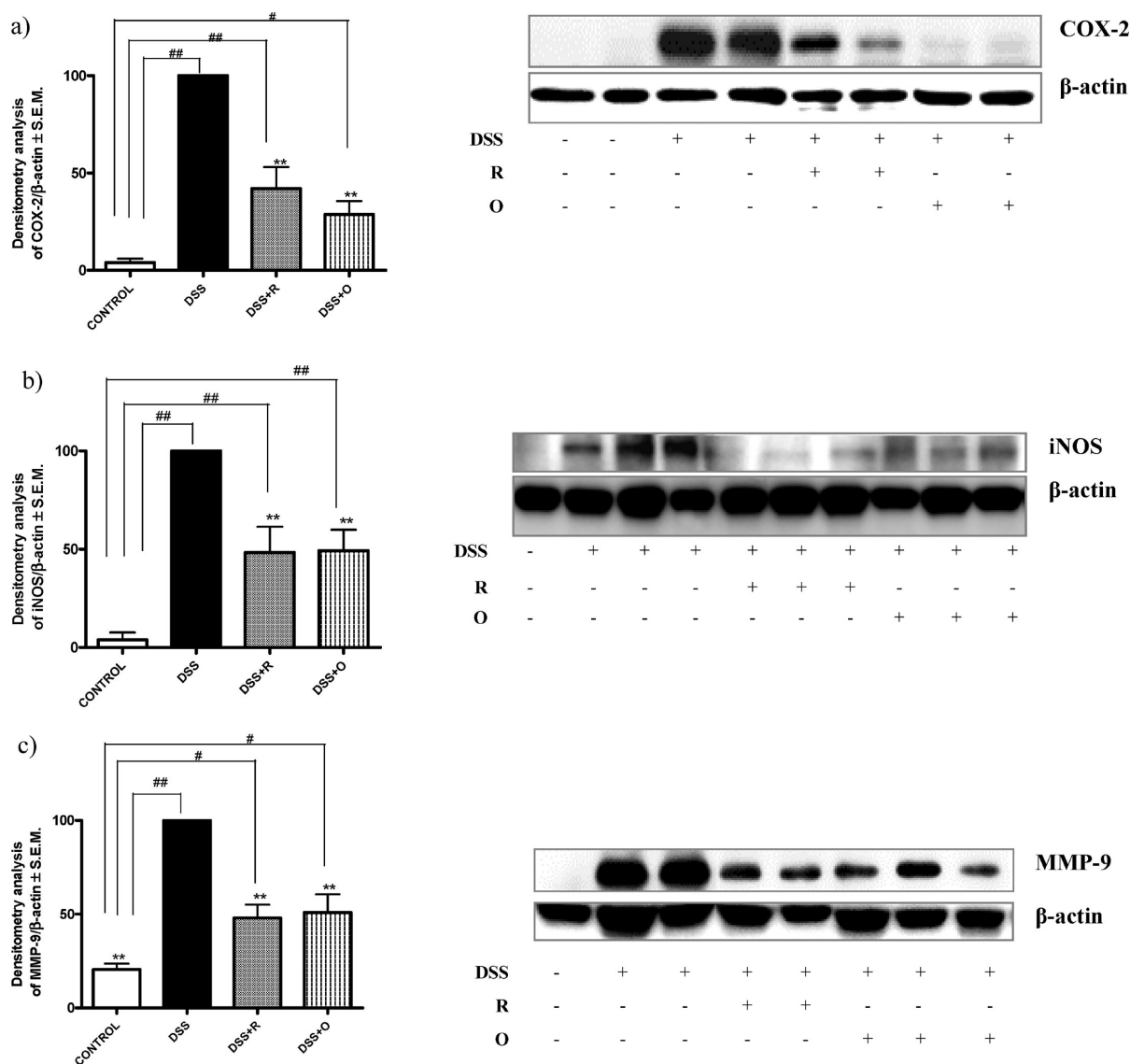


Figure 4. Effects of oleuropein on cyclooxygenase-2 (COX-2) (a), inducible nitric oxide synthase (iNOS) (b), metalloproteinase (MMP)-9 (c) and expressions in DSS-induced colitis in mice. Mice were sacrificed at day 8, harvested colon tissues were powdered in a mortar with liquid nitrogen and tissue proteins were extracted. A representative Western blot of each experiment is shown. The expressions of COX-2, iNOS, and MMP-9 are determined by densitometry and normalized to β -actin content for each sample. The histograms represent the data derived from the Western blots following densitometry analysis and considering the DSS group as having 100% expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the DSS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA following by Dunnett's t test ($n = 7$ animals for each experiment).

Oleuropein Suppressed NO Release in Colon Culture Supernatants. NO is a common inflammatory mediator involved in the pathogenesis of IBD. At day 8, we detected an increase of nitrite levels, an indicator of NO secretion, in the colon culture supernatants of the DSS group with regard to the control group (25-fold compared to control). These levels were significantly reduced in mice fed with oleuropein or rutin (90% and 100% inhibition, respectively, ** $P < 0.01$).

Effect of Oleuropein on MPO Activity in Colon Tissues. MPO, an enzyme produced mainly by polymorphonuclear leukocytes, is a marker of neutrophil infiltration in tissue. After being administered DSS for 7 days, mice showed a significant increase in MPO activity (5-fold compared to control), which was drastically reduced in oleuropein-fed mice (90% inhibition, ** $P < 0.01$). Rutin produced no effect on MPO activity.

Oleuropein Reduced IL-1 β , IL-6 and TNF- α Production in Colon Tissue. Colonic IL-1 β , IL-6 and TNF- α are proinflammatory cytokines that play a critical role in the development of IBD. After 7 days of DSS administration, IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in colonic tissue increased markedly in DSS-treated mice in comparison with the control group. Treatment with oleuropein significantly suppressed IL-1 β (Figure 3a), IL-6 (Figure 3b), and TNF- α (Figure 3c) levels by 37%, 88%, and 60%, respectively. Rutin also attenuated IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels by 37%, 30% and 90%, respectively (Figure 3).

Oleuropein Decreased Inflammatory Protein Expression in DSS Induced Colitis. Western blot analyses of colonic tissue from the DSS group showed a marked increase in the expression of COX-2 (Figure 4a) and iNOS (Figure 4b). This effect was reversed in mice treated with oleuropein (71% and 50% inhibition, respectively), with similar results for mice treated

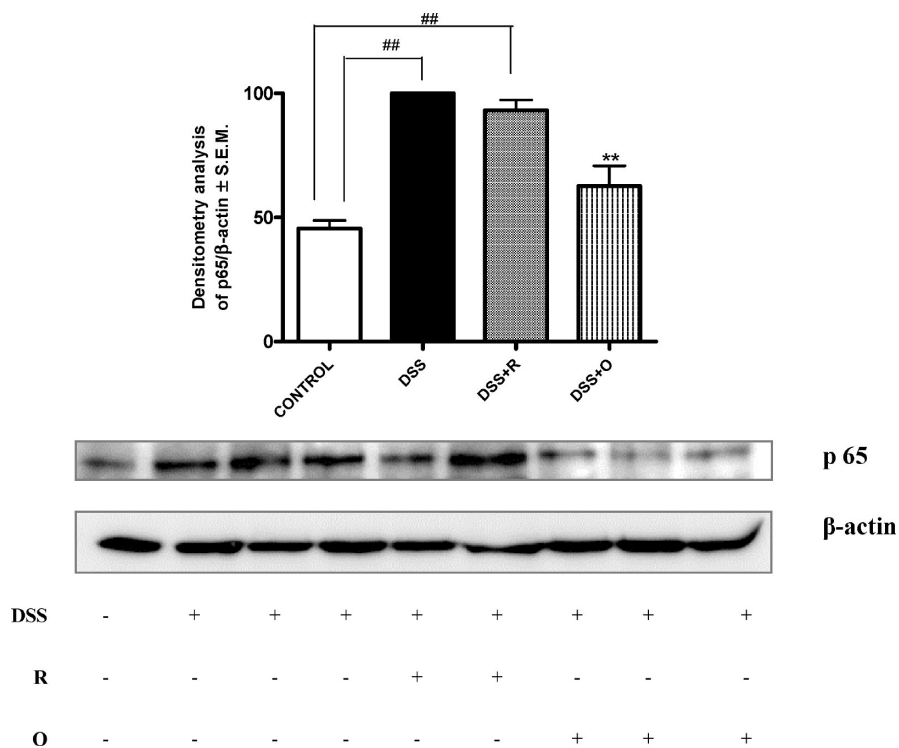


Figure 5. Effects of oleuropein on p65 expression DSS-induced colitis in mice. Mice were sacrificed at day 8, colon tissues were powdered in a mortar with liquid nitrogen and tissue nuclear proteins were extracted. A representative Western blot of the experiment is shown. The expressions of p65 is determined by densitometry and normalized to β -actin content for each sample. The histograms represent the data derived from the Western blots following densitometry analysis and considering the DSS group as having 100% expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the DSS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA following by Dunnett's t test ($n = 7$ animals for each experiment).

with rutin (63% and 51% inhibition, respectively) (Figure 4). MMPs have been shown to play a crucial role in the pathogenesis of IBD, increasing mucosal proteolysis and generating inflammation. The most abundant MMP expressed in patients with UC is MMP-9.²³ Both oleuropein and rutin significantly attenuated this increment by 62% and 65%, respectively (Figure 4c).

Oleuropein Inhibited p65 Subunit Translocation to Nucleus. Activation of NF- κ B leads to the gene expression of inflammatory cytokines and other mediators involved in the pathogenesis of IBD such as COX-2 and iNOS. Upon stimulation, the functional form of NF- κ B, the inactive p50/p65 heterodimer, which forms a complex with the inhibitory protein I κ B α in the cytoplasm, is rapidly phosphorylated by I κ B kinase and proteolytically degraded, allowing translocation of p50/p65 to the nucleus. Inhibition of NF- κ B activation has thus been proposed as an anti-inflammatory strategy in IBD. Using Western blot analysis, we detected an increase in p65 subunit levels in nuclear proteins obtained from DSS mice. Interestingly, oleuropein treatment significantly reduced DSS-induced NF- κ B nuclear translocation by 40% whereas rutin exerted no effect on NF- κ B p65 in the nuclear extract of colon tissue (Figure 5).

Effect of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol on Several Proinflammatory Mediators in Lipopolysaccharide Stimulated-Mouse Peritoneal Macrophages. After having demonstrated that neither oleuropein nor hydroxytyrosol at 100 μ M exhibited any cytotoxicity on mouse peritoneal macrophages in the MTT test (data not shown), we tested the effects of these compounds on the expression and release of several proinflammatory proteins. As shown in Figure 6, levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in peritoneal macrophages

increased markedly after stimulation with LPS. Only hydroxytyrosol treatment (100 μ M) 1 h before stimulation significantly decreased the production of IL-1 β (72%), IL-6 (50%), and TNF- α (33%). It also reduced iNOS expression by 72% (Figure 7a), and the subsequent production of NO was inhibited by 87%. Hydroxytyrosol treatment also led to a significant reduction of NF- κ B p65 in the nuclear extract of LPS-stimulated cells in a concentration dependent manner (Figure 7b). To determine whether the inhibitory effect of oleuropein and hydroxytyrosol on cytokine production occurred through the inhibition of the corresponding gene expression, mRNA expression of IL-6, TNF- α , and IL-1 β was analyzed with the aid of semiquantitative RT-PCR. As shown in Figure 8, IL-6, TNF- α and IL-1 β were undetectable in non-stimulated cells. However, upon stimulation with LPS, the protein expression of these cytokines showed a marked increase. Hydroxytyrosol at 100 μ M significantly reduced IL-6 and IL-1 β gene mRNA expression by 25% and 21%, respectively.

DISCUSSION

Ulcerative colitis induced by DSS is characterized by an increased mucosal infiltration of inflammatory cells, which activated, release proinflammatory cytokines, induce increased expression of iNOS, COX-2 and nuclear transcription factor NF- κ B. These changes impair the mucous barrier and cause swelling, erosions, ulcers and hemorrhage leading to destructive damage of intestinal mucosa. In this study, we have demonstrated that oleuropein orally administered at a dose of 2.4 g kg⁻¹ is effective for attenuating DSS-induced colitis in mice via inhibition of proinflammatory protein expression and release as well as by acting on NF- κ B signaling. The severity of the colitis has

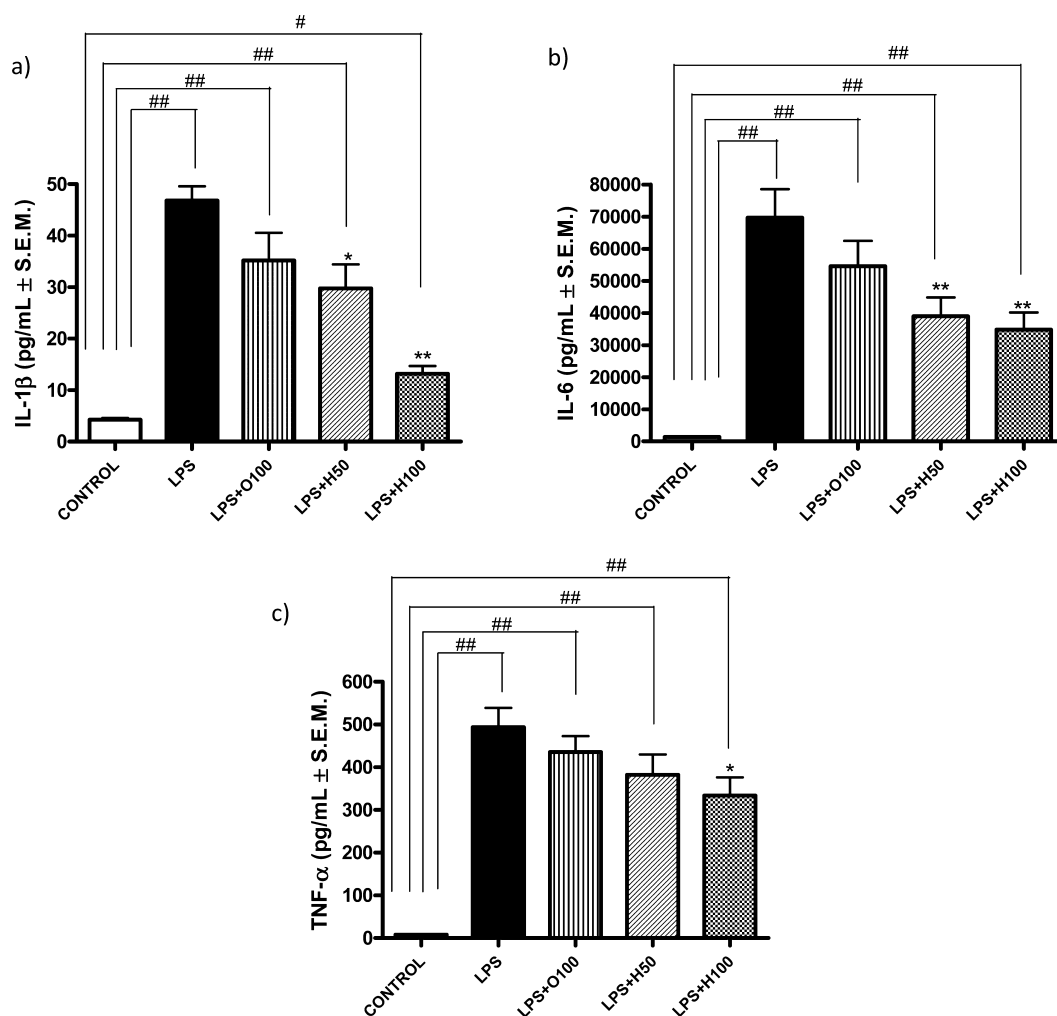


Figure 6. Effects of oleuropein and hydroxytyrosol on cytokine levels in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages from mice intraperitoneally injected with 3% thioglycolate broth 4 days before were seeded onto a 6-well plate at a density of 1.5×10^6 cells/well in DMEM. After incubation for 2 h, macrophages were treated with the vehicle (medium) or oleuropein or hydroxytyrosol (50 μ M and 100 μ M) for 1 h and then stimulated with LPS (1 μ g mL $^{-1}$) for 24 h. Following incubation, the cytokine levels in cell-free supernatants were determined by ELISA and expressed as pg mL $^{-1}$. (a) IL-1 β levels. (b) IL-6 levels. (c) TNF- α levels. Each bar chart represents mean \pm SEM for at least 3 independent experiments ($n = 12$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the control group; using one-way ANOVA following by Dunnett's t test.

been determined according to various morphological, histological and biochemical parameters, and oleuropein has been shown to protect against this model of colitis since it decreased the extension of inflammation and enhanced integrity of the epithelium as observed on histologic assessment.

DSS-induced inflammation is controlled by an array of pro- and anti-inflammatory cytokines which normally recruits inflammatory cells to the colitic tissue. Our results exhibit a marked increased of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α in colitic tissue that are inhibited by oleuropein. There is an amount of data to show that cytokines can increase MMP production. MMPs are implicated in tissue remodeling and destruction associated with several inflammatory conditions, the predominant proteinases being expressed in the gut mucosa during active IBD. Indeed, both an increased activity and expression of MMPs in colonic tissues of patients with IBD have been found. Moreover, of the MMPs, the secreted gelatinase MMP-9 is upregulated in both animal models of colitis such as DSS-induced colitis and human IBD, and several studies have indicated that DSS-induced colitis is markedly attenuated in animals containing a targeted deletion

of the MMP-9 gene.^{24,25} Thus, strategies to inhibit MMP-9 may be of potential therapeutic benefit. In addition, neutrophil infiltration is considered a key histological characteristic of acute activity of the disease, so concomitantly, the activity of myeloperoxidase is enhanced, and these cells mainly secrete MMP-9. Our data show that oleuropein not only markedly attenuated neutrophil accumulation but also inhibited MMP-9 expression in colitic tissue. This result is in agreement with a previous report indicating that oleuropein aglycon in vitro prevented the stimulation of MMP-9 expression and secretion in TNF- α treated THP-1 cells due to impaired NF- κ B signaling.²⁶

Among the principal intracellular signal transduction cascades involved in intestinal inflammation, NF- κ B plays a crucial role as a key regulator of inflammatory gene expression. When activated, NF- κ B translocates into the nucleus to regulate the expression of genes encoding cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α , inflammatory enzymes particularly iNOS and COX-2, adhesion molecules, immunoregulatory proteins and acute phase response proteins.¹⁴ Recent investigations have established a close interrelationship between both the inhibition of NF- κ B and the reduction of cytokine production and the

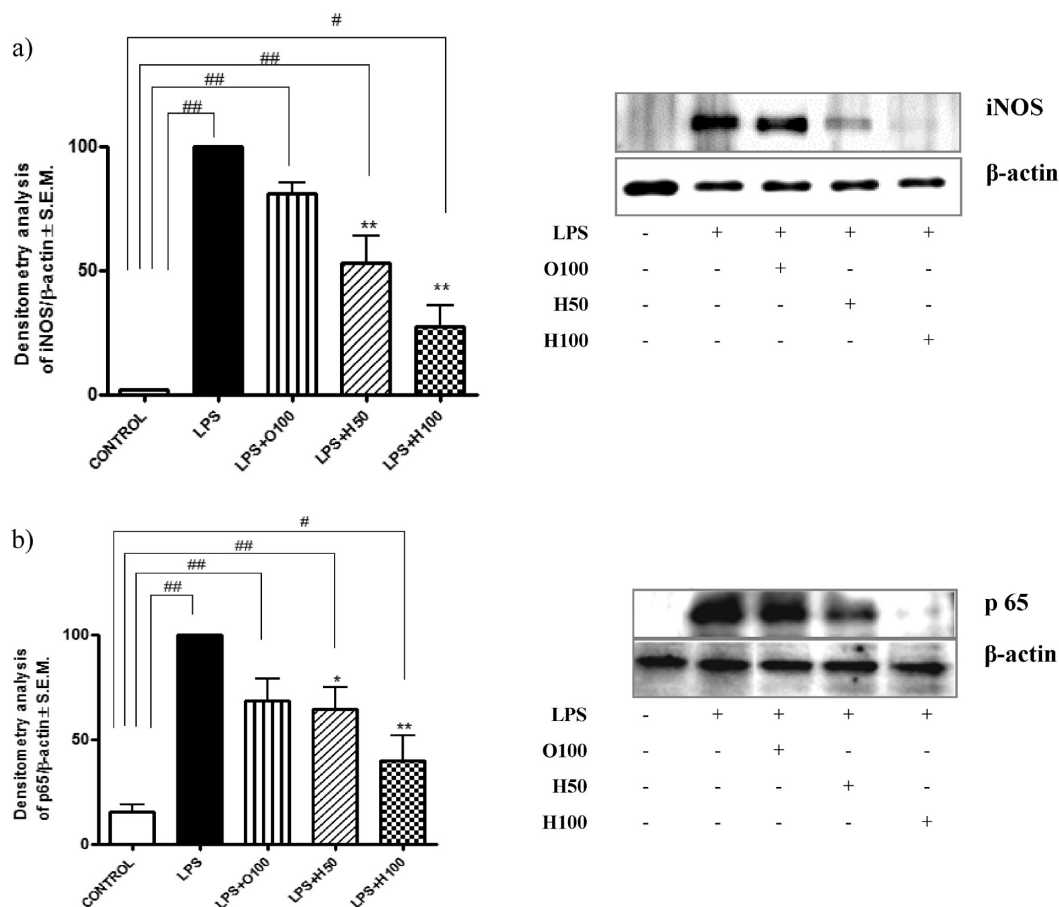


Figure 7. Effects of hydroxytyrosol on inducible nitric oxide synthase (iNOS) (a) and p65 (b) expressions in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages from mice intraperitoneally injected with 3% thioglycolate broth 4 days before were seeded onto a 6-well plate at a density of 1.5×10^6 cells/well in DMEM. After incubation for 2 h, macrophages were treated with the vehicle (medium) or hydroxytyrosol (50 μM and 100 μM) for 1 h and then stimulated with LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 h. Following incubation, cells were scraped and proteins were extracted with a protein extraction kit. The expressions of iNOS and p65 are determined by densitometry and normalized to β -actin content for each sample. The histograms represent the data derived from the Western blots following densitometry analysis and considering the control group as having 100% expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the control group; using one-way ANOVA following by Dunnett's t test ($n = 12$).

attenuation of IBD. In this context, oleuropein manifest a clear reduction on NF- κ B p65 nuclear translocation in the colon tissue. This inhibitory effect may partly justify the decrease observed in the cytokine production.

In ulcerative colitis, cytokines induce expression of iNOS leading to an increase of NO synthesis, which causes development of inflammatory processes and ulcerogenesis. Development of colitis is accompanied not only by the activation of the NO-synthase system but also by the increased expression of COX-2. Despite the pivotal role of both iNOS and COX-2 in the pathogenesis of colitis, their relative contributions in intestinal inflammation remain controversial. Although iNOS is an excellent marker of intestinal inflammation, it has been claimed to be associated to both exacerbation and protection of colitis. In this regard, both deterioration of trinitrobenzene sulfonic acid colitis and improvement of DSS colitis in mice with deletion of iNOS have been reported.²⁷ In the present study, we have identified large increases in iNOS expression in DSS-induced colitis and found that oleuropein treatment of the mice significantly reduce iNOS levels. These findings are consistent with a previous report indicating a marked attenuation of colitis in iNOS-deficient mice in other experimental models²⁷ suggesting that the reduction in iNOS with oleuropein is likely contributing to its benefit in this model. On the other hand, animal models of colitis using COX-2

knockout mice and COX inhibitors indicate that COX-2 has a protective role against colon inflammation.²⁸ However, contrary results were observed using celecoxib, which caused a substantial reduction of the degree of colonic injury. In this context, results obtained by Sklyarov et al.²⁹ provide evidence of the marked cytoprotective effects of the combination of both iNOS and COX-2 inactivation under conditions of ulcerative colitis, thus suggesting the development of drugs capable of combined blockage of iNOS and COX-2 as a new approach for the treatment of ulcerative colitis. In the current study, a clear reduction of COX-2 was also observed in the colonic tissue of mice treated with oleuropein, so this inhibition could display additive character to its effect on the inflammation process.

We also investigated the effect of oleuropein and its active metabolite hydroxytyrosol on peritoneal LPS-stimulated macrophages. In contrast to the strong inhibitory effects shown in the in vivo experiments, oleuropein exerts negligible activity in vitro. However, hydroxytyrosol in a concentration dependent manner is shown to inhibit significantly iNOS expression, accompanied by a reduction of NO production and p65 expression as well as cytokine production. Furthermore, we observe a modest decrease in IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA expression when cells were exposed to hydroxytyrosol. Our findings shows that the oral treatment of mice with oleuropein

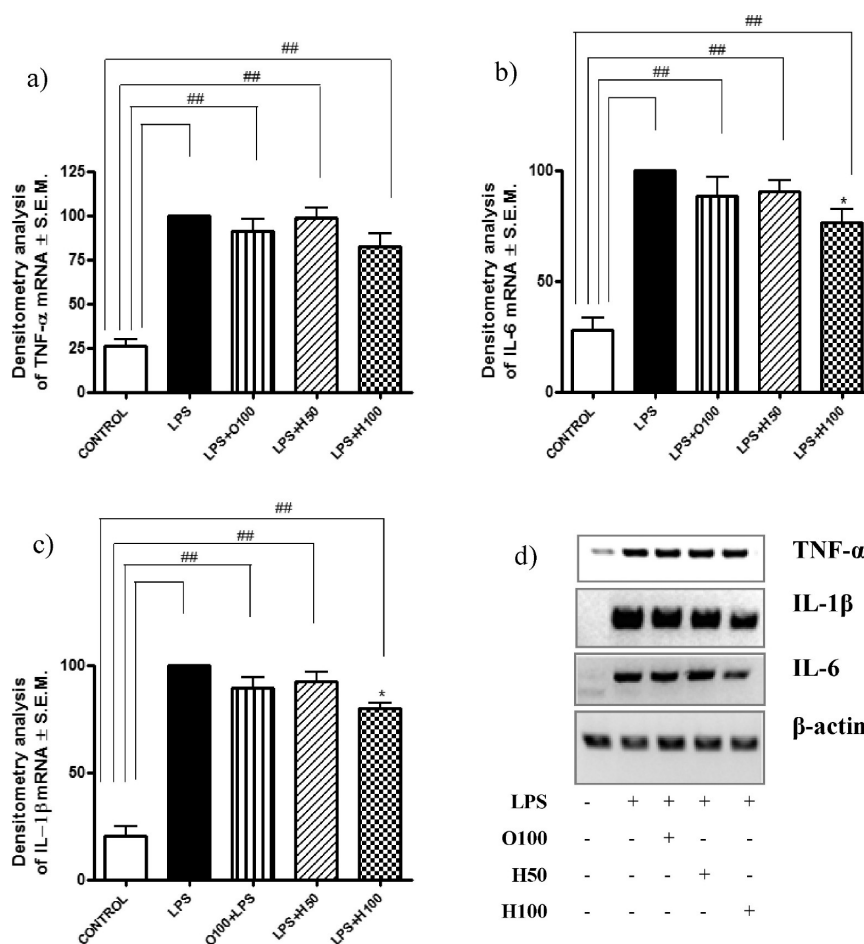


Figure 8. Effects of oleuropein and hydroxytyrosol on TNF- α (a), IL-6 (b), and IL-1 β (c) gene mRNA expression in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages from mice intraperitoneally injected with 3% thioglycolate broth 4 days before were seeded onto a 6-well plate at a density of 1.5×10^6 cells/well in DMEM. After incubation for 2 h, macrophages were treated with the vehicle (medium) or oleuropein or hydroxytyrosol (50 μ M and 100 μ M) for 1 h and then stimulated with LPS (1 μ g mL $^{-1}$) for 4 h. Following incubation, cells were collected and total RNA was extracted with the aid of RNA extraction kit. Expression of TNF- α (b), IL-6 (c), and IL-1 β (d) genes are measured using RT-PCR, determined by densitometry and normalized to β -actin content for each sample. The histograms represent the data derived from the RT-PCR following densitometry analysis and considering the control group as having 100% expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the control group; using one-way ANOVA following by Dunnett's t test ($n = 12$).

improve DSS-induced colitis and provide support for hydroxytyrosol as an anti-inflammatory agent in vitro.

Collectively, our results clearly indicate that oleuropein effectively has a protective role in the development of ulcerative colitis in a DSS model of colitis in mice. This beneficial effect is correlated with a better DAI index, a reduction of proinflammatory cytokine levels and a reduction of COX-2, iNOS and MMP-9 protein expression in the colonic tissue, at least in part, via inhibition of NF- κ B activity.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +34963543609. Fax: +34963544943. E-mail: rosa.m.giner@uv.es.

Funding

This work was supported by the Spanish Government (SAF2009-10059-C03-01 NEF).

ABBREVIATIONS USED

ADP, adenosine diphosphate; COX-2, cyclooxygenase-2; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; ERK, extracellular signal-regulated

kinase; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; IL, interleukin; PGE $_2$, prostaglandin E $_2$; TNF, tumor necrosis factor; IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis; CD, Crohn disease; DSS, dextran sulfate sodium; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MMP, matrix metalloproteinase; PBS, phosphate buffer saline; FBS, fetal bovine serum; LPS, lipopolysaccharide; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; DAI, disease activity index; NO, nitric oxide; MPO, myeloperoxidase; HTAB, hexadecyltrimethylammonium bromide; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; DTT, dithiothreitol; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; RNA, ribonucleic acid; DNA, deoxyribonucleic acid; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; ANOVA, one-way analysis of variance; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction

REFERENCES

- Andreadou, I.; Iliodromitis, E. K.; Mikros, E.; Constantinou, M.; Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A. L.; Kamber, E.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Kremastinos, D. T. The olive constituent oleuropein

exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2213–2219.

(2) El, S. N.; Karakaya, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr. Rev.* **2009**, *67*, 632–638.

(3) Vissers, M. N.; Zock, P. L.; Roodenburg, A. J.; Leenen, R.; Katan, M. B. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 409–417.

(4) Corona, G.; Tzounis, X.; AssuntaDessi, M.; Deiana, M.; Debnam, E. S.; Visioli, F.; Spencer, J. P. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radical Res.* **2006**, *40*, 647–658.

(5) Hamdi, H. K.; Castellon, R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 769–778.

(6) Visioli, F.; Poli, A.; Gall, C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 65–75.

(7) Corona, G.; Deiana, M.; Incani, A.; Vauzour, D.; Dessi, M. A.; Spencer, J. P. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *362*, 606–611.

(8) Sirianni, R.; Chimento, A.; De Luca, A.; Casaburi, I.; Rizza, P.; Onofrio, A.; Iacopetta, D.; Puoci, F.; Andò, S.; Maggolini, M.; Pezzi, V. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 833–840.

(9) Notarnicola, M.; Pisanti, S.; Tutino, V.; Bocale, D.; Rotelli, M. T.; Gentile, A.; Memeo, V.; Bifulco, M.; Perri, E.; Caruso, M. G. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 63–69.

(10) Miles, E. A.; Zoubouli, P.; Calder, P. C. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Clin. Nutr.* **2005**, *24*, 780–784.

(11) Impellizzeri, D.; Esposito, E.; Mazzon, E.; Paterniti, I.; Di Paola, R.; Bramanti, P.; Morittu, V. M.; Procopio, A.; Britti, D.; Cuzzocrea, S. The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clin. Nutr.* **2011**, *30*, 533–40.

(12) Atreya, I.; Atreya, R.; Neurath, M. F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* **2008**, *263*, 591–596.

(13) Solomon, L.; Mansor, S.; Mallon, P.; Donnelly, E.; Hoper, M.; Loughrey, M.; Kirk, S.; Gardiner, K. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comp. Clin. Pathol* **2010**, *19*, 235–239.

(14) Romier, B.; Schneider, Y. J.; Larondelle, Y.; During, A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr. Rev.* **2009**, *67*, 363–378.

(15) Andújar, I.; Recio, M. C.; Giner, R. M.; Cienfuegos-Jovellanos, E.; Laghi, S.; Muguera, B.; Ríos, J. L. 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*, 6474–6483.

(16) Mossman, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

(17) Kwon, H. S.; Oh, S. M.; Kim, J. K. Glabridin, a functional compound of liquorice, attenuates colonic inflammation in mice with dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *151*, 165–173.

(18) Billerey-Larmonier, C.; Uno, J. K.; Larmonier, N.; Midura, A. J.; Timmermann, B.; Ghishan, F. K.; Kiela, P. R. Protective effects of dietary curcumin in mouse model of chemically induced colitis are strain dependent. *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, *14*, 780–793.

(19) Kim, Y. H.; Kwon, H. S.; Kim, D. H.; Cho, H. J.; Lee, H. S.; Jun, J. G.; Park, J. H.; Kim, J. K. Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int. Immunopharmacol.* **2008**, *8*, 1695–1702.

(20) Olmos, A.; Giner, R. M.; Recio, M. C.; Ríos, J. L.; Mánñez, S. Modulation of protein tyrosine nitration and inflammatory mediators

by isoprenylhydroquinoneglucoside. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *30*, 220–228.

(21) Recio, M. C.; Giner, R. M.; Uriburu, L.; Mánñez, S.; Cerdá, M.; De la Fuente, J. R.; Ríos, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolidesesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.* **2000**, *66*, 2509–2518.

(22) Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **2008**, *22*, 659–661.

(23) Baugh, M. D.; Perry, M. J.; Hollander, A. P.; Davies, D. R.; Cross, S. S.; Lobo, A. J.; Taylor, C. J.; Evans, G. S. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1999**, *117*, 814–822.

(24) Santana, A.; Medina, C.; Paz-Cabrera, M. C.; Díaz-Gonzalez, F.; Farré, E.; Salas, A.; Radomski, M. W.; Quintero, E. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 6464–6472.

(25) Castaneda, F. E.; Walia, B.; Vijay-Kumar, M.; Patel, N. R.; Roser, S.; Kolachala, V. L.; Rojas, M.; Wang, L.; Oprea, G.; Garg, P.; Gewirtz, A. T.; Roman, J.; Merlin, D.; Sitaraman, S. V. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 1991–2008.

(26) Dell'Agli, M.; Fagnani, R.; Galli, G. V.; Maschi, O.; Gilardi, F.; Bellosta, S.; Crestani, M.; Bosisio, E.; De Fabiani, E.; Caruso, D. Olive oil phenols modulate the expression of metalloproteinase 9 in THP-1 cells by acting on nuclear factor-kappaB signaling. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2246–2252.

(27) Singh, K.; Chaturvedi, R.; Barry, D. P.; Coburn, L. A.; Asim, M.; Lewis, N. D.; Piazuolo, M. B.; Washington, M. K.; Vitek, M. P.; Wilson, K. T. The apolipoprotein E-mimetic peptide COG112 inhibits NF-kappaB signaling, proinflammatory cytokine expression, and disease activity in murine models of colitis. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3839–3850.

(28) Ishikawa, T. O.; Oshima, M.; Herschman, H. R. Cox-2 deletion in myeloid and endothelial cells, but not in epithelial cells, exacerbates murine colitis. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 417–426.

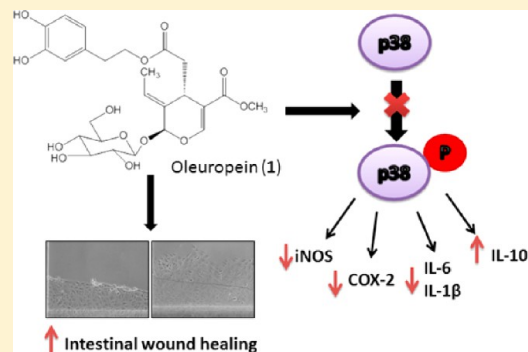
(29) Sklyarov, A. Y.; Panasyuk, N. B.; Fomenko, I. S. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J. Physiol. Pharmacol.* **2011**, *62*, 65–73.

Oleuropein Protects against Dextran Sodium Sulfate-Induced Chronic Colitis in Mice

Elisa Giner, María-Carmen Recio, José-Luis Ríos, and Rosa-María Giner*

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

ABSTRACT: The anti-inflammatory effect of oleuropein (**1**), the major phenolic secoiridoid in *Olea europaea*, was evaluated in an experimental model of chronic colitis in mice. Animals were exposed to four repeated cycles of dextran sodium sulfate in drinking water followed by a 7-day rest period. Animals receiving a standard diet supplemented with 0.25% of **1** (equivalent to 500 mg/kg/day) for 56 days exhibited a decrease of inflammatory symptoms, as reflected by improvement of disease activity index and histopathological changes. It was found that **1** decreased inflammatory cell recruitment and the release of inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-6 with increased IL-10 levels in colon tissue. Colon expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase was reduced significantly by **1**. The anti-inflammatory molecular mechanism of **1** was associated with the suppression of the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and might be mediated by up-regulation of annexin A1. In addition, **1** ameliorated intestinal wound healing in IEC-18 monolayers. Therefore, oleuropein seems to be a promising active molecule in experimental ulcerative colitis.



Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are considered to be the principal inflammatory disorders included under the general category of inflammatory bowel disease (IBD). Although its exact etiology is unknown, genetic and environmental factors, an abnormal immune response, and the contribution of intestinal microflora seem to be essential for the development of IBD. Management of the disease involves pharmacological therapies (anti-inflammatory drugs, antibiotics, and other biologic agents) or even surgery in critical patients. Since the symptoms of the disease greatly diminish the quality of life for IBD patients and increase their risk for colorectal cancer, the prevention and treatment of IBD is of crucial importance. Unfortunately, the various treatments shown to ameliorate the symptoms of the disease to date are associated with many negative side effects; moreover, not all patients are responsive to therapy.¹

In order to study the efficacy of therapeutic drugs against IBD, several animal models for intestinal inflammation have been developed. One such model uses the polysaccharide dextran sodium sulfate (DSS) to produce colonic lesions with histopathological characteristics that mimic IBD in humans. Repeated cycles of DSS induce chronic inflammation in the intestine, producing histological changes (including crypt loss) and perpetuating inflammation. Each cycle includes a phase in which animals are administered DSS, which causes acute IBD injury with crypt loss and ulceration, followed by a recovery phase in which animals are given drinking water alone. During this phase, mucosal regeneration acts to repair the intestinal damage. However, after several exposures to DSS, the intestinal repair mechanisms are destabilized and the mucosa begins to show irregular epithelial structure.² This compromises the

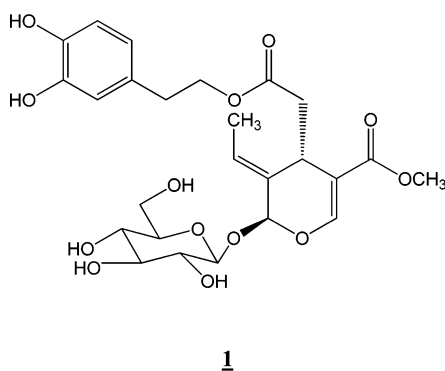
correct functioning of intestinal mucosa and allows the entry of harmful substances, thus enhancing the immunological response and aggravating the situation.³

A growing body of evidence indicates that dietary phenols can modulate intestinal inflammation, which makes these compounds promising candidates for natural preventive/protective treatments against IBD. The oil, fruits, and leaves of the olive tree (*Olea europaea* L., Oleaceae), for example, have been recognized as healthy constituents of the diet due to their phenolic content. Oleuropein (**1**), the main phenolic secoiridoid from the olive tree, has been shown to possess antioxidant, antiatherosclerotic, and anti-inflammatory properties.^{4–6} In a previous study, our group has demonstrated the protective role of **1** in a model of acute DSS-induced colitis in mice. This compound was shown to lower the disease activity index (DAI) and to reduce pro-inflammatory cytokine levels, and also those of cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in colon tissue, partly through inhibition of nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) activity.⁷ These results led us to hypothesize that **1** may also protect against chronic inflammation. Thus, the present investigation has been undertaken to evaluate the possible effect of **1** in a model of chronic DSS-induced colitis in mice with the aid of macroscopic and histological analyses, to determine the key pro-inflammatory mediators involved in IBD development, and to demonstrate the effect of **1** on different signaling pathways. It was also tested whether **1** promotes the healing of mechanical

Received: March 1, 2013

Published: June 12, 2013

injury to intestinal epithelial cell (IEC-18) monolayers and its implication for the model.



RESULTS AND DISCUSSION

Oleuropein (1) Ameliorates DSS-Induced Chronic Colitis. Administration of a standard diet supplemented with 0.25% of **1** (equivalent to 500 mg/kg/day) for 56 days did not affect the viability of C57BL/6 mice. Treatment with **1** attenuated the severity of progressive chronic injury induced by four DSS cycles, each of which involved 7 days of exposure to this agent followed by a 7-day rest period. Animals exposed to four repeated cycles of DSS in drinking water developed symptoms of chronic colitis without mortality. Symptoms included body weight loss, diarrhea, rectal bleeding, and increased colon wet weight due to edema, in comparison with mice receiving regular drinking water (control). The weight/length (mg/cm) ratio, an important indicator of colon inflammation, was increased in DSS-treated mice, with treatment with **1** reducing this ratio significantly (Figure 1a). However, **1** was only mildly effective in preventing body weight loss, which may partly be attributable to the scant difference between DSS-treated animals and the control group (data not shown). Compound **1** also led to clinical improvement of DSS-induced colitis, as reflected in the DAI and the histological disease score. Overall, the DAI, an indicator of the severity of intestinal inflammation, which was 0 in control mice, was significantly lower in mice treated with **1** than in untreated mice (Figure 1b).

Histological analysis of the samples from the DSS-treated mice showed typical inflammatory changes in colon architecture, including mucosal ulceration, crypt damage, edema, and cell infiltration into mucosal tissue. Compound **1** exhibited a clinical improvement of DSS-induced colitis, as reflected in the DAI and

the histological disease score. Colon tissue sections from mice fed with **1** exhibited far fewer infiltrating cells, a significantly lower degree of mucosal injury, and less edema (Figure 2).

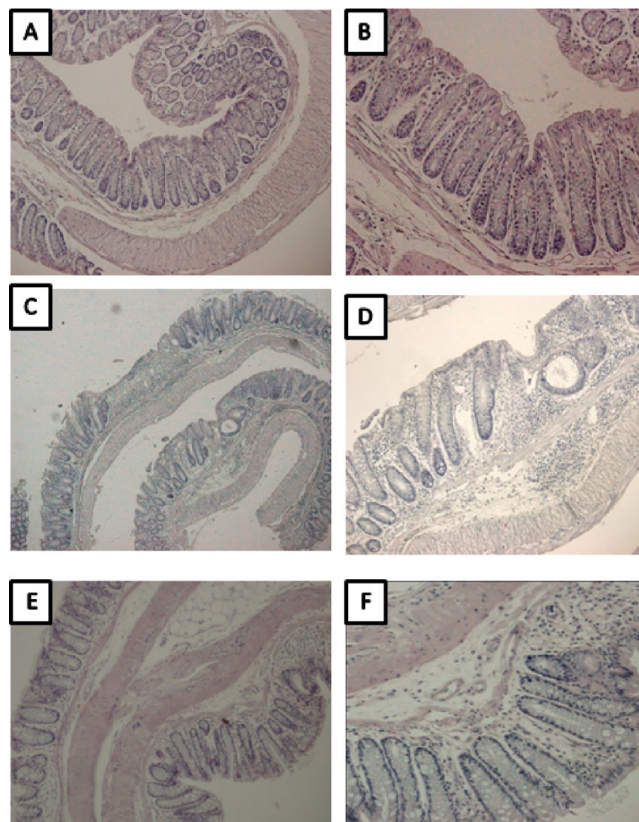
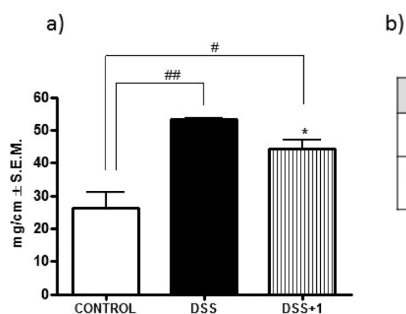


Figure 2. Effects of oleuropein (**1**) on histological manifestation in DSS-induced chronic colitis in mice. Hematoxylin and eosin staining images of representative colons are shown at magnifications of 100 \times and 200 \times . (A and B) Control group, (C and D) DSS group, (E and F) DSS+1 group.

Oleuropein (1) Reduced Cell Infiltration in DSS-Induced Chronic Colitis. During mucosal inflammation, a complex array of inflammatory signaling involving prostaglandins and cytokine production impairs intestinal epithelial function and leads to the recruitment of inflammatory cells to the site of injury. Neutrophil, macrophage, and eosinophil infiltration is thus augmented in DSS-treated mice.^{8,9} In the present study, whereas



b)

group	rectal bleeding	stool consistency	DAI score
DSS	1.40 \pm 0.01	1.57 \pm 0.20	1.00 \pm 0.13
DSS+1	0.10 \pm 0.01**	1.40 \pm 0.24*	0.47 \pm 0.08**

Figure 1. Effects of oleuropein (**1**) in DSS-induced chronic colitis in mice. Colitis was induced by drinking four cycles of DSS-water consisting of 1% or 2% DSS for 1 week followed by 7 days of water. Mice were sacrificed at day 56, and colons were harvested. (a) Weight/length ratio in each group measured at the end of the experiment. (b) DAI scored at day 56 using the following parameters: rectal bleeding and stool consistency. Each bar chart shows the mean \pm SEM for at least four independent experiments ($n = 10$ animals) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from the DSS group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA followed by Dunnett's t test).

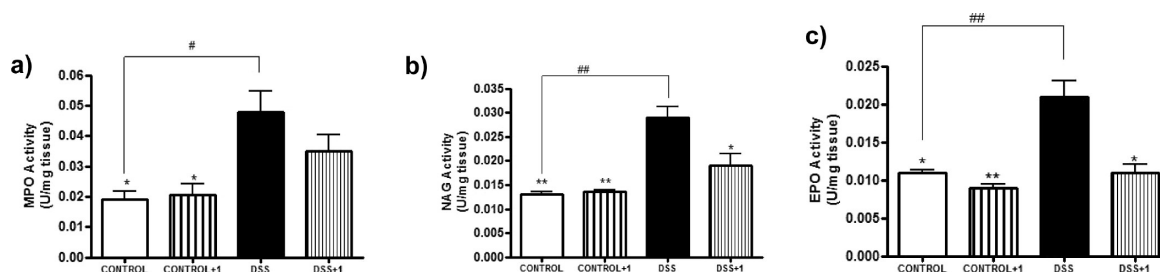


Figure 3. Effects of oleuropein (**1**) on MPO, NAG, and EPO activity in DSS-induced chronic colitis in mice. Mice were sacrificed at day 56, and colon tissues were powdered in a mortar with liquid nitrogen. (a) MPO, (b) NAG, and (c) EPO activity was determined by a spectrophotometric method and expressed as the amount of enzyme necessary to produce a change in absorbance of 1.0 unit/mg of tissue. Each bar chart represents the mean \pm SEM for at least three independent experiments ($n = 7$ animals) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from the DSS group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA followed by Dunnett's t test).

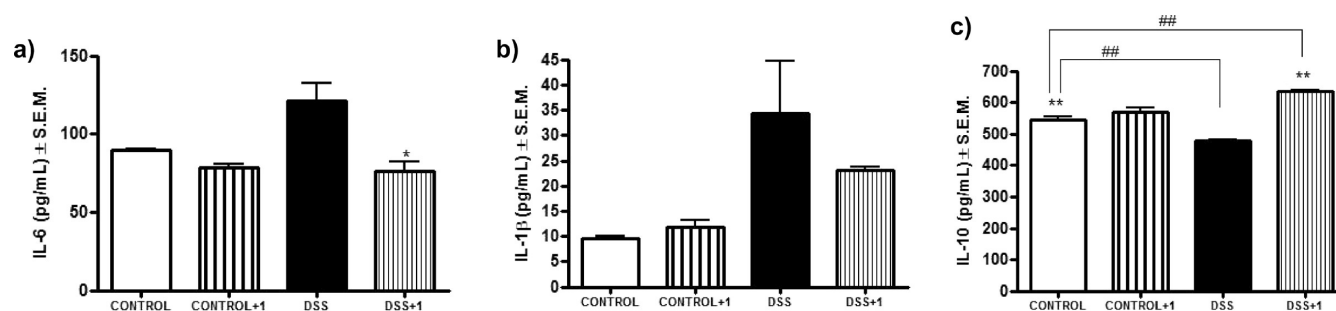


Figure 4. Effects of oleuropein (**1**) on IL-6, IL-1 β , and IL-10 levels in DSS-induced chronic colitis in mice. Mice were sacrificed at day 56, and colon tissues were powdered in a mortar with liquid nitrogen. The cytokine levels in colon homogenates were determined by ELISA. The amount of cytokines was expressed as pg/mL per mg of protein. (a) IL-6 levels. (b) IL-1 β levels. (c) IL-10 levels. Each bar chart represents the mean \pm SEM for at least three independent experiments ($n = 7$ animals) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from the DSS group; ## $p < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA followed by Dunnett's t test).

increases in myeloperoxidase (MPO), *N*-acetylglucosaminidase (NAG), and eosinophil peroxidase (EPO) activity were observed in the colon tissue of DSS-treated mice, treatment with **1** reduced neutrophil, macrophage, and eosinophil accumulation in colon tissue, with reductions of 36%, 42%, and 46%, respectively, with regard to DSS mice, as shown in Figure 3. Treatment with **1** alone had no effect.

Oleuropein (**1**) Reduced Interleukin (IL)-6 and IL-1 β Production and Augmented IL-10 Levels in Colon Tissue.

After 56 days of the experiment, IL-6 and IL-1 β levels in colon tissue increased markedly in DSS-treated mice in comparison with the control group. Treatment with **1** significantly inhibited IL-6 (Figure 4a) and IL-1 β (Figure 4b) production by 37% and 25%, respectively, with respect to mice given DSS alone. IL-6 is a pro-inflammatory cytokine that plays a critical role in the development of IBD. It is produced mainly in mucosal T cells and macrophages, with elevated serum levels being detected in both acute and chronic inflammation. It has been demonstrated that IL-6 expression induces cell resistance to apoptosis in UC patients, thus contributing to chronic inflammation.¹⁰ Moreover, because the blockade of IL-6 attenuates colitis-associated symptoms in DSS-treated mice, interfering with the IL-6 cascade could be a promising approach for treating chronic intestinal inflammation.

High levels of IL-1 β in the colon are correlated with disease activity and associated with active lesions, suggesting a pivotal role for this cytokine in the initiation and amplification of the intestinal inflammatory response. Numerous studies have shown improvements in inflammation and intestinal injury in acute models when mice were treated with IL-1 blocking agents.^{11,12} Coccia et al.,¹³ who demonstrated that IL-1 β activates the CD4⁺

T cell response in a model of chronic colitis, have proposed that IL-1 β may also participate in chronic intestinal inflammation.

In the present study, IL-10 levels in the colon tissue of DSS-treated mice were lower than those in control mice; administration of **1** increased these levels significantly by 34% (Figure 4c). IL-10 is an anti-inflammatory cytokine produced mainly by regulatory T cells, which comprises a type of immunosuppressive cells. IL-10 plays a pivotal role in the resolution of inflammation by reducing the expression of other pro-inflammatory mediators, thereby attenuating mucosal inflammation.¹⁴ Kühn et al.¹⁵ demonstrated that IL-10-deficient mice develop spontaneous intestinal inflammation, which is indicative of the critical role played by IL-10 within the mucosal immune system.

Compound **1** thus seems to modulate inflammatory cell activation and migration, consequently reducing colon cytokine production. A marked reduction was observed in both IL-1 β and IL-6 levels, which was accompanied by an increase in IL-10 levels. This resulted in an improvement of inflammatory symptoms.

Oleuropein (1**) Decreased COX-2 and iNOS Expression in DSS-Induced Chronic Colitis.** A key factor in the modulation of the intestinal immune system is the perfect relation between pro-inflammatory and anti-inflammatory protein expression, with the loss of this balance contributing to inflammatory cascade in the pathological process of colitis.¹⁶ Indeed, COX-2 is known to be overexpressed in the colonic epithelium of UC patients.¹⁷ Different studies have demonstrated an important role for COX-2 and iNOS in mediating the prolonged epithelial secretory and barrier dysfunction that contributes to colonic inflammation in mice.^{18,19} In this study, Western blot analyses of colon tissue from the DSS group showed a marked increase in the expression of COX-2 (Figure 5a) and

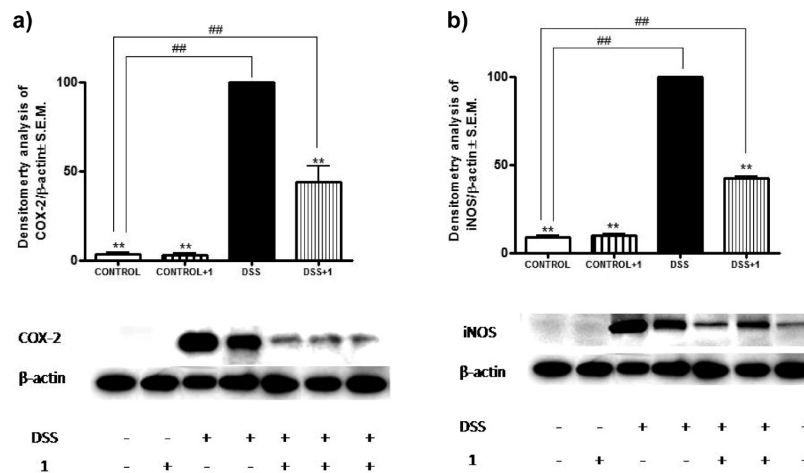


Figure 5. Effects of oleuropein (**1**) on COX-2 and iNOS expression in DSS-induced chronic colitis in mice. Mice were sacrificed at day 56, colon tissues were powdered in a mortar with liquid nitrogen, and tissue proteins were extracted. A (a) COX-2 and (b) iNOS representative Western blot of each experiment is shown. The expressions of COX-2 and iNOS were determined by densitometry analysis and normalized to β -actin content for each sample. The histograms represent the data derived from the Western blots considering the DSS group as having 100% expression [$**p < 0.01$, significantly different from the DSS group; $###p < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA followed by Dunnett's t test ($n = 7$)].

iNOS (Figure 5b), with **1** significantly down-regulating the expression of both proteins by 68% and 58%, respectively. It should be noted that these key inflammatory proteins are regulated by different signaling pathways.

Oleuropein (1) Reduced Phosphorylation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK). Mammals express multiple MAPK pathways, the majority of which are, along with the NF- κ B pathway, activated by stress and inflammatory stimuli.²⁰ These pathways represent important targets for novel anti-inflammatory drugs. Both p38 MAPK and NF- κ B have been found to be activated dramatically during the development of colitis,²¹ while the increased activity of the p38 MAPK signaling pathway has been demonstrated in UC patients.²² Activation of p38 MAPK induces not only the recruitment of lymphocytes and neutrophils but also the release of IL-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF)- α by macrophages and of numerous pro-inflammatory mediators by intestinal epithelium. Cytokines can activate the pathway, forming a suitable cycle for IBD development. Under these conditions, inflammation becomes chronic and unresolved. The present data indicate that phosphorylated p38 was up-regulated in DSS-treated mice, but that it was strongly down-regulated (by up to 65%) through treatment with **1** (Figure 6). Our results differ somewhat from these findings. Thus, while treatment with **1** played a protective role in the acute model of colitis in mice, partly via inhibition of NF- κ B activity,⁷ the compound had no effect on this pathway in the chronic process (data not shown). NF- κ B is a critical regulator of inflammation, with environmental milieu and cell type influencing the balance between NF- κ B-dependent pro- and anti-inflammatory gene expressions.²³ NF- κ B itself induces genes that limit the duration and magnitude of the inflammatory response.²⁴ Different studies suggest NF- κ B can have anti-inflammatory effects by directly inhibiting expression of pro-inflammatory genes and by manipulating the expression or activity of anti-inflammatory cytokines such as IL-10.²⁵ It has been reported that IL-10 plays a central role in the suppression of lower bowel inflammation in mice.²⁶ Our results, however, suggest that oleuropein does not interfere with the activation of NF- κ B transcription factor in the resolution of chronic inflammatory conditions. Although activation of p50:p65 is linked

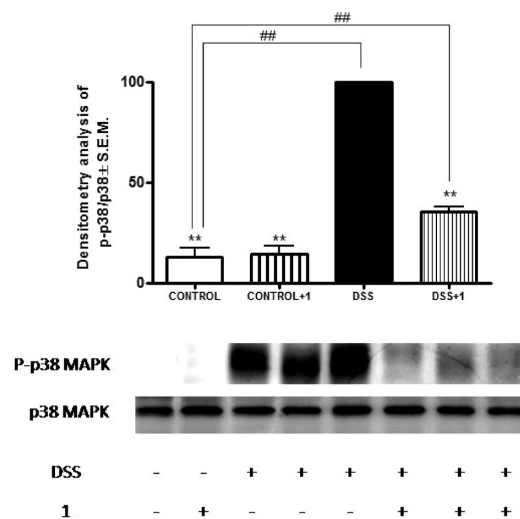


Figure 6. Effect of oleuropein (**1**) on phosphorylation of p38 MAPK on DSS-induced chronic colitis in mice. Mice were sacrificed at day 56, colon tissues were powdered in a mortar with liquid nitrogen, and cytosolic proteins were extracted. A representative Western blot of the experiment is shown. The phosphorylation of p38 MAPK is determined by densitometry analysis and normalized to p38 MAPK content for each sample. The histograms represent the data derived from the Western blots considering the DSS group as having 100% expression [$**p < 0.01$, significantly different from the DSS group; $###p < 0.01$, significantly different between the control group and the group treated; using one-way ANOVA followed by Dunnett's t test ($n = 7$)].

with promoting inflammation, it is emerging that the different subunits of NF- κ B may serve as active repressors of inflammation. Interestingly, it has been demonstrated that p65 and IKK protect against apoptosis and tissue damage, thereby maintaining normal tissue homeostasis.²⁴

Oleuropein Reduced p38 MAPK Phosphorylation and COX-2 Expression in Intestinal Epithelial Cells IEC-18. As shown in Figure 7a, lipopolysaccharide (LPS) stimulation increased COX-2 expression in IEC-18 cells. Treatment with SB 203580 at 10 μ M reduced by 70% COX-2 levels, and **1** at

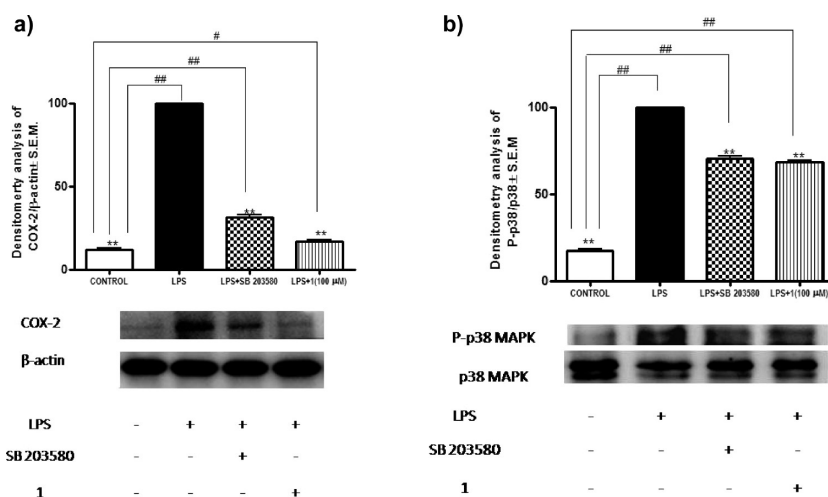


Figure 7. Effect of oleuropein (**1**) on COX-2 expression and phosphorylation of p38 MAPK in IEC-18 cells. Cells were seeded onto a six-well plate at a density of 2.5×10^5 cells/mL DMEM. After 24 h, cells were treated with SB 203580 (10 μ M) and **1** (100 μ M), and 1 h later, they were stimulated by LPS (1 μ g/mL) for 30 min to determine p38 MAPK phosphorylation and 24 h for COX-2 expression. A representative Western blot of both is shown. (a) COX-2 expression was determined by densitometry and normalized to β -actin content of each sample. (b) Phosphorylation of p38 MAPK was determined by densitometry and normalized to the p38 MAPK content of each sample. The histograms represent the data derived from the Western blots considering the LPS group as having 100% expression. Each bar represents the mean \pm SEM for at least three independent experiments ($n = 6$) (** $p < 0.01$, significantly different from the LPS group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, significantly different from the control group; using ANOVA followed by Dunnett's t test).

100 μ M produced a similar effect (83% of inhibition). An activation of the p38 MAPK pathway at 30 min of LPS stimulation was also observed, which was partially prevented when cells were treated with SB 203580 at 10 μ M. In this experimental condition, compound **1** showed a moderate blockade of phosphorylation, acting like the p38 MAPK inhibitor (Figure 7b). These results suggest that **1** reduces COX-2 levels, in part, due to the inhibition of this signaling pathway. However, further studies are necessary to determine the exact mechanism of action of **1**.

Oleuropein (1) Up-regulated Annexin A1 mRNA Expression in Colon Tissue. Annexin A1 is a calcium-dependent phospholipid binding protein and an endogenous mediator of glucocorticoid signaling with potent anti-inflammatory activity. It is expressed by a variety of cell types, including epithelial cells. Under resting conditions, annexin A1 is generally found in the cytoplasm; however, after cell activation it is mobilized to the cell surface and secreted.²⁷ This protein is able to block the release of inflammatory mediators by directly inhibiting not only cytosolic phospholipase A2 but also the expression of COX-2 and iNOS.²⁸ In a model of DSS-induced colitis, annexin A1-deficient animals showed increased susceptibility with a greater extent of clinical and histopathological mucosal injury. In this context, the effect of **1** was investigated on annexin A1 expression in the colon mucosa. The results showed clearly that after 56 days annexin A1 mRNA levels in colon tissue were not affected by **1**, although they were reduced in DSS-treated mice in comparison with the control group. These same levels were increased significantly by 46-fold after treatment with **1**, with respect to the DSS-treated mice (Figure 8). These data are in agreement with those obtained for propofol, which exerts its anti-inflammatory activity by inhibiting the activation of p38 through up-regulation of annexin A1 expression.²⁹ Moreover, Yang et al.³⁰ reported that annexin A1 is an endogenous inhibitory regulator of MAPK activation and IL-6 expression. In our study, treatment with **1** reduced the release of IL-6 and significantly inhibited phosphorylation of p38 MAPK, which has been described as a key regulator of the expression of inflammatory cytokines. These effects were

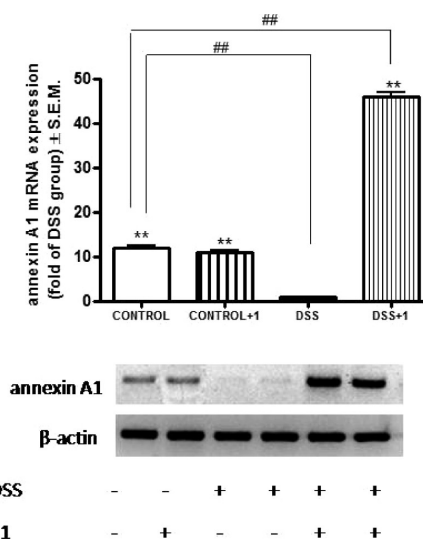


Figure 8. Effects of oleuropein (**1**) on annexin A1 mRNA gene expression on DSS-induced chronic colitis in mice. Mice were sacrificed at day 56, colon tissues were powdered in a mortar with liquid nitrogen, and total RNA was extracted with the aid of an RNA extraction kit. Annexin A1 gene expression was assessed by RT-PCR, determined by densitometry analysis and normalized to β -actin content for each sample [*** $p < 0.01$, significantly different from the DSS group; ## $p < 0.01$, significantly different between the control group and the group treated; using one-way ANOVA followed by Dunnett's t test ($n = 7$)].

accompanied by an increase of annexin A1 mRNA expression. It can thus be speculated that **1** affects the phosphorylation of p38 via activation of annexin A1. Further investigations should be carried out to demonstrate whether the inhibitory effect of **1** on phosphorylation of p38 is directly dependent on up-regulation of annexin A1.

Oleuropein (1) Enhances Wound Healing in Intestinal Epithelial Cell (IEC)-18 Monolayers. A key factor in IB improvement is normal epithelial restoration, a fact highlighting

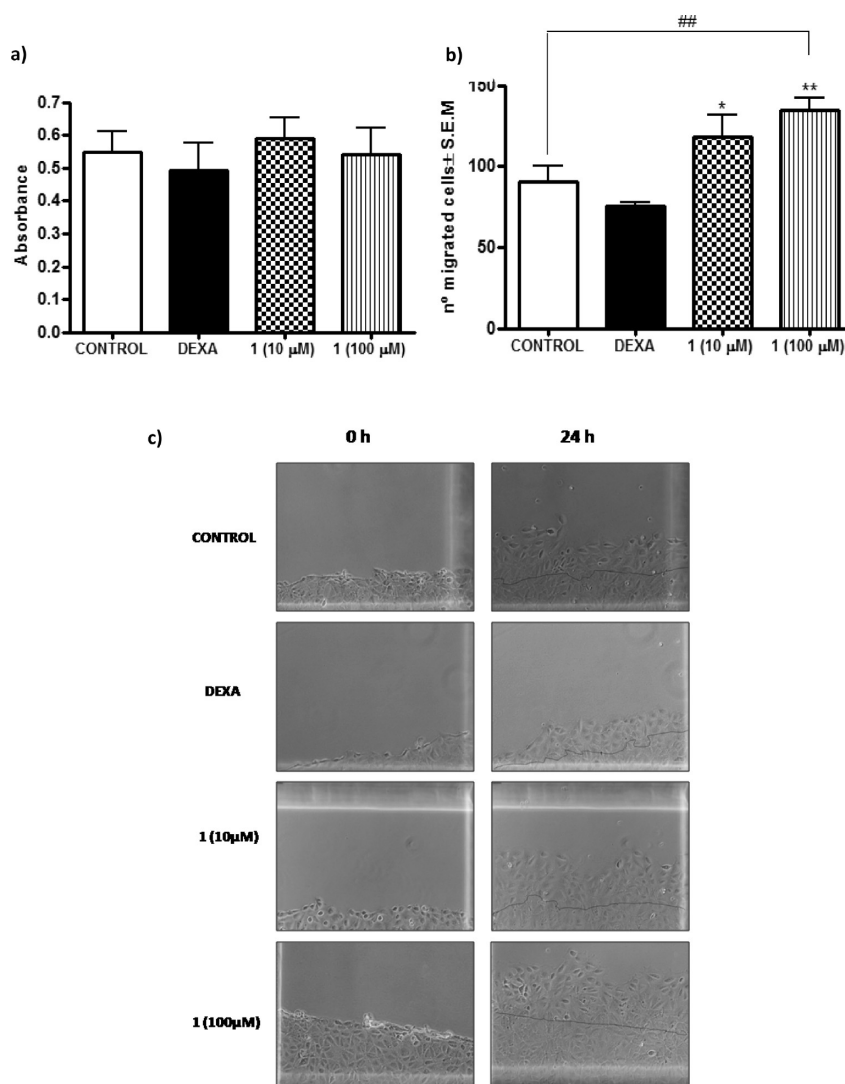


Figure 9. Effects of oleuropein (**1**) on proliferation and wound healing in IEC-18 cells. (a) Proliferation assay. Cells were seeded onto a 96-microwell plate at a density of 2.5×10^5 cells/mL in DMEM. After 24 h, cells were treated with dexamethasone ($10 \mu\text{M}$) and **1** (10 and $100 \mu\text{M}$) and cell proliferation was assayed by using a MTT assay at 24 h. (b, c) Wound-healing-induced migration assay. Cells were seeded onto TC DISH 60x15 SI plates at a density of 2.5×10^5 cells/mL in DMEM. After 24 h, wounding was performed in confluent cells with a scraper and cells were treated with dexamethasone ($10 \mu\text{M}$) and **1** (10 and $100 \mu\text{M}$). Migration was assessed in a blinded fashion by determination of the number of IEC-18 cells observed across the wound border from the initial time (0 h) to 24 h in a defined wound area. Each bar chart represents the mean \pm SEM for at least three independent experiments ($n = 10$) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from the dexamethasone group; ## $p < 0.01$, significantly different between the control group and the groups treated; using one-way ANOVA followed by Dunnett's t test).

the need to develop therapeutic options that can aid in intestinal repair following IBD-induced injury.¹ Continuous injury to the intestinal mucosa gives rise to the formation of ulcers and destruction of the epithelial barrier, thus compromising the natural function of the mucosa. Furthermore, treatment with corticoids can complicate normal intestinal ulcer healing by reducing the migration of epithelial cells and delaying the healing process. After confirming with the aid of a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay that **1** and dexamethasone (DEXA) did not induce cell proliferation (Figure 9a), the effects of DEXA and different concentrations of **1** were assessed in a wound-healing assay using IEC-18 cells. While DEXA reduced the migration of intestinal epithelial cells by 20% with respect to the control, both 10 and $100 \mu\text{M}$ **1** exhibited a positive effect on wound-induced healing migration, enhancing wound closure by 57% and 80%, respectively, as compared to dexamethasone (Figure 9b). This effect may be mediated by annexin A1, which demonstrated a protective and reparative role

in intestinal mucosal epithelium.³¹ Further experiments need to be undertaken to investigate this effect.

In summary, on the basis of the results described above, the present study clearly indicates that oleuropein (**1**) is effective in alleviating the symptoms of DSS-induced chronic colitis. It increases gene expression of annexin A1 while significantly down-regulating COX-2 and iNOS proteins and reducing the release of inflammatory cytokines. It is likely that the anti-inflammatory molecular mechanism of **1** is associated with the suppression of p38 MAPK phosphorylation, which may be mediated by up-regulation of annexin A1. In conclusion, oleuropein (**1**) could prove to be an effective treatment against ulcerative colitis.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Unless otherwise specified, all chemicals and biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Baker (Deventer, Holland). Oleuropein (**1**)

was purchased from Sigma-Aldrich and was $\geq 98.0\%$ pure as determined by HPLC. Dextran sodium sulfate (36–50 kD) was purchased from MP Biomedical (France). Specific antibodies for β -actin were also obtained from Sigma-Aldrich, antibodies recognizing iNOS, COX-2, and p38 MAPK were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA), and P-p38 MAPK was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Annexin A1 primers were generously donated by T. Montero and M. Perretti, Centre for Biochemical Pharmacology, William Harvey Research Institute, London, UK. ELISA kits for cytokines were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA).

Animals. All animal care and experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Valencia, Spain (No. 108 A1233134999884, 28-01-2009). Female C57BL/6 mice (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain), 6–8 weeks of age weighing 18–20 g, were acclimatized under a 12 h light/dark cycle at 22 °C and 60% humidity for 7 days before the experiments and fed with a standard laboratory rodent diet and water ad libitum.

Induction of Chronic DSS Colitis and Treatment. Mice were randomized (7–10 animals in each group) to receive four cycles of DSS (1% DSS during the first and second cycle followed by 2% DSS during the third and fourth cycle). Each cycle consisted of 7 days of DSS in drinking water followed by 7 days of water without DSS.³² The animals were assigned randomly to one of four treatment groups: control (mice received drinking water and control diet), control + 1 (mice received drinking water and diet supplemented with 0.25% of 1), DSS group (mice received DSS in drinking water and control diet), DSS + 1 group (mice received DSS in drinking water and diet supplemented with 0.25% of 1). The diet was prepared as described previously,³³ by mixing powdered food with product (0.25% of 1, final content in the diet). When it was completely homogenized, water (0.65 mL/g of diet) and microwave-melted agar (0.2% final content in the diet) were added and mixed. The food was dried for 24 h and divided into portions based on an estimated consumption of 4 g of dry matter/mouse/day. Mice were sacrificed at day 56 by cervical dislocation, and their colons were removed. Three colon samples were prepared for histological analysis as described later; the remainder were rinsed with cold PBS, blotted dry, and weighed and their lengths 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 was used to assess the severity of colitis (Table 1). Three times a week, mice were checked by monitoring

Table 1. DAI Scoring

score	percentage of weight loss (%)	stool consistency	rectal bleeding
0	none	normal	none
1	1–5		
2	6–10	loose stools	
3	11–15		
4	>15	diarrhea	fecal blood +

body weight. At the end of the experiment, stool consistency (presence of diarrhea) and gross rectal bleeding (measured by visible fecal blood and macroscopic examination of the anus) were evaluated.

Histological Analysis. Colons were cut along the vertical axis and rolled up in a spiral starting from the distal (duodenal) margin. Then, they were fixed in 4% buffered formaldehyde, paraffin embedded, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. Eight randomly selected fields (magnification 100 \times and 200 \times) in each section were observed and graded as above in a blinded fashion by an expert pathologist.

IL-6, IL-1 β , and IL-10 Production. The colons were thawed, ground to a powder in a mortar, weighed, suspended (20% w/v) in PBS containing 0.1% Nonidet NP-40 buffer, homogenized, sonicated for 30 s, and centrifuged at 20000g for 10 min at 4 °C. Supernatants were collected, and IL-6, IL-1 β , and IL-10 concentrations were measured by use of specific enzyme immunoassay kits, used according to the manufacturer's instructions. The amounts of cytokines determined were expressed as pg/mL per mg protein.

RNA Extraction and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The colons were thawed, ground to a powder in a mortar, and weighed, and the total RNA was extracted with the aid of RNeasy mini spin (50) columns (Qiagen, Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. The concentration of the 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. Aliquots of 500 ng of RNA were transformed to first-strand cDNA (cDNA), and 1 μ L of the resulting cDNA was mixed with 12.5 μ L of Red Taq mix and 1 μ L of annexin A1 primers and diluted to 25 μ L with RNase-free water. The thermocycler 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 25 cycles, followed by an elongation temperature of 72 °C for 10 min. After the reaction was completed, the amplified product was removed from the tubes and run on 2% agarose gel.

Determination of Neutrophil, Eosinophil, and Macrophage Infiltration in Colon Tissue. Tissue samples were homogenized in 80 mM sodium phosphate buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma). Then, the samples were sonicated and centrifuged at 11268g for 20 min at 4 °C and stored at -80 °C. For myeloperoxidase (MPO), the procedure was performed in a 96-well plate, by adding 30 μ L of the supernatant of each sample, 100 μ L of PBS, 85 μ L of sodium phosphate buffer 0.22 M (pH 5.4), and 15 μ L of H₂O₂ 0.017%. The reaction started when 20 μ L of 18.4 mM tetramethylbenzidine dissolved in 8% dimethylformamide was added and stored at 37 °C for 3 min. After incorporating 30 μ L of 1.46 M sodium acetate (pH 3) on ice, the reaction was stopped. For eosinophil peroxidase (EPO), 50 μ L of supernatant, 100 μ L of 1.5 mM *o*-phenylenediamine, and 6.6 mM H₂O₂ dissolved in Tris-HCl (pH 8) were added to a 96-well plate. After 2 min at room temperature, the reaction was stopped by adding 75 μ L of 50 mM citric acid (pH 4.5). *N*-Acetylglucosaminidase (NAG) was determined using 50 μ L of supernatant and 100 μ L of 2.25 mM 4-nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide dissolved in 50 mM sodium acetate buffer. The assay was kept at 37 °C for 5 min, and addition of 0.2 M Na₂CO₃ was used to stop the reaction. The absorbance was measured spectrophotometrically at 630 nm for MPO, 490 nm for EPO, and 405 nm for NAG.⁸

Cytosolic Protein Extraction. Proteins from powdered tissue samples were extracted by using buffer A, containing 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, and 1 μ g/mL pepstatin (pH 7.9). Then, samples were sonicated and 0.5% Nonidet NP-40 solution was added and carried on ice for 45 min. The lysates were centrifuged at 2500g for 10 min at 4 °C, and the supernatants, corresponding to the cytosolic fraction, were collected and stored at -80 °C. The protein concentration of samples was determined by Bradford's method.³⁴

Western Blot Analysis. Equal amounts of protein (25 μ g) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, Little Chalfont, England, UK). The membranes were then blocked with PBS–0.05% Tween 20 containing 6% w/v defatted milk for 2 h. For COX-2, iNOS, p38, and P-p38, the membranes were incubated with the respective polyclonal antibodies (1:1000 dilution); for β -actin, the membranes were incubated with anti- β -actin polyclonal antibody (1:12 000 dilution). The blots were washed and incubated with peroxidase-conjugate anti-rabbit, anti-mouse, or anti-goat immunoglobulin G (1/20 000) (Cayman). Finally, the immunoreactive bands were visualized with the aid of an enhanced chemiluminescence system (Millipore). To unify Western blot densitometry to result in the processed images, data from the DSS group were taken as reference and assigned the value 100. Relative percentages of the other groups were then calculated and represented graphically.

Proliferation Assay. The IEC-18 rat epithelial cell line was used between passages 18 and 22. Cells were seeded onto a 96-microwell plate at a density of 2.5×10^5 cells/mL in DMEM 4.5 g/L glucose supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) and then cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After 24 h, the

medium was substituted by DMEM 4.5 g/L glucose supplemented with 0.5% FBS, and cells were treated with dexamethasone (10 μ M) and **1** (10 and 100 μ M). Cellular proliferation was determined by MTT assay³⁴ at 24 h.

Cell Treatment. IEC-18 cells were seeded onto six-well plates at a density of 2.5×10^5 cells/mL DMEM 4.5 g/L glucose supplemented with 5% FBS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) and then cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. At 24 h, the medium was substituted by DMEM 4.5 g/L glucose supplemented with 0.5% FBS. Cells were treated with the p38 MAPK inhibitor SB 203580 (10 μ M) and **1** (100 μ M). After 1 h, cells were stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 30 min and 24 h to determine p38 MAPK phosphorylation and COX-2 expression, respectively.

Wound-Healing Assay. IEC-18 cells were seeded onto TC DISH 60x15 SI plates at a density of 2.5×10^5 cells/mL in DMEM 4.5 g/L glucose supplemented with 5% FBS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) and then cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After 24 h, the medium was substituted by DMEM 4.5 g/L glucose supplemented with 0.5% FBS, wounding was performed in confluent cells with a scraper (Sarstedt Inc, Newton, NC, USA), and cells were treated with dexamethasone (10 μ M) and **1** (10 and 100 μ M). Migration was assessed in a blinded fashion by determination of the number of IEC-18 cells observed across the wound border from the initial time (0 h) to 24 h in a defined wound area by taking photomicrographs at 200-fold magnification using a Nikon Eclipse TE2000-S inverted microscope with a Nikon F-601 camera. Quantification of cells was assessed by Image software.³⁵

Statistical Analysis. The results are expressed as means \pm standard error values. Statistical significance was determined with a one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's *t*-test for multiple comparisons.

Software. Images for Western blot 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).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +34963543609. Fax: +34963544943. E-mail: rosa.m.giner@uv.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Spanish government (MICIIN and FEDER, grant SAF2009-10059-CO3-01) for financial support. E.G. thanks the Universitat de València for her fellowship (Atracció al Talent, VLC Campus). The authors want to express their acknowledgement to Prof. M. Cerdá-Nicolás for his help with the histological analysis.

REFERENCES

- (1) Rose, W. A., II; Sakamoto, K.; Leifer, C. A. *BMC Immunol.* **2012**, *13*, 41.
- (2) Clapper, M. L.; Cooper, H. S.; Chang, W. C. *Acta Pharmacol. Sin.* **2007**, *28*, 1450–1459.
- (3) Reuter, K. C.; Loitsch, S. M.; Dignass, A. U.; Steinhilber, D.; Stein, J. *PLoS One* **2012**, *7*, e29756.
- (4) Impellizzeri, D.; Esposito, E.; Mazzon, E.; Paterniti, I.; Di Paola, R.; Bramanti, P.; Morittu, V. M.; Procopio, A.; Britti, D.; Cuzzocrea, S. *Clin. Nutr.* **2011**, *30*, 533–540.
- (5) Impellizzeri, D.; Esposito, E.; Mazzon, E.; Paterniti, I.; Di Paola, R.; Morittu, V. M.; Procopio, A.; Britti, D.; Cuzzocrea, S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *339*, 859–869.
- (6) Impellizzeri, D.; Esposito, E.; Mazzon, E.; Paterniti, I.; Di Paola, R.; Bramanti, P.; Morittu, V. M.; Procopio, A.; Perri, E.; Britti, D.; Cuzzocrea, S. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1413–1426.

- (7) Giner, E.; Andújar, I.; Recio, M. C.; Ríos, J. L.; Cerdá-Nicolás, J. M.; Giner, R. M. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12882–12892.
- (8) Bento, A. F.; Leite, D. F.; Marcon, R.; Claudino, R. F.; Dutra, R. C.; Cola, M.; Martini, A. C.; Calixto, J. B. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 1459–1469.
- (9) Wedemeyer, J.; Vosskuhl, K. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2008**, *22*, 537–549.
- (10) Atreya, R.; Mudter, J.; Finotto, S.; Müllberg, J.; Jostock, T.; Wirtz, S.; Schütz, M.; Bartsch, B.; Holtmann, M.; Becker, C.; Strand, D.; Czaja, J.; Schlaak, J. F.; Lehr, H. A.; Autschbach, F.; Schürmann, G.; Nishimoto, N.; Yoshizaki, K.; Ito, H.; Kishimoto, T.; Galle, P. R.; Rose-John, S.; Neurath, M. F. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 583–588.
- (11) Cominelli, F.; Nast, C. C.; Duchini, A.; Lee, M. *Gastroenterology* **1992**, *103*, 65–71.
- (12) Siegmund, B.; Lehr, H. A.; Fantuzzi, G.; Dinarello, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 13249–13254.
- (13) Coccia, M.; Harrison, O. J.; Schiering, C.; Asquith, M. J.; Becher, B.; Powrie, F.; Maloy, K. J. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 1595–1609.
- (14) Rizzo, A.; Pallone, F.; Monteleone, G.; Fantini, M. C. *World J. Gastroenterol.* **2011**, *17*, 3092–3100.
- (15) Kühn, R.; Löhler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Müller, W. *Cell* **1993**, *75*, 263–274.
- (16) Talero, E. M.; Sánchez-Fidalgo, S.; de la Lastra, C. A.; Illanes, M.; Calvo, J. R.; Motilva, V. *Peptides* **2008**, *29*, 2001–2012.
- (17) Tsatsanis, C.; Androulidaki, A.; Venihaki, M.; Margioris, A. N. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1654–1661.
- (18) Zamuner, S. R.; Warriar, N.; Buret, A. G.; MacNaughton, W. K.; Wallace, J. L. *Gut* **2003**, *52*, 1714–1720.
- (19) Sánchez-Fidalgo, S.; Cárdeno, A.; Sánchez-Hidalgo, M.; Aparicio-Soto, M.; de la Lastra, C. A. *Nutr. Biochem.* **2013**, in press.
- (20) Kyriakis, J. M.; Avruch, J. *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 689–737.
- (21) Hollenbach, E.; Neumann, M.; Vieth, M.; Roessner, A.; Malfertheiner, P.; Naumann, M. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1550–1552.
- (22) Zhao, X.; Kang, B.; Lu, C.; Liu, S.; Wang, H.; Yang, X.; Chen, Y.; Jiang, B.; Zhang, J.; Lu, Y.; Zhi, F. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 2216–2225.
- (23) Pereira, S. G.; Oakley, F. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 1425–1430.
- (24) Newton, K.; Dixit, V. M. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*.
- (25) Lawrence, T.; Fong, C. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 519–523.
- (26) Tomczak, M. F.; Erdman, S. E.; Davidson, A.; Wang, Y. Y.; Nambiar, P. R.; Rogers, A. B.; Rickman, B.; Luchetti, D.; Fox, J. G.; Horwitz, B. H. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 7332–7339.
- (27) Perretti, M.; D'Acquisto, F. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 62–70.
- (28) Ferlazzo, V.; D'Agostino, P.; Milano, S.; Caruso, R.; Feo, S.; Cillari, E.; Parente, L. *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 1363–1369.
- (29) Tang, A.; Li, N.; Li, X.; Yang, H.; Wang, W.; Zhang, L.; Li, G.; Xiong, W.; Ma, J.; Shen, S. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 1375–1383.
- (30) Yang, Y. H.; Toh, M. L.; Clyne, C. D.; Leech, M.; Aeberli, D.; Xue, J.; Dacumos, A.; Sharma, L.; Morand, E. F. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 8148–8153.
- (31) Babbini, B. A.; Laukoetter, M. G.; Nava, P.; Koch, S.; Lee, W. Y.; Capaldo, C. T.; Peatman, E.; Severson, E. A.; Flower, R. J.; Perretti, M.; Parkos, C. A.; Nusrat, A. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 5035–5044.
- (32) Cooper, H. S.; Murthy, S. N.; Shah, R. S.; Sedergran, D. J. *Lab. Invest.* **1993**, *69*, 238–249.
- (33) Billerey-Larmonier, C.; Uno, J. K.; Larmonier, N.; Midura, A. J.; Timmermann, B.; Ghishan, F. K.; Kiela, P. R. *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, *14*, 780–793.
- (34) Bradford, M. M. *Anal. Chem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (35) Mossman, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (36) Sasaki, K.; Iizuka, M.; Konno, S.; Shindo, K.; Sato, A.; Horie, Y.; Watanabe, S. *J. Gastroenterol.* **2005**, *40*, 474–482.

RESEARCH ARTICLE

Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice

Elisa Giner¹, M. Carmen Recio¹, José Luis Ríos¹, José Miguel Cerdá-Nicolás² and Rosa María Giner¹

¹ Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Burjassot, Spain

² Departament de Patologia, Facultat de Medicina, Universitat de València, València, Spain

Scope: The main phenolic secoiridoid oleuropein and active constituent from olive tree (*Olea europaea*, Oleaceae), has demonstrated anti-inflammatory properties in intestinal inflammation and anti-tumoral effects in different cancer cells. In this study, we evaluated the chemoprevention of oleuropein in a model of azoxymethane (AOM)/Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colorectal cancer (CRC) in C57BL/6 mice and the modulatory effect on the Th17 response in DSS acute colitis.

Methods and results: Oleuropein protected from AOM/DSS-induced CRC by improving clinical symptoms, disease activity index score as well as suppressed the growth and multiplicity of colonic tumors. Treatment with oleuropein reduced intestinal IL-6, IFN- γ , TNF- α , and IL-17A concentration, and decreased cyclooxygenase-2, Bax and proliferating cell nuclear antigen protein expression. Western blot analysis also showed a markedly downregulation of CRC-related pathways as nuclear factor- κ B (NF- κ B), Wnt/ β -catenin, phosphatidylinositol-3-kinase (P3IK)/Akt, and signal transducer and activators of transcription (STAT)3. In DSS acute model, oleuropein inhibited Th17 response, by decreasing CD4⁺ Ror γ ⁺ IL-17⁺ IFN- γ ⁺ T-cell subsets in the lamina propria, as well as IL-17A and IFN- γ expression.

Conclusion: Oleuropein as a dietary supplementation could be a promising protective agent against colitis-associated CRC.

Keywords:

Azoxymethane/dextran sulphate sodium / Chemoprevention / Colitis-associated colorectal cancer / Oleuropein / Th17 response

Received: July 30, 2015

Revised: September 9, 2015

Accepted: September 16, 2015

1 Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), which principally includes ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), is characterized by a chronic inflammation of the gastrointestinal tract, with relapsing phases followed by periods of remission. Despite the availability of therapies to manage these diseases, the absence of truly effective therapeutic approaches, primarily due to significant side effects and drug-resistance,

leads to a high morbidity with severe complications, reducing the quality of life of affected patients and frequently resulting in hospitalization or surgery [1].

Epidemiological studies have indicated that UC and CD are important risk factors for the development of colorectal cancer (CRC), one of the most common malignant tumors and one of the major causes of cancer-related death [2]. In fact, the connection between IBD and CRC has been clearly elucidated, with recent research estimating that the latter accounts for 10–15% of deaths in IBD [3]. The latest hypothesis is that long-term, chronic colitis creates a favorable environment for CRC initiation and promotion along with tumor growth and progression, while simultaneously influencing metastatic processes. The incidence of CRC depends on the duration, severity, and extent of colonic inflammation, along with the specific management of the disease, genetic predisposition, and environmental factors [4]. Around 25–40%

Correspondence: Rosa Maria Giner

E-mail: Rosa.M.Giner@uv.es

Abbreviations: AOM, azoxymethane; ASA, 5-aminosalicylic acid; CRC, colorectal cancer; CD, Crohn's disease; COX-2, cyclooxygenase-2; DSS, dextran sulphate sodium; DAI, disease activity index; FACS, fluorescence-activated cell sorting; IBD, inflammatory bowel disease; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; PVDF, polyvinylidene difluoride; STAT3, signal transducer and activators of transcription 3; UC, ulcerative colitis

Colour online: See the article online to view Figs. 2 and 3 in colour.

of patients with UC who have not undergone a prophylactic colectomy will develop CRC after 40 years of disease [5]. Current surveillance guidelines with regards to colonoscopy and biopsy strategies have been shown to prevent colon cancer and colon cancer death in these patients [6]; thus, CRC death rates can be reduced by improving access to screening and optimizing medical therapies. This underscores the urgent need for new treatment strategies for the various features of IBD in order to prevent against complications such as the development of CRC [7].

A growing body of evidence indicates that polyphenols can actually modulate inflammation and protect against cancer development, making them promising candidates for natural preventive/protective treatments of IBD [8] and CRC [9]. Oleuropein, the main phenolic secoiridoid present in the leaves and unprocessed olive drupes of *Olea europaea* (Oleaceae), seems to be one of the principal active natural compounds for which olive tree leaves have been used in the human diet as an extract, herbal tea, or powder for their potential beneficial effects. The role of oleuropein as anti-inflammatory agent has been reported in several models of inflammation [10–12]. Previous studies by our group demonstrated the protective effect of oleuropein on acute inflammatory relapse and the transition to chronic inflammation, both involved in the pathology of IBD [13, 14]. Recently, several studies have also demonstrated anti-proliferative and anti-tumor properties of oleuropein by the induction of apoptosis in different cancer cell lines. This compound downregulates phosphorylation of Akt in prostatic cell line [15], and increases the expression of both caspase 3 and Bax while reducing Bcl-2 and survivin, a potent anti-apoptotic protein, in estrogen-resistant breast cancer cells (MDA-MB-231) [16]. Similar results were found in oleuropein-treated HeLa cells, where the compound led to G₂/M phase cell arrest and induction of cell apoptosis [17]. Oleuropein has also been shown to limit the growth of and induces apoptosis in HT-29 cells through activation of the p53 pathway, adapting the HIF- α response to hypoxia [18].

These findings indicate that intake of oleuropein may result in enhanced protection from the development of CRC commonly associated with IBD. In this context, the present study uses macroscopic and histological analyses to evaluate the chemopreventive effect of oleuropein in a mouse model of azoxymethane (AOM)/dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis-associated tumorigenesis, characterizing several proinflammatory markers and the key pathways involved. Moreover, due to the recently discovered critical role of Th17 cells in the development of CRC [19], this study also assesses the modulatory effect of oleuropein on Th17 response in a model of DSS-induced acute colitis.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Unless otherwise specified, all chemicals including oleuropein, azoxymethane, and biochemical reagents were

purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Baker (Deventer, Holland). Dextran sulfate sodium (36–50 kD) was purchased from MP Biomedical (France). Colagenase, Dispase, and DNase I were obtained from Roche (Basel, Swiss). Polyclonal antibodies recognizing cyclooxygenase-2 (COX-2), p65 subunit nuclear factor- κ B (NF- κ B), and β -catenin were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA), polyclonal antibody for Bax was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA), and polyclonal antibodies for p-Akt and p-STAT3 were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), and antibody for Ki-67 was purchased from DAKO, Agilent technologies (Glostrup, Denmark). Anti-CD4-FITC, anti-CD3-Pacific blue, anti-Ror γ t-APC antibodies, and ELISA kits for cytokines were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA). Anti-IL-17A-PeCy7 and anti-IFN- γ -PerCP-Cy 5.5 antibodies were obtained from Biolegend (San Diego, CA, USA). Polyvinylidene difluoride (PVDF) Amersham Hybond-P membranes were purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, England, UK), and Fix and Perm kit were obtained from BD Bioscience (San Diego, CA, USA).

2.2 Animals

All animal care and experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Valencia, Spain (2015/VSC/PEA/00023). Female C57BL/6 mice (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain) weighing 18–20 g were acclimatized under a 12 h light/dark cycle at 22°C and 60% humidity, for 7 days before the experiments, and fed with a standard laboratory rodent diet and water ad libitum.

2.3 AOM/DSS-induced CRC and treatment

The AOM/DSS method has been established to induce inflammation-driven CRC [5]. The protocol is based in a single intraperitoneal injection of AOM in saline (7.5 mg/kg) at day -7 followed by three DSS cycles started at day 0. Each cycle consisted in 7 days of 1.5% DSS and 14 days of fresh tap water. The animals were randomly assigned to one of eight groups: C group (mice received water during all experiment); O group (mice received oleuropein at 100 mg/kg, to check the absence of toxicity of this compound); D group (mice received only the three DSS cycles); A group (mice received a single dose of AOM and water); groups labelled as A/D received a single dose of AOM either the three DSS cycles, and with the exception of one named A/D group, the rest were treated orally with the tested compounds, A/D+5-ASA group (the reference drug 5-aminosalicylic acid (ASA) at 75 mg/kg); A/D+O50 group (oleuropein at 50 mg/kg); A/D+O100 group (oleuropein at 100 mg/kg). Both 5-ASA and oleuropein were dissolved in drinking water and given daily from day -7 until the end of the experiment.

Mice were sacrificed at day 63 by cervical dislocation and their colons were removed. The disease activity index (DAI), a score used to assess the severity of colitis, was evaluated as previously described [13]. Colon samples were rinsed with cold PBS, blotted dry, weighed. Their length was measured to determine the weight/length ratio and they were examined for the presence and number of colonic polyps. Then, a piece of approximately 0.5 cm of colon was cut and fixed with 4% *p*-formaldehyde in PBS for histological analysis and the rest of colon tissues were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

2.4 Cytokine production in tissue

IL-6, IFN- γ , TNF- α , and IL-17A cytokines were isolated and quantified by ELISA as described previously [14].

2.5 Histological evaluation

Distal colon parts were fixed in 4% *p*-formaldehyde in PBS, embedded in paraffin and cut in sections of 4 μm . Then, slides were stained with hematoxylin and eosin. Eight randomly selected fields (magnification 4 \times) in each section were evaluated in a blinded fashion by two expert pathologist. Loss of epithelium, cellular infiltration, mucosal ulceration, and presence of dysplastic regions were identified in the different groups. For immunohistochemical study, paraffin sections were stained using the 3,3'-diaminobenzidine method. Antigen retrieval was performed using a citrate buffer until boiling, and slides were incubated with anti-Ki-67 primary antibody (1:50) overnight at 4°C .

2.6 Cytosolic and nuclear protein extraction

The differential extraction of proteins from tissue samples and their concentration were described and determined as previously reported [14].

2.7 Western blot analysis

Equal amounts of protein (25 μg) were separated by electrophoresis, transferred onto PVDF membranes, blocked, and incubated overnight at 4°C with anti-p-Akt (1:1000), anti-p-STAT3 (1:2000), anti- β -catenin (1:20 000), anti-p65 NF- κB (1:500) subunit, anti-Bax (1:500), anti-COX-2 (1:8000), or anti- β -actin (1:12 000 dilution) polyclonal antibodies. The blots were washed, incubated with secondary antibodies, and the immunoreactive bands were visualized with the aid of an enhanced chemiluminescence system (Millipore) [13].

2.8 Acute DSS-induced colitis

Acute colitis was induced through oral administration of 3% DSS w/v in fresh tap water ad libitum for 7 days. Animals were randomly assigned to four groups: C group (mice received water), D group (mice received 3% DSS from day 0), DSS+O group (mice daily received oleuropein at 100 mg/kg in water from day -7 , and from day 0, 3% DSS was added to water), DSS+Dx group (mice only received three doses of dexamethasone at 2.5 mg/kg by gavage from day -7 in alternate days, and from day 0, 3% DSS in water). Mice weight was recorded daily and animals were sacrificed at day 8 by cervical dislocation. Colons were removed, submitted to macroscopic examination and mononuclear cells were isolated from lamina propria.

2.9 Lamina propria mononuclear cells isolation and flow cytometry

Colon were opened longitudinally, cut in 0.5 cm pieces, washed, and filtered twice with buffer A (HBSS+0.5% EDTA), at 37°C by shaking. Liquid was discarded and tissue was digested and filtered three times with buffer B (0.5 mg/mL collagenase D+ 0.25 mg/mL DNase I + Dispase II 3 U/mL in HBSS+ 5% FCS), at 37°C by shaking. Then, filtered liquid was collected, centrifuged, and supernatant was discarded. Lymphocytes were isolated by Percoll gradient, cultured, and stimulated with Ionomycin (500 ng/mL), PMA (5 ng/mL), and Golgi Stop solution for 4 h at 37°C . Cells were collected, incubated with anti-CD4-FITC and anti-CD3-Pacific blue antibodies (1:50) 30 min at 4°C , fixed and permeabilized overnight. After 24 h, cells were incubated with anti-IL-17A-PeCy7, anti-IFN- γ -PerCP-Cy 5.5, and anti-Roryt-APC antibodies (1:100) 30 min at 4°C , washed and analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) (FACS Verse, Becton Dickinson).

2.10 Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm SE values. Statistical significance was determined with a one-way analysis of variance and Dunnett's *t*-test for multiple comparisons. It was used the symbol # or * to indicate the statistical significance in comparison to C group or A/D group, respectively.

2.11 Software

Images for Western blot 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). Images from Ki-67 staining were quantified densitometrically by using Image J software.

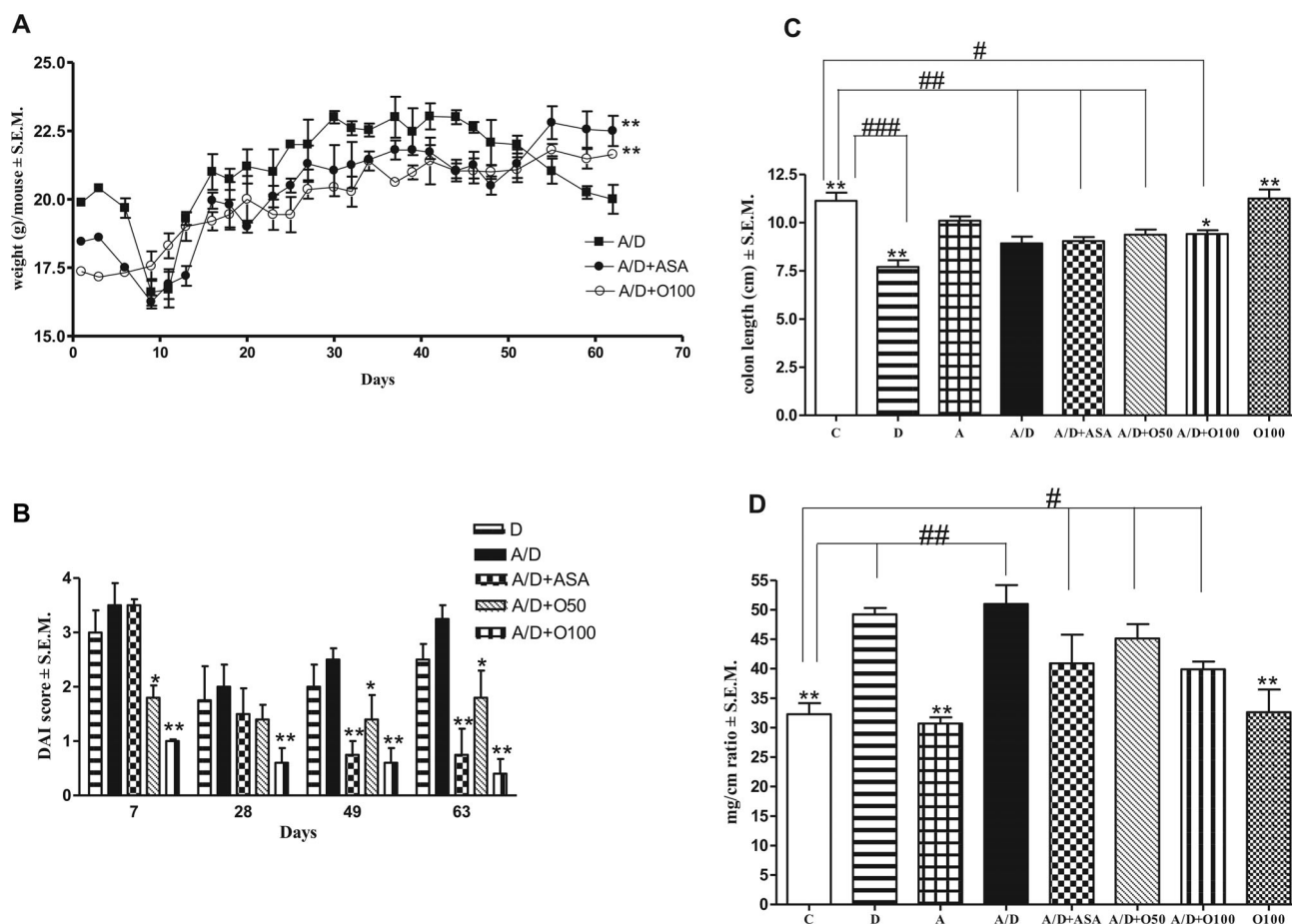


Figure 1. Effect of oleuropein on clinical symptoms of AOM/DSS-induced CRC in C57BL/6 mice. CRC was induced by three cycles, consisting in 1 week of 1.5% DSS in water, followed by 14 days of water. Mice were sacrificed at day 63 and colons were harvested and submitted to macroscopic examination. (A) Body weight per mouse measured three times a week during all the experiment. (B) Disease activity index (DAI) score after DSS administration in each cycle (day 7, 28, and 49) and day 63 measured by body weight loss, rectal bleeding, and diarrhea. (C) Colon length. (D) Colon mg/cm ratio from each group of mice. Each bar shows the mean \pm SEM for at least ten animals scored. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from the A/D group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, significantly different from the control group.

3 Results

3.1 Oleuropein ameliorated clinical symptoms in AOM/DSS-induced CRC in mice

Orally administered oleuropein (highest dose = 100 mg/kg daily) did not affect the viability of the mice. In our experiment, mice that received AOM/DSS showed a body weight loss at the end of DSS administration in each cycle, with the most dramatic weight loss after the first cycle. Although the mice recuperated their initial body weight during the 14 days of water administration in the first two cycles, the weight loss was definitive after the third DSS cycle (Fig. 1A). This parameter correlated to an aggravation of clinical signs, such as the presence of diarrhea and rectal bleeding, which worsened throughout the study period, as indicated in DAI score (Fig. 1B). Treatment with oleuropein at both 50 and 100 mg/kg ameliorated body weight loss and diarrhea/rectal

bleeding after the first DSS cycle. This protection was maintained throughout the experiment, with a clear tendency toward a stabilized body weight and a reduced presence of diarrhea and blood in feces, as evaluated by the DAI score ($p < 0.01$), as shown in (Fig. 1A and B). On day 63, the mice were sacrificed. We observed a notable shortening of the colon and an increment of W/L ratio in mice that had received DSS or AOM/DSS in comparison to mice in A/D+O100 group that had been treated with oleuropein at the highest dose ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Fig. 1C and D). Treatment with 5-ASA led to a worsening of clinical signs after the first cycle, with a mortality of 40%, but the surviving mice recovered during the second cycle, showing an increase in body weight and an improved DAI score until the end of the experiment ($p < 0.01$) (Fig. 1A and B). Mice from C, A, and O100 groups did not lose weight and show any clinical symptoms along the AOM/DSS experiment, giving the value of 0 in DAI score (data not shown).

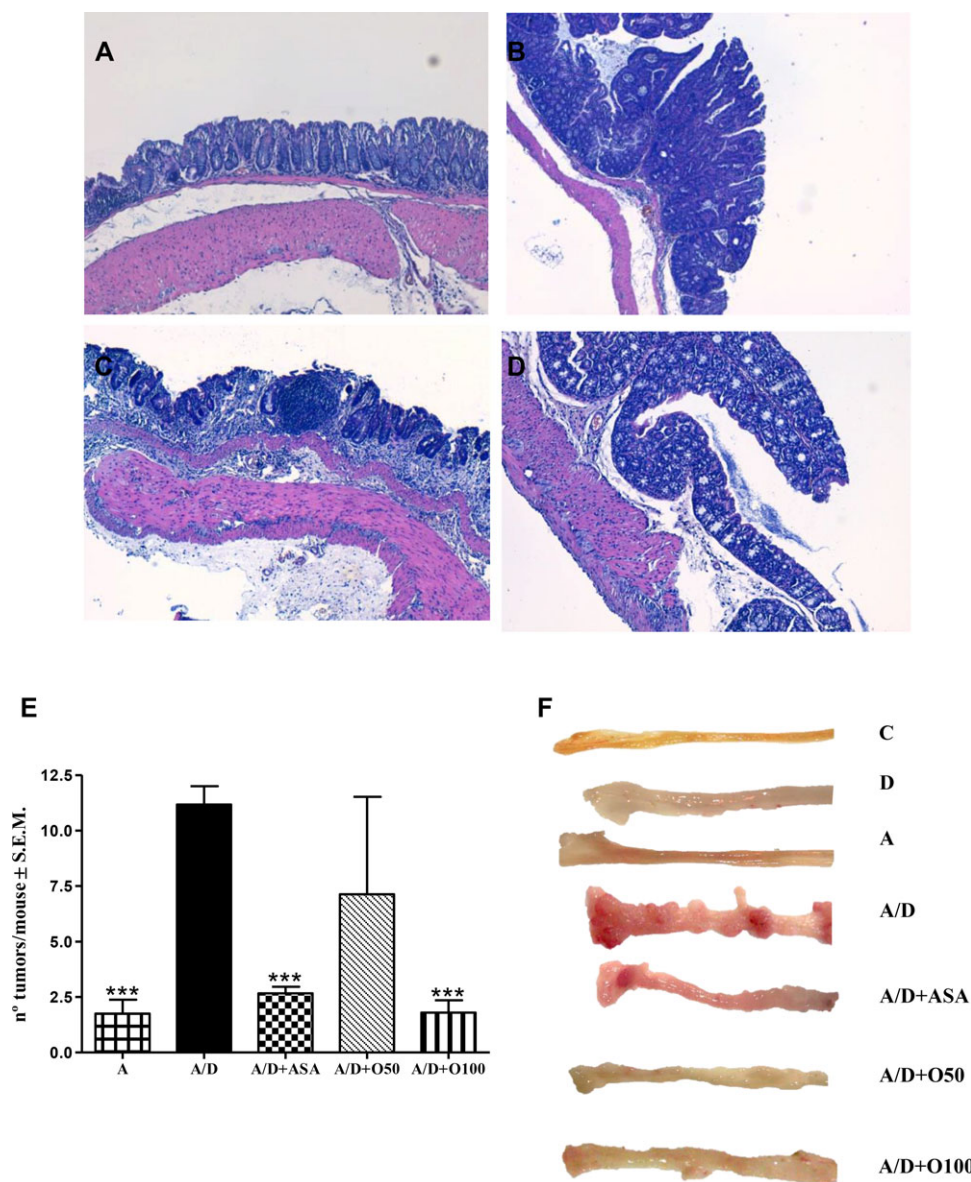


Figure 2. Effect of oleuropein on histological manifestation in AOM/DSS-induced CRC in C57BL/6 mice. Mice were sacrificed at day 63, colons were harvested, fixed, paraffin embedded, and sectioned. Hematoxylin and eosin staining of representative colons are shown at the same magnification (10×). (A) C group, (B) A/D group (AOM/DSS), (C) A/D+ASA group (AOM/DSS + 75 mg/kg 5-ASA), (D) A/D+O100 group (AOM/DSS+100 mg/kg oleuropein). (D) Multiplicity of tumors. (E) A representative macroscopic view of colonic tumors of each group of mice evaluated at the end of the experiment. *** $p < 0.01$, significantly different from the A/D group.

3.2 Oleuropein reduced the malignant histological features in AOM/DSS-induced CRC

By the end of the experiment, administration of AOM/DSS had induced a chronic inflammation, characterized by colonic mucosal ulcers, epithelium disruption, and a significant immune cell infiltration. Furthermore, mice developed dysplastic lesions, principally in the middle and distal parts of the colon. The incidence of colonic neoplasms in A/D group was 100%, being reduced by 64 and 16% after treatment with oleuropein at 50 and 100 mg/kg, respectively (Fig. 2E and F). Moreover, in those mice developing colonic tumors, the number of polyps were smaller compared to mice which only received AOM/DSS ($p < 0.05$). Treatment with 5-ASA also showed amelioration in histological parameters and a sig-

nificant reduction in tumor formation (Fig. 2E, and F). No tumors were detected in colon mice from C, D, and O100 groups (data not shown).

A/D group mice suffered a marked inflammation in the large intestine, with a loss of epithelial architecture and the development of neoplastic polyps in which the crypts were irregular and had lost their lineal pattern. The mouse colons presented anaplastic nuclear and cellular alterations and an atypical mitosis (Fig. 2B). In contrast, treatment with 100 mg/kg of oleuropein (Fig. 2D) reduced the colon inflammation induced by AOM/DSS and protected from epithelial damage and inhibited tumor formation in the colon. Mice treated with 5-ASA showed a slight intestinal inflammation, characterized by a focal lymphocyte infiltration and some eroded parts, but there were no signs of tumor growth (Fig. 2C).

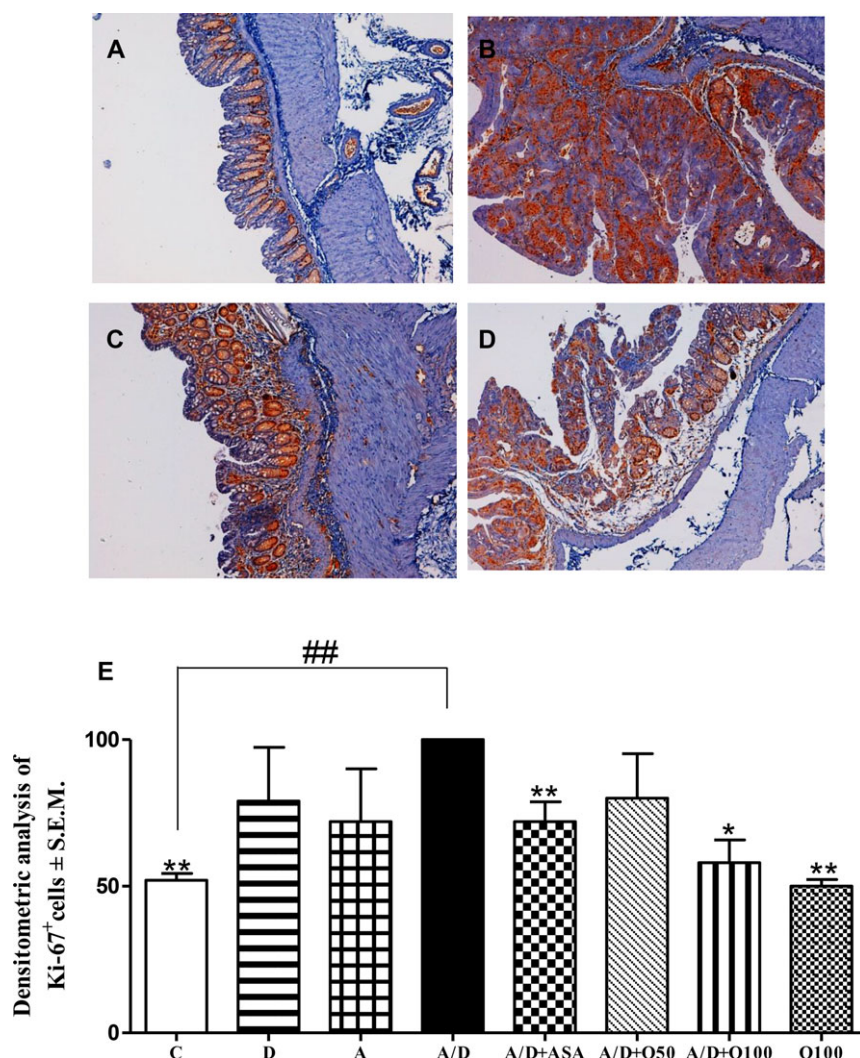


Figure 3. Effect of oleuropein on colonic epithelial Ki-67 expression in AOM/DSS-induced CRC in C57BL/6 mice. Mice were sacrificed at day 63, colons were harvested, fixed, paraffin embedded, and sectioned. Ki-67 expression in tissue was determined by immunohistochemistry, by using Streptavidin peroxidase complex, and 3'-3'diaminobenzidine as substrate. Representative images are shown at the same magnification (10 \times). (A) Representative histogram of Ki-67⁺ cells densitometry analysis (B) C group (Control), (B) A/D group (AOM/DSS), (C) A/D+ASA group (AOM/DSS + 75 mg/kg 5-ASA), (D) A/D+O100 group (AOM/DSS + 100 mg/kg oleuropein). Each bar shows the mean \pm SEM for at least ten animals scored. * p < 0.05, ** p < 0.01, significantly different from the A/D group; ## p < 0.01, significantly different from the control group.

3.3 Oleuropein decreased cell proliferation by inhibiting Ki-67 expression

Mice from C group exhibited a typical intestinal epithelium with residual Ki-67 staining localized in the crypts, due to the normal cell proliferation process (Fig. 3A). Higher expression of Ki-67 was found in the A/D group, especially in tumoral areas (Fig. 3B). As can be seen in the Fig. 3D, a lower percentage of Ki-67 positive cells in colon was observed in mice treated with 100 mg/kg of oleuropein, compared to the A/D group. Treatment with 5-ASA also reduced the cell proliferation in colon tissue (Fig. 3C). Results from D, A, A/D+O50, and O100 were not statistically significant (Fig. 3E).

3.4 Oleuropein decreased IL-6, IFN- γ , TNF- α , and IL-17A levels in colon tissue

Mice that had received DSS or AOM/DSS showed an increase in intestinal IL-6 production in comparison to A and C group, whereas treatment with oleuropein at both 50 and

100 mg/kg significantly reduced IL-6 concentration in colon homogenates (Fig. 4A). IFN- γ levels were also incremented in colon tissue from D and A/D groups, being reduced by treatment with oleuropein at 50 and 100 mg/kg (Fig. 4C). Regarding intestinal TNF- α production, it was higher in groups D, A, and A/D in comparison with group C, while tissue levels of TNF- α in mice treated with oleuropein at both 50 and 100 mg/kg were significantly lower than those in group A/D (Fig. 4B). Finally, samples from D, A, and A/D groups showed an increment in IL-17A production in comparison to C group, and treatment with the highest dose oleuropein significantly reduced IL-17A levels in colon tissue (p < 0.05) (Fig. 4D). 5-ASA at 75 mg/kg also demonstrated an inhibitory effect on release of these cytokines (p < 0.001).

3.5 Oleuropein modulated expression of key proteins in AOM/DSS-induced CRC

In AOM/DSS-induced CRC, mice from D, A, and A/D groups exhibited increased COX-2 expression in colon with respect

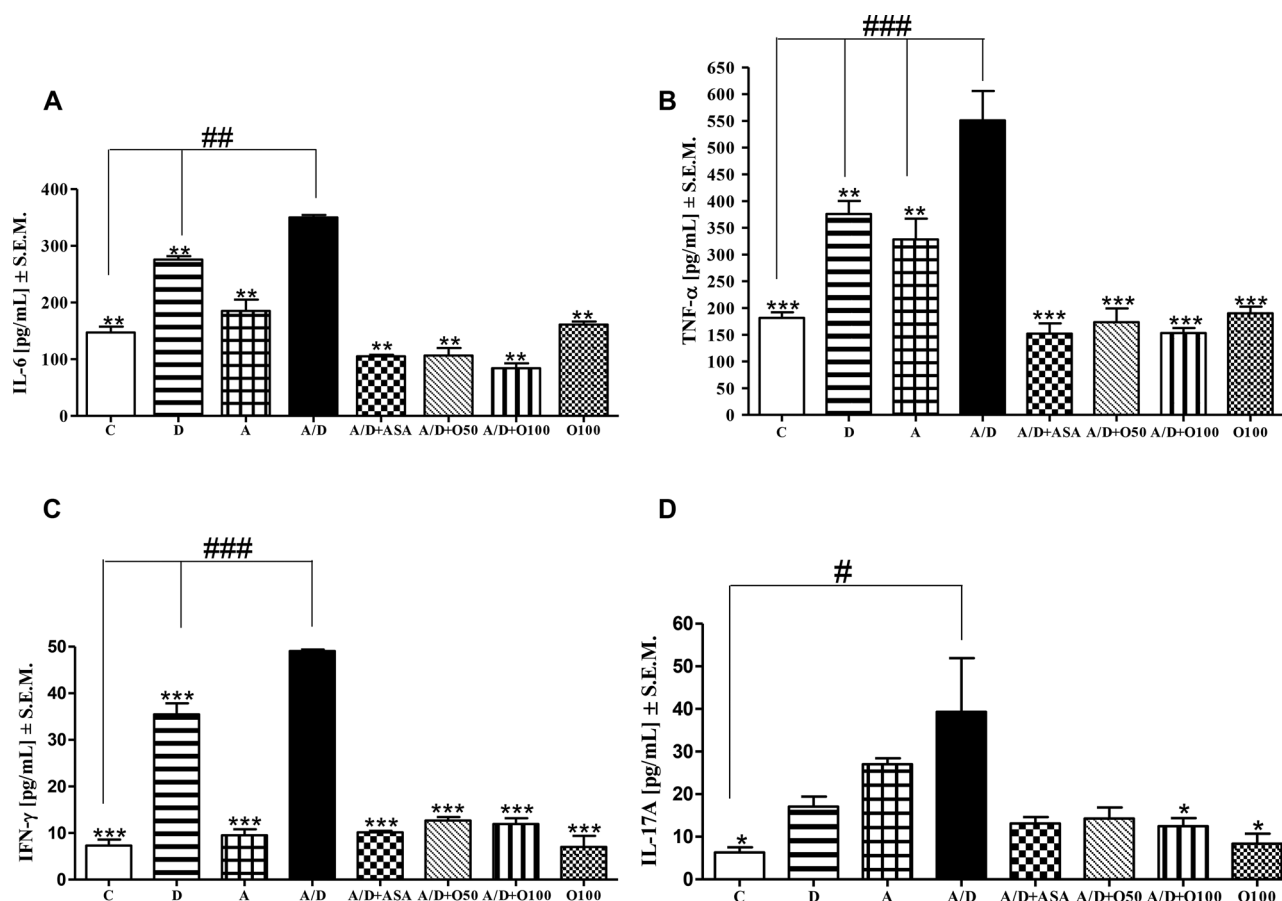


Figure 4. Effect of oleuropein on IL-6, IFN- γ , TNF- α , and IL-17A in colon tissue. Mice were sacrificed on day 63, colons were harvested, powdered in a mortar with liquid nitrogen, and cytokines were extracted. (A) IL-6, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , and (D) IL-17A from colon tissue of each group of mice were detected by ELISA at concentration of pg/mL. Each bar shows the mean \pm SEM for at least ten animals scored. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the A/D group; ## $p < 0.01$, significantly different from the control group.

to C group, and treatment with either 50 or 100 mg/kg of oleuropein significantly decreased COX-2 expression in colon tissue of these mice ($p < 0.001$) (Fig. 5A). Mice that received AOM/DSS exhibited lower Bax levels in colon tissue, but oleuropein at 50 and 100 mg/kg was able to reverse this effect ($p < 0.01$) (Fig. 5B). 5-ASA also reduced COX-2 expression ($p < 0.001$) and augmented Bax levels in colon tissue ($p < 0.05$) (Fig. 5A and B).

3.6 Oleuropein blocked signaling pathways implicated in AOM/DSS colon tumor generation

Samples from D, A, and A/D groups exhibited a clear increase of nuclear p65 subunit levels in comparison to C group, due to an activation of NF- κ B signaling pathway; however, after treatment with oleuropein at 50 mg/kg ($p < 0.001$) and 100 mg/kg ($p < 0.001$), a significant reduction of p65 subunit levels was observed (Fig. 6A). For its part, activation in the Wnt/ β -catenin pathway in A and A/D groups was demonstrated by increasing the translocat-

ion of β -catenin subunit to the nucleus, in comparison to C and D groups. In contrast, mice treated with oleuropein at 50 mg/kg ($p < 0.001$) and 100 mg/kg ($p < 0.001$) (Fig. 6B) exhibited significantly lower levels of nuclear β -catenin in colon samples.

With regards to phosphorylated signal transducer and activators of transcription 3 (STAT3) levels, A/D group exhibited higher levels of phosphorylated STAT3 in the cytosol of colon samples in comparison to C, D, and A, groups and this effect was reversed after administration of oleuropein at 50 mg/kg ($p < 0.01$) and 100 mg/kg ($p < 0.001$), (Fig. 6C) As for phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt pathway, an increase of cytosolic phosphorylated Akt subunit levels was found in mice from D, A, and A/D groups with respect to C group. Treatment with oleuropein at 100 mg/kg managed to inhibit activation of this pathway by reducing Akt subunit phosphorylation ($p < 0.01$) (Fig. 6D).

Finally, treatment with 5-ASA reduced the presence of p65 NF- κ B in the nucleus ($p < 0.001$), decreased the levels of nuclear β -catenin ($p < 0.05$), and inhibited the STAT3 and Akt phosphorylation ($p < 0.05$) in the cytosol.

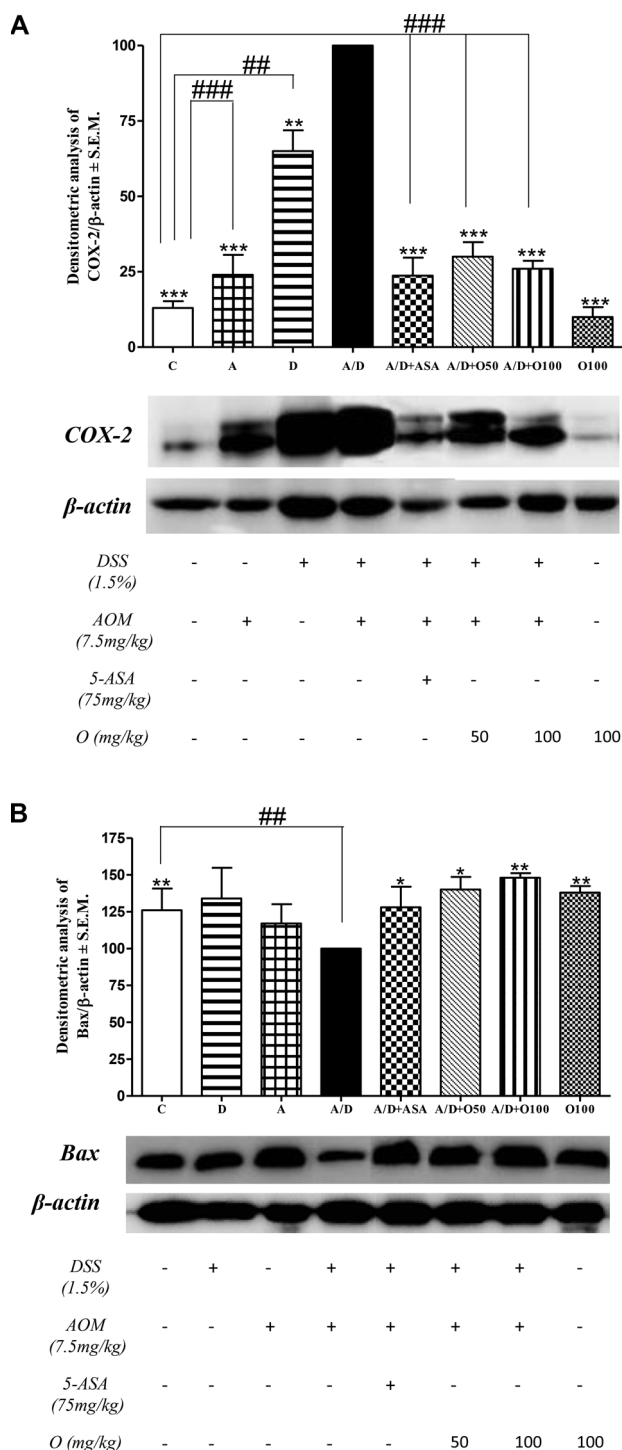


Figure 5. Effect of oleuropein on COX-2 and Bax expression in colon tissue from AOM/DSS-induced CRC in C57BL/6 mice. Mice were sacrificed at day 63, colons were harvested, powdered in a mortar with liquid nitrogen, and cytosolic proteins were extracted. (A) COX-2 and (B) Bax expression were detected by Western blot, determined by densitometry and normalized to β -actin content for each sample. The histograms represent the data derived from the Western blots following densitometry analysis and considering the A/D group as having 100% expression; a repre-

3.7 Oleuropein ameliorated acute colitis, inhibited the Th17 response and reduced intestinal IL-17 and IFN- γ release in DSS-induced acute colitis

In agreement with our previous results [14], oleuropein reduced significantly macroscopic and clinical parameters, as observed in Fig. 7A, B, and C. FACS analysis of cells taken from the colonic lamina propria of mice with acute DSS-induced colitis revealed an increased number of CD4⁺ Ror γ t⁺ cells. Furthermore, the percentage of CD4⁺ Ror γ t⁺ cells expressing IL-17⁺IFN- γ ⁺ was higher in this group than in C group. Treatment with oleuropein at 100 mg/kg significantly reduced the percentage of both subpopulations by 25 and 48%, respectively, compared to the DSS group. After administration of the immunosuppressive agent dexamethasone, a decrease of 40 and 30%, respectively, was observed in the two T-cell subpopulations under study (Fig. 7D and E).

As shown in Fig. 7F and G, Th17-type cytokines levels, IL-17, and IFN- γ , were all greatly increased in colon tissue in the DSS group compared to C group. A marked reduction of IL-17A and IFN- γ levels were observed in colon samples from animals treated with 100 mg/kg of oleuropein (95 and 66% inhibition, respectively). These cytokines were also significantly reduced after treatment with dexamethasone (98 and 87% inhibition, respectively).

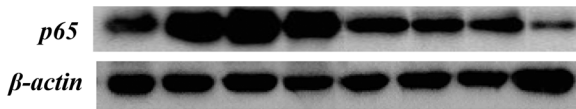
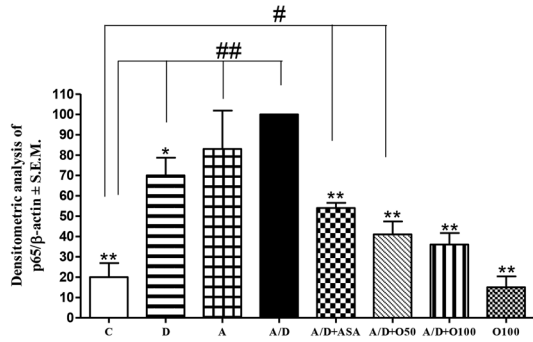
4 Discussion

Current research on managing inflammation has focused on the use of naturally occurring compounds derived from plants to offer alternative and effective anti-inflammatory therapies with low toxicity and minimal side effects. Various studies have suggested that consumption of certain fruit and vegetable constituents included in the Mediterranean diet may offer protection from certain types of cancer such as CRC. Oleuropein is an active ingredient from *Olea europaea* (Oleaceae), a common tree found throughout the Mediterranean basin, which has various pharmacological effects, including anti-hypertensive, hypo-glycemic, anti-inflammatory, anti-oxidant, and anti-carcinogenic activities. In fact, we previously demonstrated its anti-inflammatory effect in experimental models of both acute and chronic colitis induced by DSS, in which the compound led to amelioration of the inflammatory processes and a protection of the intestinal mucosa in colitic mice.

The association between UC and CRC has been demonstrated [20], with continuous colonic inflammation appearing to be a risk factor in the development of CRC. In this

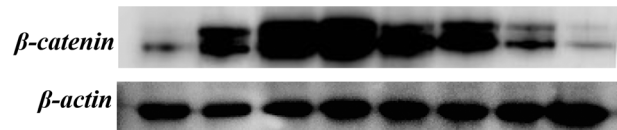
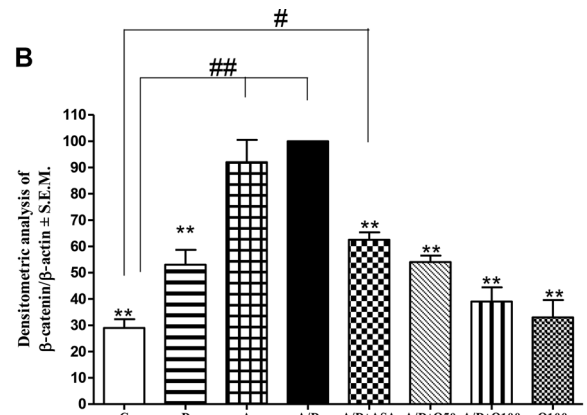
representative Western blot of each group of mice is also shown. Each bar show the mean \pm SEM for at least ten animals scored. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, significantly different from the A/D group; # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 significantly different from the control group.

A



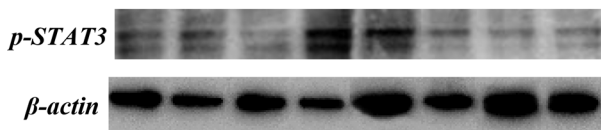
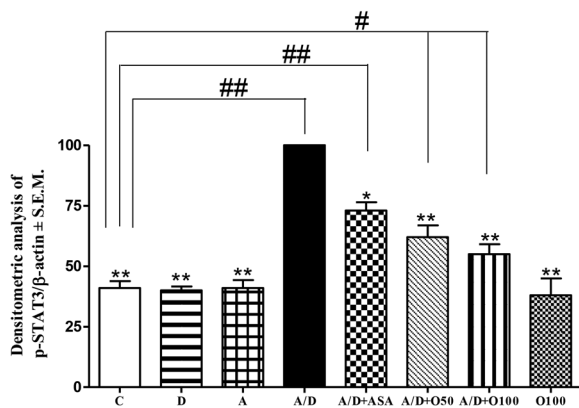
DSS (1.5%)	-	+	-	+	+	+	+	-
AOM (7.5mg/kg)	-	-	+	+	+	+	+	-
5-ASA (75mg/kg)	-	-	-	-	+	-	-	-
O (mg/kg)	-	-	-	-	-	50	100	100

B



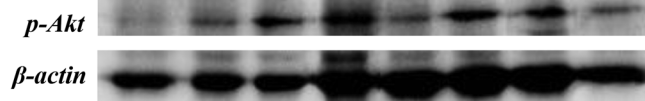
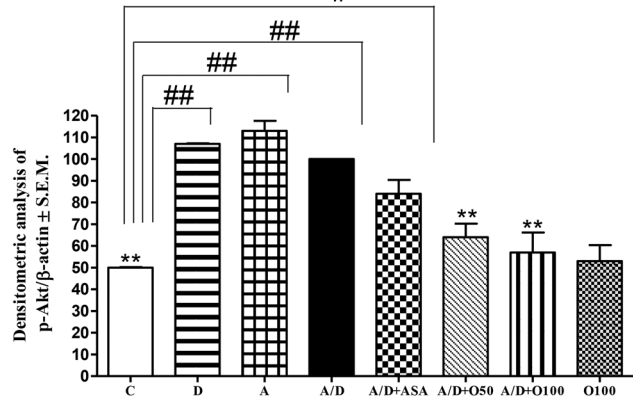
DSS (1.5%)	-	+	-	+	+	+	+	-
AOM (7.5mg/kg)	-	-	+	+	+	+	+	-
5-ASA (75mg/kg)	-	-	-	-	+	-	-	-
O (mg/kg)	-	-	-	-	-	50	100	100

C



DSS (1.5%)	-	+	-	+	+	+	+	-
AOM (7.5mg/kg)	-	-	+	+	+	+	+	-
5-ASA (75mg/kg)	-	-	-	-	+	-	-	-
O (mg/kg)	-	-	-	-	-	50	100	100

D



DSS (1.5%)	-	+	-	+	+	+	+	-
AOM (7.5mg/kg)	-	-	+	+	+	+	+	-
5-ASA (75mg/kg)	-	-	-	-	+	-	-	-
O (mg/kg)	-	-	-	-	-	50	100	100

context, anti-inflammatory agents such as 5-aminosalicylates, immune modulators, and now polyphenols, have been considered as potential chemopreventive agents. For these reasons, we undertook this study to examine the *in vivo* effects and molecular mechanisms of oleuropein on AOM/DSS-induced CRC in C57BL/6 mice. The beneficial effects of oleuropein were compared to the reference drug, 5-ASA at 75 mg/kg, since it demonstrated a clear preventive effect on AOM/DSS-induced CRC model in mice in previous studies carried out by Clapper et al. [21].

The primary end point was the development of colorectal dysplasia or cancer in mice. After mice were exposed first to a single AOM pretreatment and then to three repeated cycles of 1.5% DSS, tumorigenesis was highly promoted. In A/D group mice, a significant reduction in body weight was found to accompany tumor development. However, daily oleuropein administration throughout the 10-week study period led to a body weight gain similar to that of the animals in the control group. This observed lack of significant differences between these groups indicates an absence of toxicity for oleuropein. Indeed, in this study, we have demonstrated for the first time that oleuropein effectively reduced the inflammation associated to colitis and decreased the multiplicity of colonic tumors in mice, as reflected by marked amelioration of clinical symptoms, an improved DAI index, and a reduction of the incidence of colonic dysplasia. This protective effect was confirmed by a reduction in the intensity of colonic damage and nuclear cell alterations, as evidenced by histological findings. Epidemiological studies have shown an association between diets rich in olive oil phenols and lower mortality rates from cancer [22]. It has even been documented that dietary supplementation with extra virgin olive oil polyphenols leads to a notable protective effects against DSS-induced chronic colitis [23] and that an extra virgin olive oil enriched diet is effective in protecting against CRC-associated colitis after 15 cycles of DSS exposure in rats [24].

Results from 5-ASA-treated mice were carefully studied, since we expected an amelioration of clinical symptoms along the experiment. In concordance with previous studies [21], 5-ASA demonstrated a protective effect with an amelioration of inflammatory and histological parameters, a reduction of tumor formation and a clear inhibition of key pathways implicated in CRC. However, a clinical worsening in the first DSS cycle was observed. 5-ASA is extensively used in maintaining remission in UC patients, due to its approved clinical efficacy and the few side effects compared to other treatments, despite as the mechanism of action is still unclear, and the optimal dosage of 5-ASA per day is not established yet [25].

Some studies have been shown that 2–2.4 g/day is sufficient to treat mild UC, but patients with frequent relapses need to be treated with high doses of 5-ASA (4–4.8 g/day) to reduce the severe symptoms and moderate UC [26, 27]. Due to the aggressive colitis observed in the first cycle of DSS in our experiment, we stipulated that the dose used of 5-ASA would be enough to show its chemopreventive effect in a long-term, but low to reduce the acute severe colonic inflammation produced by DSS. Another hypothesis could be that 5-ASA is not effective in some animal models of colitis [28], and a recent study has shown that DSS exposure impairs the 5-ASA metabolism by colonic tissue, reducing the transformation to its major metabolite, an acetyl-derivate (Ac-5-ASA). This finding could also explain why some UC patients are refractory to this therapy [29].

Based on this data, oleuropein may have a chemopreventive effects against CRC associated with colitis. Our results show that oleuropein significantly downregulated the marked increase of proinflammatory biomarkers in the colon produced by exposure to AOM/DSS. Such downregulation has to do with the wnt/ β -catenin signaling pathway, which is involved in the proliferation and differentiation of stem cells. The key component of wnt pathway is β -catenin, which plays a critical role in the regulation of cellular proliferation. Mutations of the β -catenin gene are frequently found in chemically induced colon tumors in mouse colitis-associated colorectal cancer. AOM leads to a mutation in codons 33 and 41 of β -catenin, both important sites for GSK-3 β phosphorylation, as well as in codons 32 and 34, which also presumably affects its phosphorylation. These mutations lead to an abnormal nuclear localization and an increased cytoplasm expression of β -catenin [30], concordant with the altered cellular distribution of this protein in human colitis-associated cancer [31], thus suggesting that the β -catenin pathway plays an important role in the development of colon carcinogenesis in rodents as well as in humans [32]. Our results show that A/D group mice exhibited an increase of β -catenin in the nucleus that was reversed by treatment with oleuropein. The compound seems to have a blocking effect on β -catenin translocation along with a possible final modifying effect on β -catenin-related gene expression, as shown in the downregulation of COX-2 in colon tissue. COX-2 tends to be upregulated in inflammatory processes and plays a critical role in intestinal cancer due to the production of prostaglandins, which act as proinflammatory mediators in the late phase of tumorigenesis [33].

The suppressor effect of oleuropein on NF- κ B signaling pathway that we have demonstrated in previous studies [14] is also present in AOM/DSS-induced CRC model, compared

◀ **Figure 6.** Effect of oleuropein on the modulation of signaling pathways involved in AOM/DSS-induced CRC. Mice were sacrificed at day 63, colons were harvested and powdered in a mortar with liquid nitrogen, and cytosolic and nuclear proteins were extracted. Expression of (A) nuclear p65 subunit NF- κ B, (B) nuclear β -catenin, (C) p-STAT3, and (D) p-Akt, were detected by Western blot, determined by densitometry and normalized to β -actin content for each sample. The histograms represent the data derived from the Western blots following densitometry analysis and considering the A/D group as having 100% expression; a representative Western blot of each group of mice is also shown * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the A/D group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ significantly different from the control group.

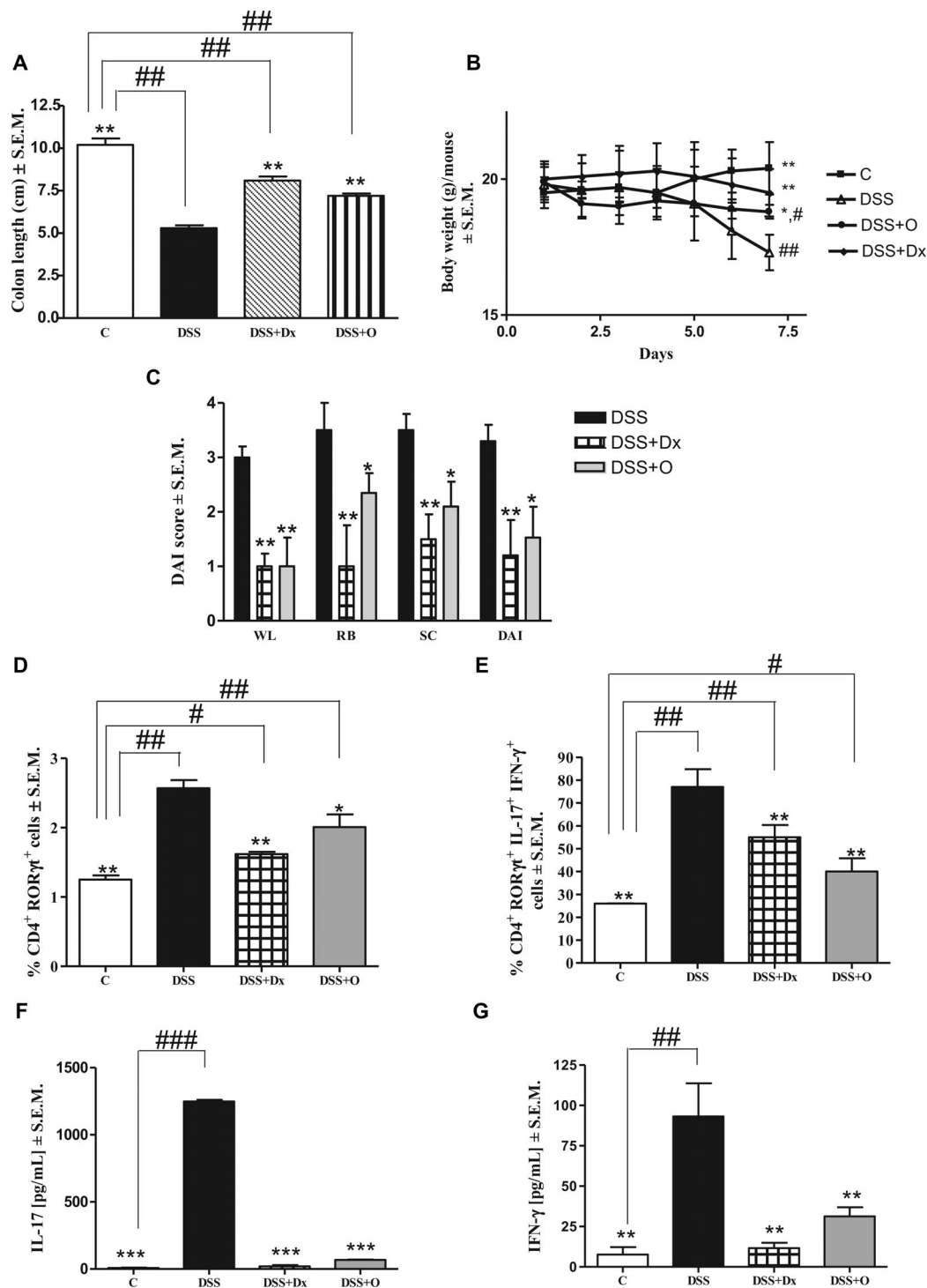


Figure 7. Effect of oleuropein on Th17 response in DSS-induced acute colitis model in C57BL/6 mice. Acute colitis was induced by 3% DSS in water for 7 days. Mice were sacrificed at day 8, colons were harvested, a piece of the distal part of colon tissues was cut, homogenized, and cytokines were extracted. Polymorphonuclear cells were isolated from lamina propria. (A) Colon length. (B) Body weight per mouse checked daily during all experiment. (C) DAI score measured by weight loose, rectal bleeding, and stool consistency at the end of the experiment. (D) CD4⁺ RORγt⁺ cells and (E) CD4⁺ RORγt⁺ IL-17⁺IFN-γ⁺ cells from the different groups were analyzed by flow cytometry. (F) IL-17 and (G) IFN-γ from colon tissue of each group of mice were detected by ELISA at concentration of pg/mL. Each bar shows the mean ± SEM for at least nine animals scored. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, significantly different from the DSS group; #*p* < 0.05, ###*p* < 0.01, significantly different from the control group.

to untreated mice. NF- κ B is involved in many physiological processes and diseases, especially in modulation of inflammation. Although the role of NF- κ B in UC and CD remains unclear, various studies have described different mechanisms by which NF- κ B could participate in the development of colitis-associated CRC, such as the genetic depletion of IKK β -dependent NF- κ B signaling, which was found to decrease tumor incidence in a mouse model of CRC [34]. Moreover, oleuropein has been shown to reduce the release of other inflammatory mediators that are corelated with NF- κ B activation. For example, cytokines such as TNF- α and IL-6 are key molecules involved in the progression of CRC. TNF- α acts as a primary signal to trigger an inflammatory response, but this cytokine also facilitates tumor growth, leukocyte recruitment, angiogenesis, and invasion [35]. IL-6 can activate STAT3, which augments the expression of antiapoptotic proteins, increasing the resistance of inflammatory cells to programmed cell death and perpetuating chronic inflammation [36]. IL-6 also contributes to tumor development, as demonstrated in a study by Kim et al. (2013) [37], where IL-6, through activation of the JAK1-STAT3-Oct4 gene pathway, promoted conversion of noncancer cells into tumor stem cells. Furthermore, because IL-6 is a downstream mediator of STAT3 phosphorylation, it produces a continuous activation of this pathway. In our study, treatment with oleuropein successfully inhibited the increase of IL-6 production in colon tissue and reduced the presence of phosphorylated STAT3 in the nucleus. Our results show that oleuropein can break this positive feedback loop, but further studies on its effect on this cycle are needed in order to determine the exact mechanism.

Bax, a protein of the Bcl2 gene family, is induced by the transcription factor p53 to repress the antiapoptotic effect of Bcl-xl proteins and to promote programmed cell death. Mice treated with oleuropein showed an increase in the expression of Bax with respect to A/D group mice, which indicates that oleuropein may act on this pathway, enhancing the activation of p53 and regulating the process of cell apoptosis in the intestine [38]. Moreover, it is well known that p53 represses Akt phosphorylation by PI3K, a survival signaling pathway. In our study, we observed an inhibition of Akt phosphorylation after treatment with oleuropein, but no change in p53 translocation to the nucleus was noted. In prior work, Cárdeno et al. (2013) [18] were able to demonstrate that oleuropein activates p53 pathway and induces apoptosis in an HT-29 cell line. More studies are needed to determine the effect of oleuropein on both the p53 and the PI3K/Akt signaling pathways.

Numerous studies suggest cross-communication between the appearance of CRC and an activation of a novel subtype of T-helper cells, the Th17 response, which creates an inflammatory, cell-derived, cytokine environment, and stimulates tumor promotion and progression in some models of intestinal tumorigenesis. Particularly, in AOM/DSS-induced CRC model, it has been demonstrated that IL-17A-deficient animals express reduced levels of IL-6, TNF- α , and IFN- γ , develop milder colitis as well as fewer and smaller tumors than wild-type mice showing a clear role of Th17 cytokines [39].

In agreement with these findings, we observed an increment of IL-17 and IFN- γ tissue levels in colitis-associated CRC, being reduced by the treatment of oleuropein in comparison to A/D group. As in a previous studies, we demonstrated the efficacy of oleuropein in a DSS-induced acute colitis, by reduction of several proinflammatory markers and signaling pathways [14], we now decided to examine possible effects of oleuropein on the Th17 response in an acute DSS model by evaluating the changes in Th17-cell and Th17-related cytokine patterns in intestinal inflammation. Indeed, treatment with oleuropein decreased CD4⁺Roryt⁺ T cell and CD4⁺Roryt⁺IL-17⁺ IFN- γ ⁺ T-cell subsets in the lamina propria, while also lowering IL-17 and IFN- γ tissue levels as compared with animals that had received only DSS. These results shed new light on how oleuropein may act on different inflammatory processes in IBD, protecting the gut from mucosal injury due to the modulation of the intestinal immune response.

Taken together, these results provide therapeutic evidence that oleuropein prevents the development of colonic neoplasia in AOM/DSS-induced CRC in mice by ameliorating colon inflammatory processes and limiting the activation of main transcription factors involved (NF- κ B, STAT3, PI3K/Akt, and β -catenin). Oleuropein is thus a promising natural protective/preventive agent against colitis-associated CRC with the potential to help maintain human health through dietary supplementation.

E.G., M.R., and R.M. conceived, designed, and developed the study. E.G. performed the experiment, and E.G. and R.M. interpreted the data and wrote the manuscript. R.M., J.L., and M.R. revised the manuscript. M.C. carried out histological experiments.

The authors thank the Spanish government (MICIIN and FEDER, grant SAF2009-10059-C03-01) for financial support. E.G. thanks the Universitat de València for her fellowship (Atracció al Talent, VLC campus).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Shimizu, M., Kochi, T., Shirakami, Y., Genovese, S. et al., A newly synthesized compound, 4'-geranyloxyferulic acid-N (omega)-nitro-L-arginine methyl ester suppresses inflammation-associated colorectal carcinogenesis in male mice. *Int. J. Cancer* 2014, 135, 774–784.
- [2] Siegel, R., Desantis, C., Jemal, A., Colorectal cancer statistics, 2014. *C.A. Cancer J. Clin.* 2014, 64, 104–117.
- [3] Dyson, J.-K., Matthew, D.-R., Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 3839–3848.
- [4] Lavi, I., Nimri, L., Levinson, D., Peri, I. et al., Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Gastroenterology* 2012, 47, 504–518.

- [5] Grivennikov, S.-I., Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.* 2013, *35*, 229–244.
- [6] Marion, J.-F., Colorectal cancer in colitis: a relic of the past? *Inflamm. Bowel Dis.* 2015, *21*, 699–702.
- [7] Clapper, M.-L., Cooper, H.-S., Chang, W.-C., Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol. Sin.* 2007, *28*, 1450–1459.
- [8] Biasi, F., Astegiano, M., Maina, M., Leonarduzzi, G. et al., Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease. *Curr. Med. Chem.* 2011, *18*, 4851–4865.
- [9] Rudolf, E., Andelová, H., Cervinka, M., Polyphenolic compounds in chemoprevention of colon cancer—targets and signaling pathways. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2007, *7*, 559–575.
- [10] Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I. et al., The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clin. Nutr.* 2011, *30*, 533–540.
- [11] Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I. et al., Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011, *339*, 859–869.
- [12] Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I. et al., The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem. Pharmacol.* 2012, *83*, 1413–1426.
- [13] Giner, E., Recio, M.-C., Ríos, J.-L., Giner, R.-M., Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. *J. Nat. Prod.* 2013, *76*, 1113–1120.
- [14] Giner, E., Andújar, I., Recio, M.-C., Ríos, J.-L. et al., Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 12882–12892.
- [15] Acquaviva, R., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F. et al., Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int. J. Oncol.* 2012, *41*, 31–38.
- [16] Elamin, M.-H., Daghestani, M.-H., Omer, S.-A., Elobeid, M.-A. et al., Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food Chem. Toxicol.* 2013, *53*, 310–316.
- [17] Yao, J., Wu, J., Yang, X., Yang, J. et al., Oleuropein induced apoptosis in HeLa cells via a mitochondrial apoptotic cascade associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Pharmacol. Sci.* 2014, *125*, 300–311.
- [18] Cárdeno, A., Sánchez-Hidalgo, M., Rosillo, M.-A., Alarcón de la Lastra, C., Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 α . *Nutr. Cancer* 2013, *65*, 147–156.
- [19] Omrane, I., Benammar-Elgaaied, A., The immune microenvironment of the colorectal tumor: involvement of immunity genes and microRNAs belonging to the TH17 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, *1856*, 28–38.
- [20] Yashiro, M., Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2014, *20*, 16389–16397.
- [21] Clapper, M.-L., Gary, M.-A., Coudry, R.-A., Litwin, S. et al., 5-aminosalicylic acid inhibits colitis-associated colorectal dysplasias in the mouse model of azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2008, *14*, 1341–1347.
- [22] Bernini, R., Merendino, N., Romanic, A., Velotti, F., Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Cur. Med. Chem.* 2013, *20*, 655–670.
- [23] Sánchez-Fidalgo, S., Cárdeno, A., Sánchez-Hidalgo, M., Aparicio-Soto, M., Alarcón de la Lastra, C., Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *J. Nutr. Biochem.* 2013, *24*, 1401–1413.
- [24] Sánchez-Fidalgo, S., Villegasa, I., Cárdeno, A., Talero, E. et al., Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Clin. Nutr.* 2010, *29*, 663–673.
- [25] Hauso, Ø., Martinsen, T.-C., Waldum, H., 5-Aminosalicylic acid, a specific drug for ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 2015, *50*, 933–941.
- [26] Feagan, B.-G., Macdonald, J.-K., Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012, *10*, Article ID CD000543.
- [27] D'Argenio, G., Cosenza, V., Sorrentini, I., De Ritis, F. et al., Butyrate, mesalamine, and factor XIII in experimental colitis in the rat: effects on transglutaminase activity. *Gastroenterology* 1994, *106*, 399–404.
- [28] Fedorak, R.-N., Empey, L.-R., MacArthur, C., Jewell, L.-D., Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology* 1990, *98*, 615–625.
- [29] Ramírez-Alcántara, V., Montrose, M.-H., Acute murine colitis reduces colonic 5-aminosalicylic acid metabolism by regulation of N-acetyltransferase-2. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2014, *306*, G1002–G1010.
- [30] Takahashi, M., Fukuda, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Res.* 1998, *58*, 42–46.
- [31] Aust, D.-E., Terdiman, J.-P., Willenbacher, R.-F., Chew, K. et al., Altered distribution of beta-catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancers. *Mod. Pathol.* 2001, *14*, 29–39.
- [32] Pandurangan, A.-K., Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013, *14*, 2201–2205.
- [33] Li, W., Hua, B., Saud, S.-M., Lin, H. et al., Berberine regulates AMP-activated protein kinase signaling pathways and inhibits colon tumorigenesis in mice. *Mol. Carcinog.* 2014, *54*, 1096–1109.

- [34] Greten, F.-R., Eckmann, L., Greten, T.-F., Park, J.-M. et al., IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004, 118, 285–296.
- [35] Balkwill, F., Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9, 361–371.
- [36] Atreya, R., Neurath, M.-F., Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2005, 28, 187–196.
- [37] Kim, S.-Y., Kang, J.-W., Song, X., Kim, B.-K. et al., Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cell Signal.* 2013, 25, 961–969.
- [38] Watson A.-J., An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2006, 57, 107–121.
- [39] Hyun, Y.-S., Han, D.-S., Lee, A.-R., Eun, C.-S. et al., Role of IL-17A in the development of colitis associated cancer. *Carcinogenesis* 2012, 33, 931–936.

