

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**TESIS DOCTORAL**

**ANÁLISIS DE LA EFICACIA DEL CRANBERRY Y  
CONCENTRACIÓN URINARIA DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LA  
PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN URINARIA RECURRENTE  
INFANTIL**

Rocio Rodríguez Belmonte

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Rocío Rodríguez Belmonte

ISBN: 978-84-9163-220-7

URI: <http://hdl.handle.net/10481/46756>

# 1. INDICE TEMÁTICO



---

## INDICE TEMÁTICO

---

	Págs.
<b>1. INDICE TEMÁTICO</b>	<b>1</b>
<b>2. DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS</b>	<b>9</b>
<b>3. DIRECCIÓN Y CERTIFICACIONES</b>	<b>15</b>
<b>4. PUBLICACIONES</b>	<b>25</b>
<b>5. ABSTRACT</b>	<b>57</b>
<b>6. INTRODUCCIÓN</b>	<b>61</b>
6.1.  Importancia de la infección de orina en la infancia.	63
6.1.1. Definición de infección urinaria	64
6.1.2. Etiología de la ITU	65
6.1.3. Factores de riesgo	66
6.1.4. Cicatrices renales, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal terminal e HTA	68
6.1.5. Profilaxis antibiótica	68
6.2.  Patogenia: virulencia bacteriana e ITU	69
6.2.1. Variaciones de virulencia	70
6.2.2. Medida de la virulencia	70
6.2.3. Factores determinantes de la acción patógena	71
6.2.4. Colonización	71
6.2.5. Interacciones en el epitelio cutaneomucoso	71
6.2.6. Virulencia y formación de Biofilm	72
6.2.7. Virulencia y <i>E.coli</i>	72
6.2.8. Adherencia bacteriana:	73
6.2.8.1. Adhesinas	73
6.2.8.2. Adhesinas múltiples	77
6.2.8.3. Receptores de adherencia bacteriana	77
6.2.8.4. Mecanismo de adherencia bacteriana	78
6.2.8.5. Adherencia y colonización	80
6.2.8.6. Adherencia e infección	80
6.2.9. Propiedades inespecíficas de adherencia bacteriana	83
6.2.9.1. Hidrofobicidad de superficie	83
6.2.9.2. Hemaglutinación eritrocitaria	84
6.3.  Prevención de la Adherencia. Papel del Jarabe de Arándano	84
6.3.1. Interferencia con la flora saprofita	85
6.3.2. Factores dependientes del huésped en adherencia	85
<b>6.3.3.</b> Jarabe de Arándano y formación de Biofilm	85
6.4.  Polifenoles, metabolismo e importancia en antiadherencia	86
6.4.1. Clasificación de los polifenoles	88
6.4.2. Rutas Metabólicas de los diferentes componentes	

polifenólicos	89
6.4.3. Otras rutas metabólicas	93
6.5. Aspectos botánicos del Arándano	94
6.5.1 Composición del fruto	95
6.5.1.1. Antocianinas	96
6.5.1.2. Proantocianidinas (PACs)	97
6.5.1.3. Flavonoles	98
6.5.1.4. Acidos Orgánicos	99
6.5.1.5. Aceites Volátiles	100
6.5.1.6. Azúcar y Carbohidratos complejos	100
6.5.1.7. Vitaminas	101
6.5.1.8. Aceite de Semilla	102
6.6. Productos Derivados del Arándano Americano	102
6.6.1. Composición del zumo	102
6.6.2. Composición del cotel de zumo de Arándano Americano	103
6.6.3. Salsa de Arándano Americano	104
6.6.4. Arándano Americano deshidratado dulce	104
6.6.5. Suplementos dietéticos de Arándano Americano	104
6.6.6. Pulpa de Arándano (prensado)	104
6.7. Arándano Americano en profilaxis	104
6.7.1. Farmacocinética	106
6.7.2. Antocianinas	107
6.7.3. Proantocianidinas	108
6.7.4. Flavonoles	109
6.7.5. Ácidos fenólicos	109
6.7.5.1. Metabolismo de los ácidos fenólicos en humanos	110
6.7.5.2. Metabolismo de los ácidos fenólicos en el modelo animal.	110
6.7.6. Mecanismos de Antiadherencia del Arándano Americano	111
6.7.6.1. Acción antiadherente de las PACs. Estudios In vitro, Ex vivo y estudios en animales.	111
6.7.6.2. Acción antiadherente de otros componenetes fenólicos. Nuevas teorías.	112
6.7.7. Ensayos clínicos en población humana	114
6.7.7.1. Ensayos clínicos en población anciana	116
6.7.7.2. Ensayos clínicos en mujeres con ITU recurrente	116
6.7.7.3. Ensayos clínicos en mujeres embarazadas	118
6.7.7.4. Infección de orina recurrente en la Infancia	118
6.7.7.5. Arándano Americano y salud del tracto urinario en pacientes con vejiga neurogénica y lesiones de médula espinal	119
6.7.7.6. Otros efectos sobre el tracto urinario	120
6.8. Otros efectos del Arándano Americano sobre la salud	121
6.8.1. Arándano rojo y salud cardiovascular	121

6.8.1.1.	Dislipemia	121
6.8.1.2.	Diabetes e hipertensión	121
6.8.1.3.	Estrés Oxidativo	122
6.8.1.4.	Inflamación	122
6.8.1.5.	Disfunción endotelial	122
6.8.1.6.	Rigidez Arterial	123
6.8.1.7.	Función plaquetaria	123
6.8.2.	Otras acciones sobre el organismo	123
<b>7.</b>	<b>OBJECTIVES</b>	<b>125</b>
<b>8.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>131</b>
8.1.	Estudio experimental	133
8.1.1.	Caracterización del jarabe de arándano	133
8.1.2.	Selección de la muestra y criterios de inclusión y exclusión	135
8.1.3.	Cálculo del tamaño muestral	141
8.1.4.	Definición de variables	144
8.1.5.	Enmascaramiento de las intervenciones	147
8.1.6.	Periodo de validez de las intervenciones, conservación y registro	148
8.1.7.	Análisis de estabilidad de placebo.	149
8.1.8.	Análisis de estabilidad y bioactividad de arándano.	157
8.1.9.	Dosis y administración	158
8.1.10.	Etiquetado	158
8.1.11.	Protocolo de apertura de ciego	159
8.1.12.	Retirada de la medicación	159
8.2.	Método clínico, seguimiento de pacientes	159
8.2.1.	Diseño global del estudio	159
8.2.2.	Periodo de preinclusión o lavado, seguimiento, etc.	160
8.2.3.	Criterios diagnósticos	160
8.2.4.	Criterios de retirada	160
8.2.5.	Duración aproximada del periodo de reclutamiento	161
8.2.6.	Desarrollo del ensayo	161
8.2.7.	Garantía de confidencialidad	161
8.2.8.	Responsabilidades de todos los pacientes en el ensayo	162
8.2.9.	Condiciones de archivo de datos, su manejo y procesamiento, correcciones...	162
8.2.10.	Identificación de muestras para investigación clínica y responsables de su suministro y conservación	162
8.2.11.	Condiciones de publicación	162
8.2.12.	Seguridad	162
8.2.13.	Seguro de responsabilidad civil	162
8.3.	Método de laboratorio	163
8.3.1.	Conservación de las cepas y utilización	163
8.3.2.	Caracterización de las cepas	163

8.3.3.	Condiciones de cultivo	163
8.3.4.	Análisis de la actividad antiadherente de <i>E.coli</i> P-fimbriado	163
8.3.5.	Hemaglutinación	165
8.3.6.	Preparación del jarabe de arándano, procedimientos.	165
8.3.7.	Determinación de la hidrofobicidad	
8.3.7.1.	Test de agregación con sulfato amónico	166
8.3.7.2.	Adherencia a hexadecano	166
8.3.7.3.	Preparación de Búferes	167
8.3.8.	Adherencia a filtros de nitrocelulosa	168
8.3.9.	Inhibición de la formación de Biofilm	168
8.3.10.	Determinación de los contenidos de fenólico total, proantocianidinas y antocianina	169
8.4.	Investigación documental	170
8.5.	Método estadístico	171
8.5.1.	Estadística descriptiva	171
8.5.2.	Inferencia estadística	174

## 9. RESULTS 183

9.1.	Cranberry syrup characterisation	185
9.2.	In vitro anti-adhesive properties of cranberry extract	186
9.3.	Efficacy and safety of cranberry extract in the prophylaxis of paediatric recurrent urinary tract infection	189
9.3.1.	Recurrent urinary tract infections	190
9.3.2.	Vesicoureteral reflux	191
9.3.3.	Dilatation of renal pelvis or hydronephrosis	191
9.3.4.	Ureteral duplication and other anatomical defects	191
9.3.5.	Bacterial isolates in the urine of patients who completed follow-up with urinary infection.	191
9.3.6.	Efficacy and safety of prophylaxis with cranberry in different ages groups	193
9.4.	Phenolic acids excretion in urine and its relationship with recurrence of urinary tract infection	193
9.4.1.	Analysis of the pattern of excretion of phenolic acids in different ages and their relationship with the recurrence of urinary tract infection	194
9.4.2.	Analysis of urinary excretion of dietary phenolic acids	195
9.4.3.	Analysis of urinary excretion of metabolic phenolic acids	196
9.5.	Phenolic acids in urine and antiadherent properties	197

9.5.1. Urinary excretion of phenolic acids, with respect to biofilm formation and surface hydrophobicity of <i>E.coli</i>	198
<b>10. DISCUSSION</b>	<b>201</b>
10.1. In vitro anti-adhesive properties of cranberry extract	203
10.2. Efficacy and safety profile of cranberry in infants and children with recurrent urinary tract infection	204
10.3. Analysis of urinary excretion of phenolic acids	206
10.4. Phenolic acids excretion in urine and its relationship with antiadherent properties and recurrence of urinary tract infection.	207
<b>11. CONCLUSIONS</b>	<b>211</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>215</b>
ANEXO I: Normativa y registro de ensayos clínicos	217
ANEXO II: Memoria técnica del Servicio de Farmacia	223
ANEXO III: Declaración de acontecimientos adversos	225
ANEXO IV: Declaración de Helsinki de la asociación médica mundial: Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.	229
ANEXO V: Seguro de responsabilidad civil	235
<b>13. ABREVIATURAS REFERENCIAS</b>	<b>245</b>
<b>14. REFERENCIAS</b>	<b>251</b>

## **2. DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**



## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

---

Cuando parece que este apasionante proyecto va llegando a su fin, no siento más que agradecimiento a todas las personas que me ha ayudado a conseguirlo.

Gracias a mi hija, Dulce. Tú le has dado sentido a mi vida y me has hecho conocer el amor en estado puro. Todo lo que hago es para ti, para que estés orgullosa de tu madre.

A mi amado esposo Carlos, que siempre ha creído en mí. Hemos crecido juntos y compartimos una vida y un proyecto maravilloso en común. Gracias a ti quiero ser cada día mejor persona. Gracias por hacerme tan feliz.

A mis padres, Simón y Montse, que me dieron la feliz infancia que necesitaba para desarrollar todo el potencial que como niña poseía. Ellos son responsables de mis éxitos que disfrutan como el mayor de sus orgullos. Siempre estaré en deuda con vosotros. Gracias a mi querido hermano Simón, por mostrarme que un hermano puede ser además un gran confidente y amigo.

Al Dr. José Uberos Fernández, sin él este trabajo no hubiese existido. Su pasión y disciplina me ayudaron a adentrarme en la Ciencia que envuelve nuestra profesión. Crítico por excelencia, él me ha mostrado que sólo se puede avanzar en nuestra materia a través de poner en duda lo ya establecido o aceptado a nuestro alrededor. Gracias por tu paciencia y gracias por compartir tu sabiduría conmigo.

Una importantísima mención para la Unidad de Gestión de Pediatría del Hospital Universitario San Cecilio de Granada y todos sus integrantes con el Profesor Antonio Muñoz Hoyos a la cabeza. A ellos debo mis comienzos como Pediatra. En ellos encontré a una segunda familia; con ellos me he formado y he podido disfrutar de lo apasionante que es nuestra profesión. Ahora que se avecinan cambios importantes en la estructura de la Pediatría hospitalaria en Granada, es especialmente relevante recordar que el espíritu del equipo de profesionales de pediatría del Hospital San Cecilio, ha formado a generaciones y generaciones de pediatras bajo unos férreos valores de compromiso, sacrificio, curiosidad y humanidad. Todas esas enseñanzas vitales las intento poner en práctica cada día, tanto en el trabajo como en mi vida personal.

De nuevo agradecer al Profesor Antonio Muñoz Hoyos su profesionalidad, honestidad y capacidad de trabajo y al profesor Eduardo Narbona López su increíble y contagioso entusiasmo por los recién nacidos más vulnerables.

Gracias a las Unidades de Neonatología y Pediatría de Imperial College por acogerme y motivarme a seguir aprendiendo e investigando.

Gracias al Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) por la financiación dedicada a la realización de este proyecto.

Al equipo de trabajo que ha llevado a cabo los estudios de estabilidad integrado por: Luis Fermín Capitán, Doctor en Química y Catedrático de la Universidad de Granada; Antonio Salmerón García, Doctor en Farmacia; Natalia Navas Iglesias, Doctora en Química y Profesora Titular de la Universidad de Granada; José Cabeza Barrera, Licenciado en Farmacia y Jefe de Servicio del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, y Raquel Ortega López, Licenciada en Química y Becaria para la realización del estudio.

También deseo expresar mi agradecimiento a Antonio Segura Carretero, Catedrático de Química y Analítica de la universidad de Granada y Coordinador del CIDAF y a todo su equipo por su inconmensurable ayuda en la caracterización del arándano.

Mi agradecimiento a Gunter Haesaerts, Director de Pharmatoka por el apoyo prestado en la elaboración del jarabe de arándano y a la Doctora Amy Howell de la Rutgers University, New Jersey por la colaboración en la determinación de la bioactividad de este apasionante fruto.

Finalmente, gracias a la Doctora Tarja Nurmi, de la Universidad de Kuopio, Finlandia; por su imprescindible ayuda para la determinación de ácidos fenólicos en la orina de nuestros pacientes.

Si ser Médico  
es entregar la vida  
a la misión elegida.

Si ser médico  
es no cansarse nunca de estudiar  
y tener, todos los días, la humildad  
de aprender la nueva lección  
de cada día.

Si ser médico  
es hacer de la ambición, nobleza  
del interés, generosidad  
del tiempo, destiempo  
y de la ciencia, servicio  
al hombre, que es hijo de dios.  
Si ser médico es amor, infinito amor  
a nuestro semejante y acogerlo,  
sea quien sea, con el corazón  
y el alma abiertos de par en par.

Entonces, ser médico  
es la divina ilusión de que  
el dolor, sea goce;  
la enfermedad, salud  
y la muerte, vida.

G. Marañón



### **3. DIRECCIÓN Y CERTIFICADOS**



---

**DIRECCIÓN Y CERTIFICADOS**

---

**ANÁLISIS DE LA EFICACIA DEL CRANBERRY Y  
CONCENTRACIÓN URINARIA DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LA  
PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN URINARIA RECURRENTE  
INFANTIL**

**MEMORIA PRESENTADA PARA ASPIRAR  
AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA  
POR**

**Rocio Rodríguez Belmonte**

Fdo. Rocio Rodríguez Belmonte

Dr. D. Jose Uberos Fernandez

*Doctoranda*

*El director de la tesis doctoral*



Universidad de Granada



**D. José Uberos Fernández**, Doctor en Medicina por la Universidad de Granada y profesor asociado en Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.

**CERTIFICA:** Que Dña. Rocio Rodríguez Belmonte, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado su Trabajo de Investigación Prospectivo para la confección de la Memoria de TESIS DOCTORAL, bajo mi dirección sobre el tema: “**Análisis de la eficacia del cranberry y concentración urinaria de ácidos fenólicos en la prevención de la infección urinaria recurrente infantil**”, la que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada.

Granada, 1 de Diciembre de 2016  
Dr. D. J. Uberos Fernández



**ANÁLISIS DE LA EFICACIA DEL CRANBERRY Y  
CONCENTRACIÓN URINARIA DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LA  
PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN URINARIA RECURRENTE  
INFANTIL**



**MEMORIA PRESENTADA PARA ASPIRAR  
AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA  
POR  
Rocio Rodríguez Belmonte**

Fdo. Rocio Rodríguez Belmonte

Dr. D. Antonio Muñoz Hoyos

*Doctoranda*

*El director de la tesis doctoral*



Universidad de Granada



**D. Antonio Muñoz Hoyos**, Doctor en Medicina por la Universidad de Granada y profesor asociado en Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.

**CERTIFICA:** Que Dña. Rocio Rodríguez Belmonte, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado su Trabajo de Investigación Prospectivo para la confección de la Memoria de TESIS DOCTORAL, bajo mi dirección sobre el tema: “**Análisis de la eficacia del cranberry y concentración urinaria de ácidos fenólicos en la prevención de la infección urinaria recurrente infantil**”, la que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada.

Granada, 1 de Diciembre de 2016  
Dr. D. A. Muñoz Hoyos



## **4. PUBLICACIONES**



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)

## Phenolic acid content and antiadherence activity in the urine of patients treated with cranberry syrup (*Vaccinium macrocarpon*) vs. trimethoprim for recurrent urinary tract infection

J. Uberos <sup>a,\*</sup>, R. Rodríguez-Belmonte <sup>b</sup>, C. Rodríguez-Pérez <sup>c,d</sup>,  
M. Molina-Oya <sup>a</sup>, E. Blanca-Jover <sup>a</sup>, E. Narbona-Lopez <sup>a</sup>,  
A. Muñoz-Hoyos <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unit of Clinical Paediatrics, San Cecilio University Hospital, 18012 Granada, Spain

<sup>b</sup> Unit of Clinical Paediatrics, St Mary's Hospital, Imperial College NHS Trust, Praed Street, QEQM Wing, 7th floor, London W2 NY1, UK

<sup>c</sup> Research and Development Functional Food Centre (CIDAF), Health Science Technological Park, Avenida del Conocimiento s/n, Edificio BioRegión, 18017 Granada, Spain

<sup>d</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 May 2015

Received in revised form 19 July 2015

Accepted 17 August 2015

Available online

#### Keywords:

Phenolic acid

Cranberry

Urinary tract infection

Biofilm

Surface hydrophobicity

*E. coli*

### ABSTRACT

The effectiveness of cranberry in the treatment of urinary tract infection (UTI) has been associated with its polyphenol content, particularly proanthocyanidins (PACs) and the inhibition of adherence of *Escherichia coli* to the uroepithelium. This paper describes a controlled, double blind, clinical trial of children aged over one month with recurrent urinary tract infection. The study aims were to evaluate the safety and efficacy of cranberry syrup in children and to investigate the relationship between the excretion of phenolic acids in urine with the antiadherent activity of cranberry syrup.

In the study population, cranberry syrup was found to be similar to trimethoprim, with a rate of UTI (reinfection) of 26% (95% CI 12–41). The administration of cranberry syrup was associated with high levels of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in urine; in both cases these molecules present activity in the biofilm inhibition or reduction of surface hydrophobicity of *E. coli* (Clinical Trials Registry ISRCTN16968287).

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The evidence currently available supports the long-term use of antibiotics in subtherapeutic doses to control recurrent

urinary tract infection (UTI) (Jepson, Williams, & Craig, 2012). However, a major problem in this respect is the resulting increase in bacterial resistance to antibiotics and the selection of multiresistant bacterial flora (Gupta, 2003). Trimethoprim, which is frequently used in the treatment of UTI, is eliminated

\* Corresponding author. Unit of Clinical Paediatrics, San Cecilio University Hospital, Avda. Dr. Oloriz 16, 18012 Granada, Spain. Tel.: +34 958 023411.

E-mail address: [juberos@ugr.es](mailto:juberos@ugr.es) (J. Uberos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.08.009>

1756-4646/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

primarily by the kidney after glomerular filtration and tubular secretion. Concentrations of trimethoprim are considerably higher in urine than in the blood. After oral administration, 50–60% of trimethoprim is excreted in the urine within 24 hours, approximately 80% of this being unmetabolised trimethoprim. Trimethoprim blocks the production of tetrahydrofolic acid from dihydrofolic acid by binding to and reversibly inhibiting the required enzyme, dihydrofolate reductase. This binding is much stronger for the bacterial enzyme than for the corresponding mammalian enzyme. Thus, trimethoprim selectively interferes with the bacterial biosynthesis of nucleic acids and proteins. Most studies have focused on changes occurring *in vitro*, leaving unresolved certain questions regarding the clinical significance *in vivo*. Various authors have used a murine urinary tract infection model to explore the potential impact of low-dose antibiotics on pathogenesis. It has been shown, using *in vitro* models, that subinhibitory antibiotics prime uropathogens for adherence and invasion (Goneau et al., 2015; Uberos, Augustin, Liebana, Molina, & Munoz-Hoyos, 2001).

Other studies have reported the usefulness of cranberry in treating recurrent UTI, in both adults and children (Beerepoot et al., 2011; Uberos et al., 2012). Cranberry extract contains at least two chemical constituents that have been associated with antiadherent properties: on the one hand, fructose inhibits the adherence of the type 1 fimbriae of some bacteria to the epithelium (Zafri, Otek, Adar, Pocino, & Sharon, 1989); on the other, proanthocyanidins (PACs) inhibit the adherence of *P. fimbriated Escherichia coli* to the urothelium (Foo, Lu, Howell, & Vorsa, 2000; Miyazaki et al., 2002). Studies have established that after the ingestion of cranberry, the concentrations of PACs in urine are at the limits of detectability (Iswaldi et al., 2013), although some metabolites derived from PACs, such as phenolic acids, do present varying concentrations of PACs in the urine (Fernandez-Puentes et al., 2015).

The recurrence of UTI after pyelonephritis can reach 20% (Garín et al., 2006). It has been recommended (American Academy of Pediatrics, Committee on Quality Improvement Subcommittee on Urinary Tract Infection, 1999) that all cases of UTI in children aged two months to two years, after antibiotic treatment for a period of 7–14 days, should be treated with antibiotics until imaging studies are completed. However, later evidence (Garín et al., 2006; Mathews et al., 2009) suggests that antibiotic prophylaxis does not reduce renal scarring, even in patients with high-grade reflux, and so its usefulness has been questioned.

Other studies (Craig et al., 2009) have shown that paediatric patients with recurrent UTI who are treated with trimethoprim-sulphamethoxazole at low doses experienced a 6% reduction in the risk of UTI compared with a placebo group (95% CI: 1–11).

In the present study, we consider the antiadherent properties of the urine of patients included in a clinical trial and treated with cranberry syrup vs. trimethoprim for the treatment of recurrent UTI, through an analysis of phenolic acid excretion in urine and its association with: 1) the alteration of surface hydrophobicity and, 2) with the inhibition of biofilm formation by *E. coli*.

## 2. Materials and methods

The study is based on a Phase III randomised double-blind intervention, with two branches: one with cranberry extract in a 3% glucose syrup and the other with trimethoprim. Over a period of two years, children aged 1 month to 13 years, treated at the nephrology and urology departments of our hospital, were recruited to the study population. The maximum follow up of each such patient was one year. The trial was approved by the local ethics committee and in all cases written informed consent was obtained from the parents of the patients.

The inclusion criteria applied were a history of recurrent UTI (more than two episodes of infection in the last six months) with or without vesicoureteral reflux of any grade. Exclusion criteria were the coexistence of UTI with other infectious diseases, the coexistence of metabolic diseases, chronic renal failure, kidney stones, liver failure, allergy or intolerance to any of the components of cranberry syrup or trimethoprim, the coexistence of blood dyscrasias and the manifest wish of the person legally responsible not to participate in the study.

The cranberry extract was provided by a branded supplier and administered in the form of a 3% glucose syrup (Urell®, Pharmatoka, Labs, Rueil-Malmaison, France). The trimethoprim was administered in a mask suspension of glucose syrup at a concentration of 8 mg/mL and CC-1000-WS (E-120) (Lab. CHR-Hansen S.L.; Tres Cantos, Madrid, Spain) had been added, at a concentration of 0.1% (in no case exceeding the permitted level of 100 ppm carmine).

The experimental group received an evening dose of 0.2 mL/kg of cranberry syrup (equivalent to 5.6 mg/kg of cranberry extract). The control group received an evening dose of 0.2 mL/kg (1.6 mg/kg of trimethoprim). The product was administered before dinner, and if vomiting occurred within 30 minutes, administration of the full dose was repeated. At all times, the intention to treat principle was maintained.

In the follow up process, periodic reviews were performed every two months or when requested by the patient if symptoms so required. The patients were instructed to perform a urine culture in their health centres if fever, urinary symptoms, vomiting or weight loss occurred. UTI was confirmed by a pathological urinary sediment (more than 20 leucocytes per field) and urine culture (>100,000 CFU/mL) from a clean-catch urine sample or a sample collected into a urine collection bag, after chlorhexidine antiseptics of the urethral meatus, or more than 10,000 CFU/mL if the urine was obtained after catheterisation.

The urine culture was always performed before starting any antibiotic treatment. The following data were recorded: the number assigned to the intervention, the clinical and analytical results of each scheduled review and the results of the periodic urine cultures. The effectiveness of an intervention was assessed in terms of the time the patient remained in the study without presenting a recurrent UTI. When such an infection took place, causing the patient to leave the study, the time of its occurrence was recorded.

To calculate the sample size required, we assumed a 20% risk of recurrence of UTI during the first year of antibiotic treatment (Garín et al., 2006). The main hypothesis tested in this study is that treatment with cranberry syrup is equivalent to

treatment with trimethoprim. An equivalence limit of  $\pm 10\%$  was assumed. The alpha error was assumed to be 5% and the power of the study, 80%. With these data, a sample size of 109 patients per group was found to be required.

### 2.1. Controlling for bias

False positive or false negative results may be obtained from the urine cultures, and the possibility of information bias from this source must be taken into account. Thus, a negative urine culture may be obtained from a patient who actually has a UTI if they received antibiotic treatment before the urine sample was collected. Therefore, all patients were advised of the need to obtain a urine culture, preferably by catheterisation, in the event of any type of fever and before starting any antibiotic treatment. On the other hand, a positive urine culture may be obtained by an inadequate technique in collecting the urine, producing contamination of the sample. A urine culture that is positive to more than one micro-organism, together with normal urinary sediment, is considered contaminated and the test should be repeated.

### 2.2. Urine sample preparation and cranberry syrup characterisation

For infants, the first morning urine was collected in a collecting bag. For older children, it was collected by spontaneous urination, in both cases after thorough washing of the genital area. The urine was centrifuged at 4000 g for 10 minutes, and the supernatant was extracted and stored at  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  until required for processing.

The cranberry syrup was characterised at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada (Iswaldi et al., 2012), and provided as a dispersion of 2.8% cranberry extract (Gykactan®) in glucose syrup. The composition of the cranberry syrup, with respect to its different polyphenol fractions, has been published previously (Iswaldi et al., 2012). The composition of the cranberry syrup used in our study is shown in Table 1.

### 2.3. Determination of phenolic acids and antiadherent properties in urine

Levels of phenolic acid in urine were determined in urine samples from 57 randomly-chosen patients from the ISRCTN16968287 clinical assay, at the Institute of Public Health and Clinical Nutrition, Kuopio, Finland. Of these 57 patients, 32 received trimethoprim and 25 patients received cranberry syrup.

The following phenolic acids, with diverse benzoic, acetic, propionic and cinnamic acid derivatives, were analysed: *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, syringic, gallic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, *m*-hydroxyphenylacetic, homovanillic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, *m*-hydroxyphenylpropionic, dihydroferulic, dihydroisoferulic, caffeic, ferulic, sinapinic, isoferulic, *p*-coumaric and *m*-coumaric. These compounds cover a wide range of metabolites and dietary phenolic acids; they constitute a fragmentation product of procyanidins (Déprez et al., 2000; Gonthier, Donovan et al., 2003; Wiese et al., 2015) and were measured to evaluate fragmentation into other

phenolic metabolites. Analysis of phenolic acids also provides information about the fragmentation of flavonols and catechins (Rios et al., 2003; Russell & Duthie, 2011; Ward, Croft, Puddey, & Hodgson, 2004). The phenolic acids in the cranberry syrup samples were first hydrolysed with enzymes (obtained from Helix Pomatia; BioSeptra, France) and then with sodium hydroxide.

#### 2.3.1. Bacterial strains, media and growth conditions

Four strains of uropathogenic *E. coli* (787, 472, 695 and 629) were used, obtained from patients with acute pyelonephritis, together with two strains of *E. coli* obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT): CECT 4076 (Serovar. O157:H7, originally isolated from haemorrhagic colitis) and CECT 417 (SupE44(am), mutant tRNA).

#### 2.3.2. Inhibiting the formation of biofilm (Stepanovic, Vukovic, Dakic, Savic, & Svabic-Vlahovic, 2000)

The strains were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 hours in glass tubes with 2.5 mL of tryptic soy broth (TSB) culture medium. A volume of 0.5 mL of each such culture and 50  $\mu\text{L}$  of the urine to be studied was then introduced into a 2 mL Eppendorf tube. The negative control used was an Eppendorf tube with an equal amount of TSB without inoculum; the positive control was 0.5 mL of the bacterial suspension in a similar tube together with 50  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer saline (PBS). After 24 hour incubation, the content of each tube was carefully aspirated with a pipette and the tubes were washed three times with 1 mL of PBS. The tubes were air dried and 200  $\mu\text{L}$  of 99% methanol were added as a fixative. It was left to react for 15 minutes, after which the excess was discarded and the tubes allowed to air dry. As a colorant, 0.2 mL of Hucker's crystal violet solution (2% dye content) was added and left to act for 5 minutes. The supernatant was then discarded by immersing the tubes in a trough containing distilled water. After air drying, 1 mL of 33% acetic acid was added. The optical density (OD) of the suspension in each tube was measured at 570 nm, and the zero measure was adjusted with 33% acetic acid. The results obtained are expressed as ( $\Delta$  biofilm), which is the ratio between the OD of the strain incubated with the urine sample and the OD of the strain after incubation with an equal volume of PBS.

#### 2.3.3. Determining surface hydrophobicity by analysis of salt aggregation

The biological activity on surface hydrophobicity by the polyphenol content of the urine was analysed by the aggregation technique with ammonium sulphate, following the technique described by Lindahl, Paris, Wadstrom, and Hjerten (1981). The *E. coli* culture was performed in 2 mL of TSB medium, as specified above, to enhance the expression of P-type fimbriae, after washing three times with PBS and centrifuging at 4000 g for 10 minutes. It was then resuspended in 0.002 M sodium phosphate (OD 1 at 540 nm). Ten microlitres of the urine sample were taken and incubated for 30 minutes at room temperature in a rotary shaker with 100  $\mu\text{L}$  of the bacterial suspension of the selected strains, in PBS. Several solutions of ammonium sulphate were then prepared, at osmolarities of 0.2–4.0 M, in sodium phosphate, 0.002 M. Then, 10  $\mu\text{L}$  of the bacterial suspension were mixed on a slide with an equal volume of ammonium sulphate solution. The presence of aggregation

**Table 1 – Phenolic compounds in cranberry syrup, expressed in  $\mu\text{g/mL}$  of syrup (n = 5).**

Class/phenolic compounds	$\mu\text{g/mL}$ cranberry syrup
<i>Phenolic acid derivatives</i>	
Coumaroylglucose/p-Coumaric acid 4-O-glucoside	113.39 $\pm$ 4.11
1-O-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose/4-O- $\beta$ -D-Glucosyl-sinapate	21.44 $\pm$ 0.73
Caffeoyl glucose	39.27 $\pm$ 1.24
Chlorogenic acid	38.70 $\pm$ 1.07
p-Coumaroyl-glucose	80.35 $\pm$ 2.31
Canthoside A	3.23 $\pm$ 0.08
2-Hydroxybenzoic acid	98.79 $\pm$ 2.95
Gallic acid 3-O-gallate	116.72 $\pm$ 3.46
<i>Flavonols</i>	
Myricetin 3-O-galactoside/glucoside	251.74 $\pm$ 9.74
Dihydro Ferulic Acid 4-O- $\beta$ -D-Glucuronide	47.92 $\pm$ 2.42
Myricetin 3-O-arabinoside	453.26 $\pm$ 17.65
Caviunin glucoside	594.61 $\pm$ 26.87
Quercetin 3-O-galactoside/glucoside	782.27 $\pm$ 38.59
Quercetin 3-O-xylopiranoside	136.27 $\pm$ 4.74
Quercetin 3-O-arabinopyranoside	132.78 $\pm$ 4.34
Quercetin 3-O-arabinofuranoside	241.06 $\pm$ 8.63
Quercetin 3-O-rhamnoside	261.02 $\pm$ 8.46
Myricetin	229.57 $\pm$ 7.59
Methoxyquercetin 3-O-galactoside	nq
Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-(6"-p-hydroxybenzoyl)-galactopyranoside	61.40 $\pm$ 2.78
Quercetin	606.54 $\pm$ 25.63
Syringetin	49.45 $\pm$ 1.67
<i>Proanthocyanidins</i>	
Procyanidin B-type	405.68 $\pm$ 14.78
(+)-Catechin	748.63 $\pm$ 30.86
Procyanidin A2 isomer 1	728.05 $\pm$ 29.78
Procyanidin B-type	431.28 $\pm$ 18.21
Procyanidin A2 isomer 2	713.98 $\pm$ 25.77
Procyanidin A2 isomer 3	1288.74 $\pm$ 99.42
Prodelfhinidin B4	419.97 $\pm$ 14.74
<i>Isoflavonoids</i>	
Biochanin A 7-O-glucoside	nq
<i>Coumarins</i>	
7-Hydroxycoumarin	493.83 $\pm$ 17.54
Coumarin	349.80 $\pm$ 12.43
Scopoletin	899.99 $\pm$ 39.64
<i>Anthocyanin</i>	
Petunidin	19.17 $\pm$ 5.81
<i>Total</i>	10,858.91 $\pm$ 389.62

nq, not quantified.

was observed after one minute at room temperature. Note was taken of the lowest concentration of ammonium sulphate that produced visible aggregation on the slide after gentle manual rotation for 30 seconds. Aggregation with 4M solutions was interpreted as 0% hydrophobicity, and aggregation with 0.2M solutions was interpreted as 95% hydrophobicity. The results obtained are expressed as  $\Delta$  hydrophobicity, which is the ratio of the hydrophobicity of the strain incubated with the urine sample and the hydrophobicity of the strain after incubation with an equal volume of PBS (Table 2).

#### 2.4. Statistical analysis

The statistical analysis of patient follow-up took the form of a Kaplan–Meier survival analysis, in which the appearance of the study event (UTI) concluded the follow-up period. Cases of voluntary withdrawal from the study or of departure from

causes other than UTI were considered to be censored for the rest of the monitoring period. The Kaplan–Meier curves for the experimental intervention and for the standard treatment were compared. Another comparison was made of the urinary excretion of polyphenols in each of the study groups, using a t-test

**Table 2 – Mean adherence (biofilm formation) and hydrophobicity of the strains of *E. coli* studied.**

<i>E. coli</i> strains	$\Delta$ adh	% Hydrophobicity
4076	1.74	90
471	0.97	95
787	1.38	95
695	1.30	80
417	1.05	95
629	1.13	85
Total	1.26 (DS 0.27)	90 (DS 6.3)

for independent samples. Linear and multiple linear regression analyses were performed for the excretion of the different phenolic acids in urine and for the antiadherent properties of the urine samples.

The clinical analysis of non-inferiority was conducted by considering the difference in UTI prevalence between the two study branches (d), taking into account the standard error in each case (SEt), in accordance with the following expression:

$$SEt = \sqrt{\frac{SE(\text{cranberry})}{n1} + \frac{SE(\text{trimethoprim})}{n2}}$$

where SE is the standard error for each treatment branch. The equivalence limits were calculated as  $\pm 0.10$  (10%)  $\rightarrow \delta_L = -0.10$ ,  $\delta_U = 0.10$ ; for a value  $Z_{\alpha} = 1.96$ .

The test of non-inferiority for trimethoprim vs. blueberry was analysed using the following unilateral hypothesis:

$$H1_L = Pr_{\text{cranberry}} - Pr_{\text{trimethoprim}} > \delta_L \rightarrow H0_L \\ = Pr_{\text{cranberry}} - Pr_{\text{trimethoprim}} \leq \delta_L$$

$$\text{which is evidenced by } Z_L = \frac{d - \delta_L}{SEt} \geq Z_{\alpha}$$

$$H1_U = Pr_{\text{cranberry}} - Pr_{\text{trimethoprim}} > \delta_U \rightarrow H0_U \\ = Pr_{\text{cranberry}} - Pr_{\text{trimethoprim}} \geq \delta_U$$

$$\text{which is evidenced by } Z_U = \frac{d - \delta_U}{SEt} \leq -Z_{\alpha}$$

### 3. Results

#### 3.1. Effectiveness of cranberry syrup in preventing the recurrence of urinary infection

The following subjects were recruited to the study: 85 children under 1 year of age, 53 of whom were treated with trimethoprim and 32 with cranberry syrup; 107 children over 1 year of age, 64 of whom were treated with trimethoprim and 43 with cranberry syrup.

Among the children under 1 year of age, the rate of UTI associated with trimethoprim treatment was 19% (95% CI 4–35) in the boys and 43% (95% CI 18–68) in the girls. In the children under 1 year of age, the rate of UTI associated with cranberry syrup treatment was 46% (95% CI 23–70) in the boys and 17% (95% CI 0–38) in the girls. Irrespective of sex, the rate of UTI in the patients receiving trimethoprim was 28% (95% CI 13–42) and 35% (95% CI 17–52) in those receiving cranberry syrup.

Overall, the children over 1 year of age had a rate of UTI of 35% (95% CI 21–50) among those receiving trimethoprim and of 26% (95% CI 12–41) among those receiving cranberry syrup. By gender, the boys who received trimethoprim had an infection rate of 33% (95% CI 1.8–65) compared with 8% (95% CI 0–26) for those receiving cranberry syrup.

The CONSORT diagram (Fig. 1) shows the adverse events detected in the children (both groups: those aged under 1 year and those aged over 1 year) during the follow-up period. There

were notably few adverse reactions, and none at all among the children aged under 1 year.

The recurrent episodes of UTI were caused by *E. coli* in 60% of the cases, with no significant differences between the two treatment groups. 33.3% of the patients receiving trimethoprim presented urine cultures that were positive for multi-resistant bacteria, versus 22.9% of those receiving cranberry syrup.

For the sample as a whole,  $Z_L = 2.04 > Z_{\alpha}$  and  $Z_U = -1.65 > -Z_{\alpha}$ ; therefore, we conclude that cranberry syrup treatment is similar to trimethoprim treatment. In infants aged under 1 year, we obtained  $Z_L = 0.69 < Z_{\alpha}$  and  $Z_U = -1.9 > -Z_{\alpha}$ ; accordingly, we find that in these infants, the cranberry syrup treatment, at the dose administered, is inferior to trimethoprim.

#### 3.2. Urinary excretion of phenolic acids, with respect to biofilm formation and surface hydrophobicity of *E. coli*

Table 3 shows the concentrations of phenolic acids recorded for the first morning urine samples from patients receiving trimethoprim or cranberry syrup treatment (a single evening dose) for UTI. There were significant differences in the urinary levels of ferulic acid and of *m*-hydroxybenzoic acid.

Simple linear regression analysis revealed a significant association between surface hydrophobicity and *m*-hydroxybenzoic acid, and multiple regression analysis enabled us to derive a predictive model with  $R^2 = 0.45$  ( $F = 8.3$ ;  $p < 0.001$ ) that included *m*-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid and homovanillic acid ( $y = 0.74 - 0.05 \times m\text{-hydroxybenzoic acid} - 0.03 \times 3,4\text{-dihydroxyphenylpropionic acid} + 0.003 \times \text{homovanillic acid}$ ).

According to the simple linear regression analysis, the inhibition of biofilm formation by *E. coli* is associated with the concentration of isoferulic acid in urine. Multiple regression analysis produced a predictive model that incorporated isoferulic acid and ferulic acid with  $R^2 = 0.26$  ( $F = 5.49$ ;  $p < 0.01$ ) ( $y = 0.65 + 0.05 \times \text{isoferulic acid} - 0.01 \times \text{ferulic acid}$ ).

### 4. Discussion

Our study confirms that cranberry syrup is similar to trimethoprim treatment for recurrent UTI in children and infants, although in the latter case its effectiveness is considered inferior to that of trimethoprim at the doses used in our study. Furthermore, we find that cranberry syrup treatment at this dose is safe in infants and children.

In 1984, Sobota (1984) observed that cranberry interferes with the adhesion of P-fimbriated *E. coli* to the epithelium, and showed that this could be one of the main mechanisms accounting for the non-adherent effect of cranberry. Two mechanisms may be involved in this process: a) the fructose present in many fruit juices, including cranberry, may also inhibit the adhesion of *E. coli* mediated by type 1 fimbriae (Zafriti et al., 1989); b) the adherence mediated by P fimbriae has been associated with the lectin-specific  $\alpha\text{-Gal}(1-4)\beta\text{-Gal}$  present in the urothelium, which is not inhibited by the addition of fructose (Di Martino et al., 2006; Salminen et al., 2007). Foo et al. (2000) identified trimeric proanthocyanidins and type A dimeric procyanidins as responsible for the antiadherent effect of

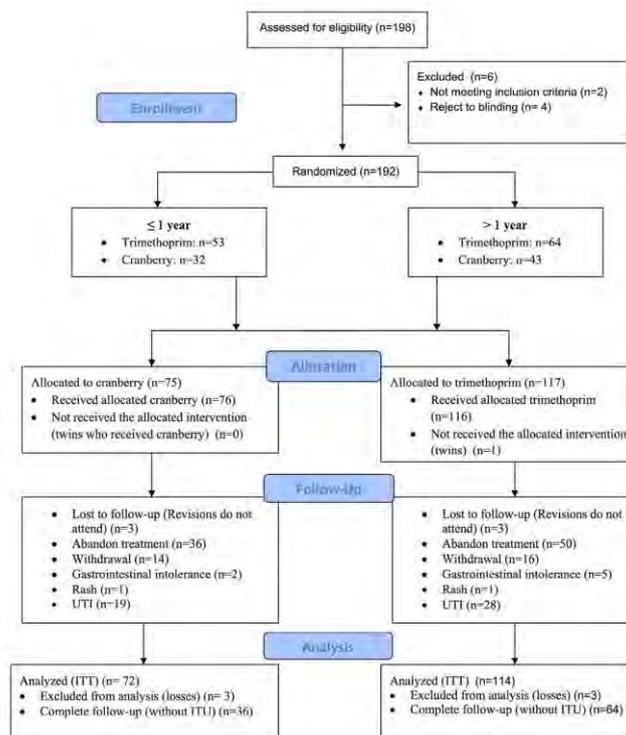


Fig. 1 – Flow diagram of the clinical trial.

**Table 3 – Phenolic acid content (mean (SD)) in the first morning urination of patients receiving nocturnal trimethoprim or cranberry treatment. Duplicate measurements. We observed levels of ferulic, isoferulic and *m*-hydroxybenzoic acids in patients taking cranberry.**

( $\mu\text{Mol/g creatinine}$ )	Cranberry	Trimethoprim
Protocatechuic acid	3.6 (2.9)	4.1 (4.1)
Syringic acid	1.3 (2.6)	0.5 (0.7)
Caffeic acid	1.2 (2.6)	0.6 (2.4)
Ferulic acid	13.5(16.1)*	7.8 (9.8)
Sinapinic acid	0.7 (4.2)	0.02 (0.2)
<i>p</i> -Coumaric acid	1.6 (4.4)	0.5 (1.2)
Isoferulic acid	4.3 (5.4)**	2.6 (4.0)
Dihydroferulic acid	4.9 (9.6)	4.7 (7.4)
3,4-dihydroxyphenylpropionic acid	2.3 (3.4)	3.3 (5.2)
<i>m</i> -Hydroxyphenylpropionic acid	4.4 (16.2)	1.9 (4.0)
<i>p</i> -Hydroxyphenylpropionic acid	0.9 (5.1)	1.2 (9.3)
Homovanillic acid	94.9 (50)	77.8 (38)
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	23.7 (16.8)	25.0 (18)
<i>m</i> -Hydroxyphenylacetyl acid	36.5 (50)	24.4 (31)
<i>p</i> -Hydroxyphenylacetyl acid	334 (355)	308 (328)
Vanillic acid	141 (154)	185 (440)
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	4.47 (3.1)*	1.98 (4.0)
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	34 (24)	33 (43)
Total phenolic acid	696 (598)	685 (668)

\*  $P < 0.05$ .\*\*  $P < 0.01$ .

**Table 4 – Linear regression analysis – B coefficient and the standard error (SE) – of the variability of surface hydrophobicity and the inhibition of biofilm formation by *E. coli* in the urine samples and the corresponding phenolic acid content. In patients receiving cranberry the increment of urine levels of caffeic, 3,4-dihydroxy-phenylpropionic and *m*-hydroxybenzoic acids associated with decrease in surface hydrophobicity of *E. coli*.**

	Δ Hydrophobicity			Δ Biofilm inhibition		
	Cranberry	Trimethoprim	Total	Cranberry	Trimethoprim	Total
Protocatechuic acid	0.004 (0.13)	-0.012 (0.02)	-0.09 (0.01)	-0.016 (0.013)	-0.011 (0.024)	-0.01 (0.01)
Syringic acid	0.009 (0.15)	0.01 (0.12)	0.002 (0.002)	0.005 (0.015)	-0.06 (0.106)	-0.004 (0.02)
Caffeic acid	-0.07* (0.02)	0.019 (0.01)	0.009 (0.01)	0.023 (0.033)	-0.003 (0.02)	0.0001 (0.01)
Ferulic acid	0.001 (0.003)	0.002 (0.009)	0.003 (0.004)	0.003 (0.003)	-0.001 (0.01)	0.001 (0.004)
Sinapinic acid	0.002 (0.008)	0.000 (0.000)	0.007 (0.01)	0.003 (0.007)	0.000 (0.000)	0.001 (0.01)
<i>p</i> -Coumaric acid	-0.07 (0.04)	0.106 (0.116)	0.01 (0.06)	0.042 (0.05)	0.21 (0.11)	0.09 (0.05)
Isoferulic acid	-0.01 (0.01)	0.044* (0.02)	0.01 (0.01)	0.012 (0.01)	0.05* (0.02)	0.02* (0.01)
Dihydroferulic acid	0.000 (0.000)	-0.007 (0.011)	-0.01 (0.007)	-0.002 (0.01)	-0.005 (0.008)	-0.003 (0.006)
3,4-dihydroxy-phenylpropionic acid	-0.03* (0.01)	-0.01 (0.01)	-0.01 (0.008)	0.005 (0.018)	-0.007 (0.012)	-0.003 (0.008)
<i>m</i> -Hydroxy-phenylpropionic acid	0.001 (0.01)	-0.006 (0.01)	-0.007 (0.01)	-0.006 (0.012)	0.014 (0.014)	0.01 (0.009)
<i>p</i> -Hydroxy-phenylpropionic acid	0.04 (0.11)	0.000 (0.000)	0.11 (0.18)	0.118 (0.109)	0.000 (0.000)	0.08 (0.17)
Homovanillic acid	0.002 (0.002)	0.001 (0.002)	0.001 (0.001)	-0.002 (0.002)	0.002 (0.002)	0.001 (0.001)
3,4-Dihydroxy-phenylacetic acid	0.005 (0.007)	0.001 (0.003)	-0.001 (0.003)	-0.012 (0.006)	0.0001 (0.003)	0.0001 (0.003)
<i>m</i> -Hydroxy-phenylacetic acid	0.001 (0.001)	-0.001 (0.003)	0.0001 (0.001)	0.0001 (0.002)	0.004 (0.003)	0.002 (0.002)
<i>p</i> -Hydroxyphenyl-acetic acid	0.0001 (0.0001)	0.001 (0.001)	0.0001 (0.001)	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.0001)
Vanillic acid	0.0001 (0.0001)	0.001 (0.001)	0.0001 (0.0001)	-0.001 (0.0001)	0.001 (0.001)	0.0001 (0.0001)
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	-0.043* (0.02)	-0.045* (0.02)	-0.05** (0.01)	-0.08 (0.01)	-0.018 (0.023)	-0.01 (0.18)
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.004 (0.003)	-0.002 (0.002)	-0.002 (0.002)	0.0001 (0.003)	-0.001 (0.002)	0.0001 (0.002)
Total phenolic acid	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.001)	0.001 (0.001)	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.0001)

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

cranberry. These polyphenolic flavonols are not present in other extracts rich in polyphenols, such as green tea or chocolate. The cranberry syrup used in our test contained 22% type A proanthocyanidins, an aspect of interest in the comparison of our results with those reported elsewhere, given the considerable variability in the concentrations of proanthocyanidin measured in different berry extracts (Latti, Kainulainen, Hayirlioglu-Ayaz, Ayaz, & Riihinen, 2009) (Foo et al., 2000). The systematic review by Jepson et al. (2012) of ten studies, with a total of 1049 patients, concluded that cranberry compared to placebo/control significantly reduced the incidence of UTI during 12 month follow-up (RR 0.65; 95% CI 0.46–0.90). Cranberry more effectively reduced the incidence of recurrent UTI in women than in men and older women, and in patients requiring catheterisation. Kontiokari et al. (2001) demonstrated the beneficial effect of cranberry in preventing UTI in women, reducing the absolute risk of UTI compared to placebo treatment. Ferrara et al. (2009), in a controlled clinical trial of children aged over three years, found that cranberry, versus placebo, prevented the recurrence of symptomatic urinary infections. Our study is a controlled, randomised, double-blind clinical trial that demonstrates the safety of cranberry in infants and children. Howell et al. (2010) found that the antiadherent activity of cranberry was greater when the concentration of the proanthocyanidin administered with the cranberry exceeded 18 mg. In our own study, in the absence of previous references on the use of cranberry in infants, we decided to extrapolate from the adult dose, and adopted a dose of 0.2 mL of cranberry syrup per kg body weight. Our results show that cranberry syrup treatment is not inferior to trimethoprim when a dose ensuring more than 18 mg PACs is provided, which is the dose per kg body weight that would be administered to an infant aged 1 year. This circumstance would explain the poor

performance obtained for the infants in our study. Since our preliminary results were obtained, the majority of commercial presentations of cranberry have increased the PAC content to levels above the 36 mg considered in our study.

The antiadherent effect of PACs on bacterial adherence has been demonstrated *in vitro* by various authors (Di Martino et al., 2006; Miyazaki et al., 2002; Uberos et al., 2012). However, *in vivo*, PACs are rapidly metabolised in the liver and intestine and the metabolites are eliminated in the urine (Bravo, 1998; Xiao et al., 2009). In a clinical trial of adults, doses 3 times higher than those used in this study were administered, and the level of PACs in the urine could not be quantified (Iswaldi et al., 2013). In total, 32 metabolites were tentatively identified, including methylated and glucuronide conjugated forms. Among these, free phenolic acid derivatives (coumaroyl hexose, dihydroxybenzoic acid, caffeoyl glucose and dihydroferulic acid 4-O-β-D-glucuronide), flavonols (methoxyquercetin 3-O-galactoside, myricetin and quercetin) and one coumarin (scopoletin) were detected in the human urine. The highest concentration of these metabolites in urine is reached at 4 hours after the consumption of cranberry. Further studies are currently in progress, seeking to extend our knowledge of the bioavailability of cranberry-derived polyphenols and to obtain new insights into active metabolites (Iswaldi et al., 2013).

Sublethal doses of antibiotics, including trimethoprim, seem to effectively reduce the surface hydrophobicity of *E. coli* (*in vitro*). This effect has been observed by various authors (Fu, Hasseft, & Cohen, 1989; Uberos et al., 2001), and seems to be related to the alteration of cell wall protein synthesis by the antibiotic.

Phenolic acids are considered to be products of the fragmentation of the procyanidins, flavonols and catechins present in the diet or in cranberry treatment (Déprez et al., 2000; Gonthier, Verny, Besson, Remesy, & Scalbert, 2003). We

recorded levels of ferulic acid and of *p*-coumaric acid that were slightly higher, or at the limit of statistical significance, in the group receiving cranberry. No significant differences were observed in the other phenolic acids studied.

Hydroxybenzoic acid (gallic acid) and hydroxycinnamic acid (ferulic acid) have shown antibacterial properties on *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* (Borges, Ferreira, Saavedra, & Simoes, 2013). Our data corroborate the relation between the increased presence of hydroxybenzoic acid in urine and a decrease in the surface hydrophobicity of *E. coli* (Table 4). Other authors (Sadowska, Paszkiewicz, Podsedek, Redzyna, & Rozalska, 2014) have shown that extracts of *Vaccinium myrtillus* with a high total content of phenolic compounds, especially hydroxycinnamic acid, hydroxybenzoic acid and flavonols, enhance the biocidal potential of vancomycin and linezolid against staphylococci.

Isoferulic acid is a methylated metabolite of chlorogenic acid (CGA). Phenolic compounds such as CGAs are abundantly present in certain foods. CGAs are formed by the esterification of hydroxycinnamic acids, such as caffeic, ferulic and coumaric. Other metabolites of microbial origin, namely, *m*-coumaric acid and derivatives of phenylpropionic, benzoic and hippuric acids, represented the major phenolic compounds in both urine and plasma (Gonthier, Donovan et al., 2003). In accordance with the findings of Borges et al. (2013), our results show that the presence of isoferulic acid in urine is associated with decreased biofilm formation by *E. coli*.

In view of the rapid metabolism *in vivo* of the phenolic compounds in the cranberry, which are subsequently eliminated in the urine, we believe that some metabolites of cranberry, such as hydroxybenzoic acid or hydroxycinnamic acid, may also be responsible for the antibacterial effects described *in vivo*.

#### Acknowledgement

This study was funded by Institute of Health Carlos III (Spain) (P107-0274).

#### REFERENCES

- Beerepoot, M. A., ter Riet, G., Nys, S., van der Wal, W. M., de Borgie, C. A., de Reijke, T. M., Prins, J. M., Koeijers, J., Verbon, A., Stobberingh, E., & Geerlings, S. E. (2011). Cranberries vs antibiotics to prevent urinary tract infections: A randomized double-blind noninferiority trial in premenopausal women. *Archives of Internal Medicine*, 171, 1270–1278.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simoes, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance (Lardmont, N.Y.)*, 19, 256–265.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.
- Craig, J. C., Simpson, J. M., Williams, G. J., Lowe, A., Reynolds, G. J., McTaggart, S. J., Hodson, E. M., Carapetis, J. R., Cranswick, N. E., Smith, G., Irwig, L. M., Caldwell, P. H., Hamilton, S., Roy, L. P., & Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection in Children with Vesicoureteric Reflux and Normal Renal Tracts (PRIVENT) Investigators (2009). Antibiotic prophylaxis and recurrent urinary tract infection in children. *The New England Journal of Medicine*, 361, 1748–1759.
- Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapiere, C., & Scalbert, A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *The Journal of Nutrition*, 130, 2733–2738.
- Di Martino, P., Agniel, R., David, K., Templer, C., Gaillard, J. L., Denys, P., & Botto, H. (2006). Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: A double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. *World Journal of Urology*, 24, 21–27.
- Fernandez-Puentes, V., Uberos, J., Rodriguez-Belmonte, R., Nogueras-Ocana, M., Blanca-Jover, E., & Narbona-Lopez, E. (2015). Efficacy and safety profile of cranberry in infants and children with recurrent urinary tract infection. *Anales de Pediatría (Barcelona, Spain)*, 82, 397–403.
- Ferrara, P., Romaniello, L., Vitelli, O., Gatto, A., Serva, M., & Cataldi, L. (2009). Cranberry juice for the prevention of recurrent urinary tract infections: A randomized controlled trial in children. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 43, 369–372.
- Foo, L. Y., Lu, Y., Howell, A. B., & Vorsa, N. (2000). A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic *P. fimbriated Escherichia coli*. *Journal of Natural Products*, 63, 1225–1228.
- Fu, K., Hassett, D. J., & Cohen, M. S. (1989). Oxidant stress in *Neisseria gonorrhoeae*: Adaptation and effects on L-(+)-lactate dehydrogenase activity. *Infection and Immunity*, 57, 2173–2178.
- Garin, E. H., Olavarria, F., Garcia Nieto, V., Valenciano, B., Campos, A., & Young, L. (2006). Clinical significance of primary vesicoureteral reflux and urinary antibiotic prophylaxis after acute pyelonephritis: A multicenter, randomized, controlled study. *Pediatrics*, 117, 626–632.
- Goneau, L. W., Hanman, T. J., MacPhee, R. A., Schwartz, D. J., Macklaim, J. M., Gloor, G. B., Razvi, H., Reid, G., Hultgren, S. J., & Burton, J. P. (2015). Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity. *MBio*, 6. doi:10.1128/mBio.00356-15, e00356-15 [pii].
- Gonthier, M. P., Donovan, J. L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C., & Scalbert, A. (2003). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 837–844.
- Gonthier, M. P., Verry, M. A., Besson, C., Remesy, C., & Scalbert, A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *The Journal of Nutrition*, 133, 1853–1859.
- Gupta, K. (2003). Emerging antibiotic resistance in urinary tract pathogens. *Infectious Disease Clinics of North America*, 17, 243–259.
- Howell, A. B., Botto, H., Combesure, C., Blanc-Potard, A. B., Gausa, L., Matsumoto, T., Tenke, P., Sotto, A., & Lavigne, J. P. (2010). Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: A multicentric randomized double blind study. *BMC Infectious Diseases*, 10, 94.
- Iswaldí, I., Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., Contreras Mdel, M., Uberos, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Identification of polyphenols and their metabolites in human urine after cranberry-syrup consumption. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 55, 484–492.
- Iswaldí, I., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Roman, D., Uberos, J., Lardón, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2012). Characterization by high-performance liquid

## Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) changes the surface hydrophobicity and biofilm formation of *E. coli*

Jose Uberos<sup>1</sup>, Ishan Iswaldi<sup>2</sup>, Rocio Rodríguez Belmonte<sup>1</sup>, Antonio Segura-Carretero<sup>2</sup>, Verónica Fernández-Puentes<sup>1</sup>, Antonio Molina-Carballo<sup>1</sup> and Antonio Muñoz-Hoyos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of Granada. <sup>2</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain. Corresponding author email: [uberosfernandez@terra.es](mailto:uberosfernandez@terra.es)

**Abstract:** Cranberry has been shown useful in the prevention of urinary infection by *E. coli*. In this study, we examined the changes in the hydrophobicity of P fimbriated *E. coli* and biofilm formation after incubation with commercial cranberry syrup extract at various concentrations. After incubating a bacterial suspension with cranberry at dilutions of 1:100 and 1:1000, tests of haemagglutination inhibition, surface hydrophobicity and biofilm formation were carried out. The surface hydrophobicity of *E. coli* decreased significantly after incubation with cranberry and this effect was not modified by the culture medium. Biofilm formation was inhibited after incubation with cranberry syrup and this effect was dependent on the culture medium. Thus, in some circumstances cranberry can modify nonspecific adhesive properties of *E. coli*. In previous studies, cranberry has only been implicated in the inhibition of P-fimbriated *E. coli*, but our observations show that it acts by modifying adhesive properties under P-related fimbriae.

**Keywords:** cranberry syrup, *E. coli*, biofilm, hydrophobicity, P-fimbriae

*Microbiology Insights* 2011;4 21–27

doi: [10.4137/MBI.S8526](https://doi.org/10.4137/MBI.S8526)

This article is available from <http://www.la-press.com>.

© the author(s), publisher and licensee Libertas Academica Ltd.

This is an open access article. Unrestricted non-commercial use is permitted provided the original work is properly cited.



## Introduction

Cranberries contain two chemical constituents that have been associated with the prevention of bacterial adherence: fructose (a monosaccharide) and proanthocyanidins (PACs). Fructose inhibits the adherence of mannose sensitive fimbriae to urinary epithelial cells.<sup>1</sup> Various studies have shown that cranberry PACs inhibit the adherence of P fimbriated *E. coli* to the urinary epithelium, while having only slight effect on Type 1 fimbriae.<sup>1,2</sup>

The adherence of *E. coli* to the epithelia is considered the first step in the development of infection, and so the relation between its pathogenic effect and the tissue's attachment capacity is of great importance for subsequent disease development.<sup>3</sup> Oligosaccharide chains containing mannose are frequently found in cell surface glycoproteins, and thus many bacteria have developed fimbriae to adhere to these molecules (Type 1 fimbriae), which can be blocked when mannose is added. Together with the expression of Type 1 fimbriae, some *E. coli* strains express a specific lectin ( $\alpha$ -Gal(1  $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -Gal) associated with P fimbriae, which mediate the specific adherence of *E. coli* to the urinary epithelial cells.<sup>1</sup> Both Type 1 (mannose-sensitive) and Type P (mannose-resistant) fimbriae of *E. coli* are regulated by genes that are localised in the bacterial chromosome, and their expression can be modified depending on the characteristics of the culture medium or of the host's internal medium. Some authors<sup>4</sup> have suggested that *Vaccinium macrocarpon* syrup may induce conformational changes in the surface macromolecules of P fimbriae, reducing both their length and their density. Thus, the expression change of the lectins on the bacterial surface is a determinant factor, on the one hand, in the specific adherence to epithelial cell receptors and, on the other, in modifying certain physical characteristics of the bacteria (hydrophobicity) that favour or hamper its approach to the epithelial surface, and hence its adherence.<sup>5</sup>

Mannose-resistant fimbriae share many characteristics that have previously been related to the colonization factor antigen (CFA), and more recently with P fimbriae. Several studies<sup>1,6,7</sup> have shown that *Vaccinium macrocarpon* syrup inhibits the adherence of uropathogenic *E. coli* to epithelial cells, an effect that has been related with the functionality of P fimbriae (the virulence factor) and, to a lesser

degree, with Type 1 fimbriae.<sup>1</sup> Bacterial attachment to a substratum is the first step in biofilm formation. The contribution of type 1 fimbriae and P to biofilm formation has been studied by several authors and seems to depend on the characteristics of the culture medium, the strain and the surface characteristics.<sup>8</sup> Less information is available on the effects of cranberry on the hydrophobic characteristics of *E. coli* and their ability to form the biofilm.<sup>9</sup>

To date, and to the best of our knowledge, no studies have been made assessing the capacity of cranberry to modify the adherent properties of bacteria that are not related to P fimbriae. The fundamental aim of the present study was to assess whether cranberry may affect the "non-specific" adherence properties of *E. coli*. In addition, we wished to determine whether the inhibition of haemagglutination by cranberry is associated with changes in nonspecific adherence properties vs surface hydrophobicity, adherence to nitrocellulose or biofilm formation by *E. coli*.

## Material and Methods

### Bacterial strains, media and growth conditions

Nine strains of uropathogenic *E. coli* (695, 787, 471, 472, 593, 595, 760, 629 and 607) were used, obtained from patients with acute pyelonephritis, together with 4 strains of *E. coli* obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT): CECT 424 (F- thr- leu- lacY mtl- thi- ara gal ton 2 malA xyl. Resistant to phages T1, T2 and T6.); CECT 4076 (Serovar. O157:H7, originally isolated from haemorrhagic colitis); CECT 417 (SupE44(am). mutant tRNA); and CECT 743 (Serovar. O142 K86B:H6. Isolated from children with diarrhoea).

In order to enhance the activity of the Type 1 fimbriae,<sup>10</sup> the strains were grown in TSB culture medium at 37 °C for 48 h, then centrifuged at 2000 g for 10 min. The supernatant was then discarded, and the strains suspended in PBS (pH 7.4). This washing process was performed twice. Finally, the bacterial suspension was adjusted to 10<sup>9</sup> bacteria/mL (OD of 1.0 to 542 nm). To enhance the activity of the P fimbriae, the strains were incubated for 16 h on CFA agar,<sup>11</sup> extracted from the surface of the agar after washing with 5 ml PBS, and the suspension was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was then discarded, the washing process was



repeated, and finally the bacteria were suspended in PBS with 1% mannose to obtain a concentration of  $10^9$  bacteria/mL (OD of 1 to 542 nm). All measurements were performed in duplicate and the mean values of the two measurements were used.

### Haemagglutination

The blood used was obtained from donors with blood group A Rh+, and collected in tubes with 100  $\mu$ l of trisodium citrate as anticoagulant, at 3.8%, to which 1 ml of blood was added. For the haemagglutination techniques of the mannose-sensitive strains, the blood was diluted to 1:4 with PBS. For haemagglutination of the mannose-resistant strains, the blood was diluted in PBS with methyl-  $\alpha$ -D-mannopyranoside 0.1 mM. Over a U-bottom microwell plate, 50  $\mu$ l of bacterial suspension and 50  $\mu$ l of diluted fresh blood (1:4) were added. The haemagglutination results became visible after 45–60 min at room temperature.

### Cranberry syrup: procedure

The cranberry syrup was provided by Pharmatoka Lab., (France) using a dispersion of 2.8% cranberry extract Gykacran® in glucose syrup (France) and characterised by the Department of Analytical Chemistry at the University of Granada.<sup>12</sup> Serial dilutions of cranberry syrup were made in PBS (pH 7.4) to 1:10 and 1:100, and the pH was adjusted to 7.0 with NaOH. 100  $\mu$ l of each dilution of the cranberry extract was incubated for 30 min at room temperature in a rotary shaker with 1 ml of the bacterial suspension (OD 1 to 542 nm), producing a final dilution of the cranberry syrup extract of approximately 1:100 and 1:1000. The final dilution of 1:1000 was chosen because this was the lowest dilution that inhibited haemagglutination. Each suspension was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min and resuspended in an equal volume of ammonium sulphate (salt aggregation) or PBS (adherence to nitrocellulose or biofilm formation).

### Ammonium sulphate aggregation test

The technique used was as described by Lindahl et al.<sup>13</sup> Briefly, solutions of ammonium sulphate were prepared, with osmolarities ranging from 0.2M to 4M, using sodium phosphate as a dilutant. Taking 20  $\mu$ l of bacterial suspension, an equal volume of ammonium sulphate solution was added. The presence of aggregation was observed after 30 seconds' gentle manual

rotation, at room temperature, over a glass slide, and the lowest concentration of ammonium sulphate that produced visible aggregation was noted down. Aggregation with the 4M solution was interpreted as a hydrophobicity of 0%, while aggregation with the 0.2M solution was interpreted as 95% hydrophobicity.

### Adherence to nitrocellulose filters

The procedure described by Lachica and Zink<sup>14</sup> was performed. Briefly, a bacterial suspension in a PUM buffer with ammonium sulphate 0.2M (1:2, v:v) was adjusted to  $10^5$  bacteria (OD 0.6 to 540 nm). The initial absorbance ( $Abs_1$ ) was determined, and 3 ml of this bacterial suspension was passed through an 8  $\mu$ m-pore nitrocellulose filter (Millipore). The absorbance of the filtrate ( $Abs_2$ ) was then determined and the results expressed as a percentage of the adherence to the nitrocellulose filter.

### Biofilm formation<sup>15</sup>

The strains were incubated at 37 °C for 24 h in glass tubes with 2.5 ml of TSB or CFA broth. 0.5 ml of the latter and 50  $\mu$ l of cranberry syrup at dilutions 1:10 and 1:100 were placed in Eppendorf tubes, resulting in final cranberry syrup dilutions of 1:100 and 1:1000. An Eppendorf tube containing an equal amount of TSB or CFA broth without inoculum was used as a negative control, and 0.5 ml of the bacterial suspension in Eppendorf tubes as a positive control. After incubation for 24 hours, the contents of each tube were aspirated carefully with a Pasteur pipette, washed three times with 250  $\mu$ l of PBS, and gently shaken to remove non adherent bacteria. The tubes were then air dried and added to 200  $\mu$ l of 99% methanol as a fixative, and left for 15 minutes. The excess methanol was then discarded and the tubes air dried. 200  $\mu$ l of 2% Hucker's crystal violet dye was added and the tubes submerged in distilled water for 5 minutes, with the remaining tubes being discarded. This procedure was repeated three times. Subsequently, bacteria were solubilized in each tube, in 250  $\mu$ l of 33% acetic acid. The optical density of the suspension of each tube was measured at 540 nm and the zero adjusted to 33% acetic acid. Non-inoculated TSB broth was used as a negative control. The results obtained are expressed as follows: OD  $\leq$  OD control: Non adherent bacteria. OD control  $\leq$  OD  $\leq$  2  $\times$  OD control: slightly adherent bacteria. 2  $\times$  OD control  $\leq$  OD  $\leq$  4  $\times$  OD control:



moderately adherent bacteria.  $OD \leq 4 \times OD$  control: Highly adherent bacteria.

### Statistical analysis

SPSS 15.0 statistical software was used to perform the Friedman and Wilcoxon test for the comparison of dependent variables, and the Mann-Whitney-Wilcoxon test for the comparison of independent variables. Kendall's W was used for the comparison of paired variables. In addition, Kendall's coefficient of inter-variable concordance was calculated.

### Results

Table 1 shows that the addition of methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside 0.1 mM to blood group A, Rh+ does not inhibit the haemagglutination of any of the 13 strains of *E. coli* utilised in this study (mannose-resistant strains). The incubation of strains of *E. coli* with cranberry syrup extract at a final concentration of 1:1000 did not inhibit haemagglutination, while incubation with the cranberry at a final concentration of 1:100 inhibited it, in every case, for strains grown either in TSB or CFA culture medium.

No differences were observed in the surface hydrophobicity of *E. coli* following its growth in TSB culture medium ( $Z=0.35$ ; pNS). However, incubation of the bacterial suspension with cranberry syrup at a final concentration of 1:1000 or 1:100 produced significant reductions in surface hydrophobicity,

depending on the concentration of cranberry, after growth in either TSB or CFA medium (Fig. 1).

The percentage of adherence to nitrocellulose was not significantly modified after growth on CFA agar or in TSB culture medium ( $Z = 0.73$ ; pNS). In both culture media, the percentage of adherence to nitrocellulose of *E. coli*, after incubation for 20 min with cranberry syrup, remained unchanged. Kendall's test of concordance revealed the existence of concordance between the surface hydrophobicity values of *E. coli* and the percentage of adherence to nitrocellulose following growth in TSB culture medium ( $T = 0.50$ ;  $P = 0.02$ ), and an absence of such concordance following growth on CFA agar ( $T = 0.09$ ;  $P = NS$ ).

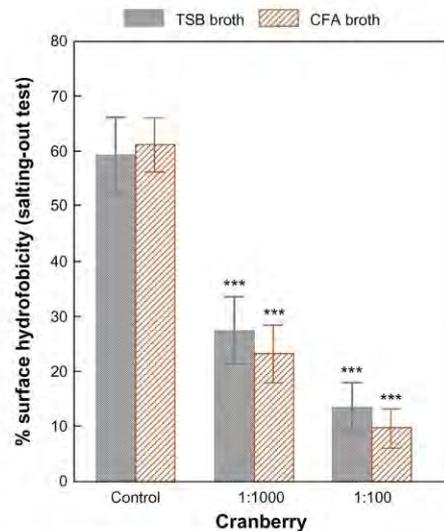
After culture in CFA broth, biofilm formation was unchanged by incubation with cranberry syrup at a final concentration of 1:1000 or 1:100 ( $W = 0.138$ ,  $P = NS$ ). However, in TSB medium, biofilm formation was inhibited after incubation with cranberry syrup ( $W = 0.93$ ,  $P < 0.001$ ), and the formation of biofilm in the absence of cranberry syrup was significantly higher after culture in TSB ( $Z = 2.31$ ,  $P = 0.02$ ), as shown in Figure 2.

### Discussion

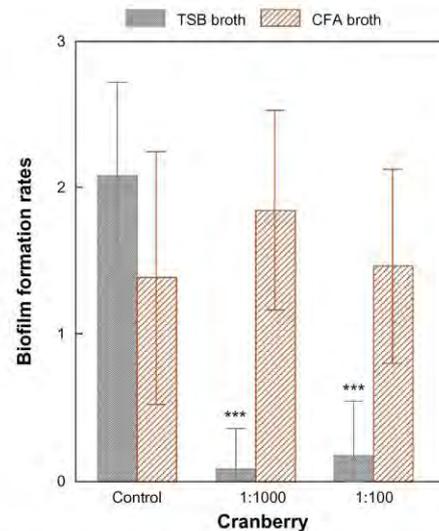
Our study shows that cranberry syrup can modify the surface hydrophobicity and the biofilm formation of *E. coli* on polystyrene (microtitre plates), the latter effect being dependent on the characteristics of the

**Table 1.** Results of the haemagglutination test (A Rh+) for mannose resistant *E. coli*. Cranberry 1:100 inhibits haemagglutination in both culture media.

<i>E. coli</i> strain	Haemagglutination TSB culture medium			Haemagglutination CFA culture medium		
	Control	Cranberry 1:1000	Cranberry 1:100	Control	Cranberry 1:1000	Cranberry 1:100
471	+	+	-	+	+	-
787	+	+	-	+	+	-
593	+	+	-	+	+	-
472	+	+	-	+	+	-
595	+	+	-	+	+	-
760	+	+	-	+	+	-
695	+	+	-	+	+	-
743	+	+	-	+	+	-
424	+	+	-	+	+	-
607	+	+	-	+	+	-
417	+	+	-	+	+	-
4076	+	+	-	+	+	-
629	+	+	-	+	+	-



**Figure 1.** Mean values and standard error of the mean of surface hydrophobicity for *E. coli* after incubation in CFA and TSB broth. There is a statistically significant decrease in surface hydrophobicity after incubation with cranberry syrup at final dilutions of 1:1000 and 1:100. Note: \*\*\* $P < 0.001$ .

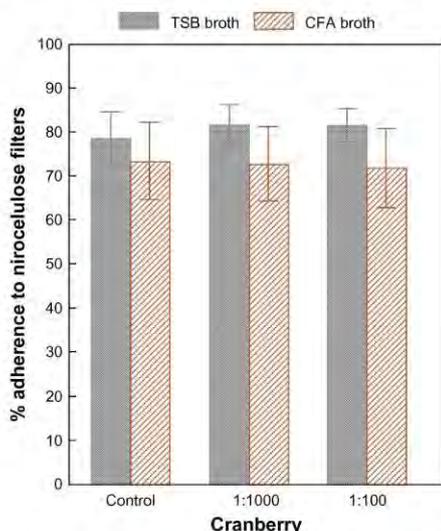


**Figure 2.** Mean values and standard error of biofilm formation rates for *E. coli* after incubation in CFA and TSB broth. Growth in TSB produces a statistically significant decrease in adherence after incubation with cranberry syrup at final dilutions of 1:1000 and 1:100. Note: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

culture medium. The greater expression of P fimbriae, as a response to the culture medium, was not found to be related with the greater formation of biofilm. The first step in the colonisation of the epithelium by *E. coli* is determined by its capacity to adhere to the host cells; this capacity is determined, initially, by the micro-organism's electric surface charge and its surface hydrophobicity,<sup>16</sup> and subsequently by other factors, such as the formation of diverse types of fimbriae, and of specific adhesins.<sup>17-19</sup> Miyazaki et al<sup>20</sup> showed that fimbriae types 1, P and S are not essential factors in the adhesion and later colonisation of the urogenital epithelium by *E. coli*. These adhesins may, in general, be considered features of the virulence of extra-intestinal *E. coli*, but they are not essential for *E. coli* to become uropathogenic, which accounts for current research interest into the extent to which cranberry extract may affect the non-specific adherence properties of *E. coli*. Cross-talk among *pilus operons* within a bacterial cell, probably triggered by environmental cues, can result in a switch in expression from one pilus type to another, a process known as phase variation. The variable

expression of the fimbriae in a single strain of *E. coli* increases the probability of adherence and invasion of the uroepithelium.<sup>21</sup>

Cranberries contain different amounts of fructose, PACs, flavonoids and anthocyanins. PACs isolated from cranberry fruit consist of predominantly epicatechin units with at least one A-type linkage. The A-linkage in cranberry PACs may represent an important structural feature for bacterial anti-adherence activity. The type A cranberry PACs prevent adherence of P-fimbriated uropathogenic *E. coli* to uroepithelial cells in vitro.<sup>4</sup> The cultivation of *E. coli* in CFA broth favours the expression of P fimbriae.<sup>11</sup> We observed that the incubation of *E. coli* in CFA broth with cranberry syrup does not alter the formation of biofilm, from which we infer that the increased expression of P fimbriae is not related to the formation of biofilm. The latter finding differs from that observed after culture in TSB broth, implying that biofilm formation can be inhibited by cranberry syrup, depending on the characteristics of the culture medium, while the expression of P fimbriae is not an important element in the formation of biofilm. Hancock et al<sup>8</sup> showed that



**Figure 3.** Mean values of adherence to nitrocellulose for *E. coli* before and after incubation with cranberry syrup at final dilutions of 1:1000 and 1:100.

the expression of P fimbriae significantly decreases biofilm formation under different growth conditions.

The incubation of *E. coli* with cranberry syrup extract produces a reduction in the surface hydrophobicity, dependent on the concentration of the extract, and which is independent of the different culture media (Fig. 1). This effect may be different from the inhibition of P fimbriae of cranberry PACs, since according to our findings and those of Hancock et al,<sup>8</sup> P fimbriae have little influence on the formation of biofilm. Further studies are currently being conducted, involving a partitioning of the components of the cranberry syrup and a study of the effects thus produced. With respect to surface hydrophobicity, the incubation of *E. coli* with a 1:1000 dilution of cranberry extract, which does not affect the haemagglutination mediated by Type P fimbriae, does produce significant reductions in the surface hydrophobicity, thus showing that extremely low levels of this extract are capable of modifying the non-specific adherence properties of *E. coli*. According to our own results, the adherence of *E. coli* to nitrocellulose is not related to the predominant expression of Type P or Type I

fimbriae, and incubation with cranberry syrup extract does not affect adherence rates.

We conclude that, depending on the culture medium, cranberry can modify the non-specific adherence properties of *E. coli* and alter its ability to form biofilm.

### Abbreviations

TSB, Tryptic Soy Broth; CFA, Colonization Factor Antigen; PBS, Phosphate buffered saline.

### Acknowledgements

This study was funded by the Carlos III Institute of Health (Spain).

### Disclosures

Author(s) have provided signed confirmations to the publisher of their compliance with all applicable legal and ethical obligations in respect to declaration of conflicts of interest, funding, authorship and contributorship, and compliance with ethical requirements in respect to treatment of human and animal test subjects. If this article contains identifiable human subject(s) author(s) were required to supply signed patient consent prior to publication. Author(s) have confirmed that the published article is unique and not under consideration nor published by any other publication and that they have consent to reproduce any copyrighted material. The peer reviewers declared no conflicts of interest.

### References

- Zafiri D, Ofek I, Adar R, Pocino M, Sharon N. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:92-8.
- Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry.* 2000b;54:173-81.
- Sellwood R, Gibbons RA, Jones GW, Rutter JM. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. *J Med Microbiol.* 1975;8:405-11.
- Howell AB. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51:732-7.
- Magnusson KE. Hydrophobic interaction—a mechanism of bacterial binding. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1982;33:32-6.
- Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Nat Prod.* 2000a;63:1225-8.
- Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry.* 2000c;54:173-81.
- Hancock V, Witsø IL, Klemm P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *Int J Med Microbiol.* 2011;301:570-6.



9. Liu Y, Black MA, Caron L, Camesano TA. Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93:297–305.
10. Blanco M, Blanco J, Blanco JE, et al. Virulence factors and O serogroups of *Escherichia coli* as a cause of community-acquired urinary infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1995;13:236–41.
11. Evans DG, Evans DJ Jr, Tjoa W. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect Immun*. 1977;18:330–7.
12. Iswaldi I, Gómez-Caravaca AM, Uberos J, Lardón M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutierrez A. Characterization by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in a cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacterial activity. *J Pharm Biomed Anal*. In press. 2011.
13. Lindahl M, Fariš A, Wadström T, Hjerten S. A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1981;677:471–6.
14. Lachica RV, Zink DL. Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*. 1984;44:540–3.
15. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40:175–9.
16. Ferreirós CM, Criado MT. Expression of surface hydrophobicity encoded by R-plasmids in *Escherichia coli* laboratory strains. *Arch Microbiol*. 1984;138:191–4.
17. Ferreirós CM, Criado MT. Adhesive properties associated with the K99 antigen of *Escherichia coli*. *JRCS Medical Science*. 1980;10:917–8.
18. Gibbons RJ, Spinell DM, Skobe Z. Selective adherence as a determinant of the host tropisms of certain indigenous and pathogenic bacteria. *Infect Immun*. 1976;13:238–46.
19. Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. *J Dent Res*. 1989;68:1303–7.
20. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata YM, Akaza H, Hayashi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;33:23–6.
21. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 2008;85:11–9.

**Publish with Libertas Academica and every scientist working in your field can read your article**

*"I would like to say that this is the most author-friendly editing process I have experienced in over 150 publications. Thank you most sincerely."*

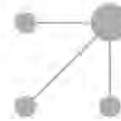
*"The communication between your staff and me has been terrific. Whenever progress is made with the manuscript, I receive notice. Quite honestly, I've never had such complete communication with a journal."*

*"LA is different, and hopefully represents a kind of scientific publication machinery that removes the hurdles from free flow of scientific thought."*

**Your paper will be:**

- Available to your entire community free of charge
- Fairly and quickly peer reviewed
- Yours! You retain copyright

<http://www.la-press.com>



## ORIGINAL ARTICLE

Efficacy and safety profile of cranberry in infants and children with recurrent urinary tract infection<sup>☆</sup>

V. Fernández-Puentes<sup>a</sup>, J. Uberos<sup>a,\*</sup>, R. Rodríguez-Belmonte<sup>a</sup>, M. Nogueras-Ocaña<sup>b</sup>,  
E. Blanca-Jover<sup>a</sup>, E. Narbona-López<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Pediatría, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

<sup>b</sup> Servicio de Urología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Received 28 June 2014; accepted 25 August 2014

Available online 4 June 2015

## KEYWORDS

Cranberry;  
Urinary tract  
infections;  
Trimethoprim;  
Vesicoureteral reflux;  
Antibiotic prophylaxis

## Abstract

**Objective:** Cranberry prophylaxis of recurrent urinary tract infection in infants has proven effective in an experimental adult model. There are few data on its efficacy, safety and recommended dose in the paediatric population.

**Methods:** A controlled, double-blind Phase III clinical trial was conducted on children older than 1 month of age to evaluate the efficacy and safety of cranberry in recurrent urinary tract infection. The assumption was of the non-inferiority of cranberry versus trimethoprim. Statistical analysis was performed using Kaplan Meier analysis.

**Results:** A total of 85 patients under 1 year of age and 107 over 1 year were recruited. Trimethoprim was prescribed to 75 patients and 117 received cranberry. The cumulative rate of urinary infection associated with cranberry prophylaxis in children under 1 year was 46% (95% CI; 23-70) in children and 17% (95% CI; 0-38) in girls, with effectiveness at doses inferior to trimethoprim. In children over 1 year-old cranberry was not inferior to trimethoprim, with a cumulative rate of urine infection of 26% (95% CI; 12-41). The cranberry was well tolerated and with no new adverse effects.

**Conclusions:** Our study confirms that cranberry is safe and effective in the prophylaxis of recurrent urinary tract infection in infants and children. With the doses used, their efficiency is not less than that observed for trimethoprim among those over 1 year-old. (Clinical Trials Registry ISRCTN16968287).

© 2014 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

<sup>☆</sup> Please cite this article as: Fernández-Puentes V, Uberos J, Rodríguez-Belmonte R, Nogueras-Ocaña M, Blanca-Jover E, Narbona-López E. Eficacia y perfil de seguridad del arándano americano en lactantes y niños con infección urinaria recurrente. An Pediatr (Barc). 2015;82:397-403.

\* Corresponding author.

E-mail address: [juberos@ugr.es](mailto:juberos@ugr.es) (J. Uberos).

express desire of the legal guardian that the child not participate in the study.

Once a patient was selected and the signed informed consent was obtained for participation in the study, he or she was assigned a record number. Once the researcher included a patient in the study, the researcher gave the parents a card with the corresponding identification number; this card was presented at the hospital pharmacy to retrieve the assigned treatment, which was masked and labelled according to the regulations of the Agencia Española del Medicamento (Spanish Agency of Medicines).

The cranberry extract was supplied by a registered brand. The treatments were prepared by suspending 3% cranberry extract in glucose syrup, and suspending trimethoprim in glucose syrup at a concentration of 8 mg/mL. We did a characterisation of the cranberry extract to verify the amount of proanthocyanidins administered to patients and determine the concentration of the remaining polyphenolic fractions.<sup>8</sup>

The experimental group received a nightly 0.2 mL/kg dose of cranberry syrup. The standard treatment group received a nightly 0.2 mL/kg dose of a colour-masked suspension of trimethoprim, for which we added the colourant CC-1000-WS (E-120; Chr-Hansen) at a concentration of 0.1%, which was within the allowed 100 ppm of carmine. The dose had to be administered before supper, and a full dose had to be given again if vomiting occurred within 30 min from the administration of the first dose.

Our study followed the intention to treat principle at all times.

The follow-up of patients consisted in periodic check-ups every 2 months or on demand by the patient whenever symptoms called for it. The patient was instructed to perform a urine culture whenever he or she had fever, urinary symptoms, vomiting or weight loss. Urinary tract infections were confirmed by pathological findings in urine sediment (>20 WBC per field) and urine culture (>100 000 CFU/mL) from specimens obtained in a clean catch or a urine collection bag following disinfection of the urethral meatus with chlorhexidine, or more than 10 000 CFU/mL if the sample was obtained through a catheter.

A urine culture was always performed before initiating any type of antibiotic treatment. We documented the assigned intervention number, clinical and laboratory data for each of the scheduled check-up visits of the patient, and the periodic urine culture results. The effectiveness of the interventions was assessed based on the time spent in the study without recurrence of UTI. We documented the time at which recurrence occurred, at which point the participation of the patient in the study was terminated.

For sample size determination, we estimated the risk of recurrent UTI in the first year of antibiotic prophylaxis at 20%.<sup>2,9</sup> We hypothesised that cranberry prophylaxis would be equivalent to trimethoprim prophylaxis. We set an equivalence margin of  $\pm 10\%$ . Calculations were made for an alpha error of 5% and a power of 80%. With these values, we obtained a sample size of 109 patients per group.

#### Avoidance of bias

The possibility of obtaining false positive or negative results in the urine cultures performed to monitor the patient led

us to consider the possibility of an information bias. It is possible to obtain a negative culture result in patients that do have a UTI if they have undergone antibiotic treatment prior to the collection of urine. Thus, it was underscored that a sample for urine culture should be collected, preferably by catheter, from any patient presenting with fever before initiating any prescribed antibiotic treatment. Positive urine culture results may be obtained due to improper collection technique and urine contamination; cultures positive for more than one microorganism when the urine sediment was normal were considered contaminated and repeated.

We also tried to prevent information bias by data cleansing and using electronic databases with systems to restrict incorrect input (dates).

#### Determination of phenolic acids in urine

Samples of urine collected at 9 am and 9 pm were tested for 6 dietary phenolic acids: protocatechuic acid, syringic acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, and *p*-coumaric acid. The determinations were made at the Institute of Public Health and Clinical Nutrition in Kuopio, Finland. It is believed that some of these phenolic acids are products of the cleavage of procyanidins, flavonols and catechins found in the diet and in cranberries.<sup>10,11</sup>

In our statistical analysis we used the Kaplan–Meier estimator (survival analysis), and the occurrence of the event (UTI) marked the end of the follow-up period. Patients that withdrew voluntarily from the study or for reasons other than a UTI were considered excluded from further followup. We evaluated the Kaplan–Meier curves for the experimental intervention and the standard treatment. We compared the urinary excretion of polyphenols between groups with the independent-samples *t* test. We performed a linear regression analysis for the concentrations of the different polyphenolic components ingested in the cranberry syrup and the urinary excretion of phenolic acids.

For the noninferiority analysis, we considered the difference of the UTI prevalence between the two treatment arms (*d*), and calculated the standard error:

$$SE = \sqrt{\frac{\text{Var cranberry}}{n_1} + \frac{\text{Var trimethoprim}}{n_2}}$$

As the equivalence margins were estimated at  $\pm 0.15$  (15%),  $\delta_L = -0.10$  and  $\delta_U = 0.10$  for a  $z_\alpha$  value of 1.96.

We analysed the noninferiority of cranberry against trimethoprim by a unilateral hypothesis test:

$$H_{1L} = p_{\text{cranberry}} - p_{\text{trimethoprim}} > \delta_L \rightarrow H_{0L} = p_{\text{cranberry}} - p_{\text{trimethoprim}} \leq \delta_L$$

Which corresponds to  $z_L = (d - \delta_L)/SE \geq Z_\alpha$

$$H_{1U} = p_{\text{cranberry}} - p_{\text{trimethoprim}} > \delta_U \delta H_{0U} = p_{\text{cranberry}} - p_{\text{trimethoprim}} \geq \delta_U$$

Which corresponds to  $z_U = (d - \delta_U)/SE \leq -Z_\alpha$

#### Results

We studied 85 infants younger than 1 year, of which 53 received prophylaxis with trimethoprim and 32 prophylaxis

with cranberry syrup. The study also included 107 children older than 1 year, 64 of which received trimethoprim prophylaxis and 43 cranberry prophylaxis.

In patients younger than 1 year, the cumulative rate of UTI associated with trimethoprim prophylaxis was 19% (95% CI, 4–35) in boys and 43% (95% CI, 18–68) in girls. In patients younger than 1 year, the cumulative rate of UTI associated with cranberry prophylaxis was 46% (95% CI, 23–70) in boys and 17% (95% CI, 0–38) in girls. For both sexes overall, the cumulative rate of UTI in infants that received trimethoprim was 28% (95% CI, 13–42) while this rate was 35% (95% CI, 17–52) in infants that received cranberry.

The overall cumulative rate of UTI in children older than 1 year was 35% (95% CI, 21–50) in those that received trimethoprim and 26% (95% CI, 12–41) in those that received cranberry. By sex, the cumulative rate of UTI in males

that received trimethoprim was 33% (95% CI, 1.8–65) compared to 8% (95% CI, 0–26) in males that received cranberry.

The CONSORT diagram (Fig. 1) summarises the adverse events detected in children less and more than 1 year of age during the follow-up period. There was a remarkably low incidence of adverse reactions, and we did not detect any adverse events in infants less than 1 year of age. Table 1 shows the urinary excretion of phenolic acids in patients younger and older than 1 year in the trimethoprim and the cranberry groups, with no significant differences found in the excretion of phenolic acids between strata.

Sixty percent of the episodes of recurrent UTI were caused by *Escherichia coli*, and we found no significant differences between the two treatment groups. Of all patients that received trimethoprim, 33.3% had urine cultures

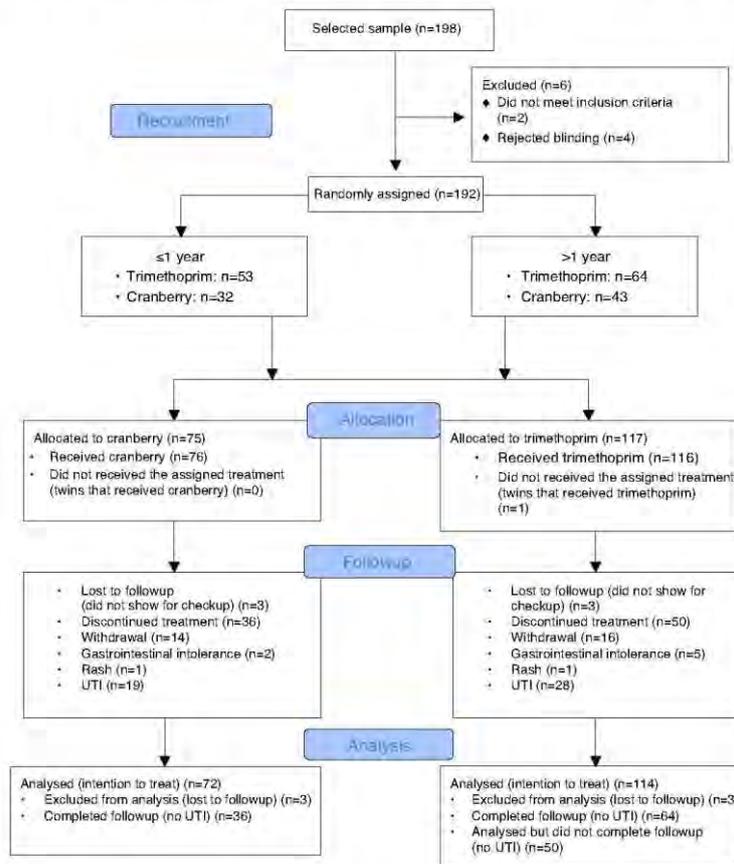


Figure 1 Flow diagram.

**Table 1** Urinary excretion of phenolic acids in patients receiving nightly prophylaxis with cranberry or trimethoprim.

(mcmol/g creatinine)	≤1 year		>1 year	
	Cranberry	Trimethoprim	Cranberry	Trimethoprim
Protocatechuic (9 h)	3.4 (1.8–5.0)	6.1 (4.0–8.2)	3.8 (2.5–5.0)	2.7 (2.0–3.4)
Protocatechuic (21 h)	4.4 (1.4–7.4)	6.6 (4.5–8.7)	4.7 (2.6–6.8)	9.4 (3.1–15.5)
Syringic (9 h)	0.3 (0–0.7)	0.6 (0.2–0.9)	1.8 (0.6–3.1)	0.6 (0.4–0.8)
Syringic (21 h)	2.5 (0–6.3)	1.0 (0.4–1.6)	0.7 (0.3–1.1)	2.5 (0.2–4.9)
Caffeic (9 h)	1.8 (0–4.0)	1.1 (0–2.5)	1.0 (0.4–2.4)	0.4 (0.1–0.7)
Caffeic (21 h)	1.1 (0–2.6)	0.5 (0.7–1.2)	0.3 (0.1–0.4)	1.0 (0–2.0)
Ferulic (9 h)	21.9 (9.3–34.4)	12.6 (7.5–17.7)	9.3 (5.2–13.4)	4.3 (1.3–5.3)
Ferulic (21 h)	15.3 (0–31.3)	13.2 (9.3–17.2)	8.1 (5.1–11.1)	13.3 (6.0–20.6)
Sinapic (9 h)	–	–	1.2 (0–3.3)	0.1 (0–0.14)
Sinapic (21 h)	0.22 (0–0.65)	–	0.2 (0–0.4)	0.4 (0–1.1)
p-Coumaric (9 h)	1.8 (0.5–3.0)	0.4 (0.2–0.5)	1.6 (0–3.7)	0.7 (0.2–1.2)
p-Coumaric (21 h)	1.5 (0–3.4)	0.4 (0–0.9)	0.6 (0.1–1.1)	0.7 (0–1.7)

positive for multidrug-resistant bacteria, compared to 22.9% of the patients that received cranberry.

For the whole sample, we found that  $Z_L = 2.04 > Z_{\alpha}$  and  $Z_U = -1.65 > -Z_{\alpha}$ , so we can accept the hypothesis that treatment with cranberry is not inferior to treatment with trimethoprim. In infants less than 1 year of age, our results were  $Z_L = 0.69 < Z_{\alpha}$  and  $Z_U = -1.9 > -Z_{\alpha}$ , so we had to accept that in infants treatment with cranberry at the administered doses is inferior to trimethoprim.

Of the patients less than 1 year of age, 13 had vesicoureteral reflux (VUR), four of them grade 2 or lower, and five grade 3 or higher, of which two and four, respectively, were treated with cranberry. We did not observe a difference in the recurrence of UTI among groups. Of the patients more than 1 year of age, 27 had RVU, 11 of them grade 2 or less, and 16 grade 3 or more, of which 3 and 8, respectively, were treated with cranberry. We did not observe any differences in UTI recurrence between the groups.

## Discussion

Our study confirms that the use of cranberry is safe in infants and children. The efficacy of cranberry is not inferior to that of trimethoprim for the prophylaxis of recurrent UTI in children, although its efficacy in infants less than 1 year of age can be considered inferior to that of trimethoprim at the doses we administered.

In 1984 Sobota<sup>12</sup> observed that cranberry extract interferes with the adherence of p-fimbriated *E. coli* to the epithelium, demonstrating that this may be one of the main mechanisms underlying the anti-adhesion activity of cranberry. The fructose contained in many fruit juices, including cranberry juice, may also inhibit the adherence of type 1 fimbriae.<sup>13</sup> However, adhesion mediated by p-fimbriae has been associated with the specific lectin  $\alpha$ -Gal(1–4) $\beta$ -Gal found in the urothelium, the binding of which is not inhibited by the addition of fructose.<sup>14,15</sup> Foo et al.<sup>16</sup> identified A-type proanthocyanidin trimers and procyanidin dimers as being responsible for the anti-adhesion activity of cranberry. They are polyphenolic flavonols that are not found in other substances rich in polyphenols, such

as green tea or chocolate. The cranberry extract used in our trial contained 22% of A-type proanthocyanidins, which is relevant for the future comparison of our results with other studies given the wide variability in the concentration of proanthocyanidins found in different cranberry extracts.<sup>17,18</sup>

Two studies assessed the effectiveness of cranberry in children with neurogenic bladder managed by clean intermittent catheterisation.<sup>19,20</sup> The first study had a single-blind cross-over design and included 40 children, and the second was a double-blind placebo-controlled study and included 15 children. Both studies concluded that cranberry concentrate was no more efficacious than placebo in controlling UTI in patients with neurogenic bladder. However, neither study characterised the polyphenolic content of the cranberry preparations used.

McMurdo et al.<sup>21</sup> conducted a randomised double-blind trial with cranberry or trimethoprim in women at risk of recurrent UTI. The authors observed that the risk of UTI recurrence was 60% higher in patients receiving cranberry, although the finding was not statistically significant. A clinical trial carried out by Uberos et al.<sup>22</sup> demonstrated the noninferiority of cranberry against trimethoprim in a sample of children younger than 14 years; this study did not stratify the sample by age and did not take into account the relationship between cranberry intake and urinary excretion of phenolic acids. The systematic review published by Jepson<sup>1</sup> of a total of 10 studies (1049 patients) concluded that cranberry, compared to placebo or control treatment, significantly decreased the incidence of UTI over a 12 month period (RR, 0.65; 95% CI, 0.46–0.90). Cranberry was more effective in reducing the incidence of UTI in women with recurrent UTIs than in men, older women or patients requiring catheterisation.

Previous studies<sup>23</sup> have demonstrated the beneficial effect of cranberry in the prevention of UTI in women, with a lower absolute risk of UTI relative to placebo. In a placebo-controlled clinical trial in children older than 3 years, Ferrara et al.<sup>24</sup> demonstrated that cranberry prevents the recurrence of symptomatic UTIs. Our study is the first randomised controlled double-blind trial that demonstrates the safety of cranberry in infants and children. Howell et al.<sup>25</sup> found evidence that the anti-adhesion activity of

cranberry is greater when the amount of proanthocyanidins administered in the cranberry preparation is higher than 18 mg. Since no data were available on the use of cranberry in infants, for our study we decided to extrapolate from the adult dosage and administer 0.2 mL of the syrup per kilogram of body weight. Our results show that cranberry is not inferior to trimethoprim when the dose of proanthocyanidins is above 18 mg, which is the dose that would be administered per kilogram of body weight in a one-year old infant.

Phenolic acids are considered products of the cleavage of procyanidins, flavonols and catechins from dietary sources or cranberries.<sup>10,11</sup> We found slightly higher levels of *p*-coumaric acid and ferulic acid at 9 h, at the limit of statistical significance, in the group of infants treated with cranberry. We found no differences in the rest of the dietary phenolic acids analysed. In our study, we determined the phenolic acids that are considered to originate from dietary sources, that is, those whose urinary excretion is strongly influenced by diet. The urinary excretion of other phenolic metabolites that were not determined in this study may be affected not only by dietary factors, but also by the metabolism of endogenous molecules such as catecholamines.<sup>26,27</sup> We analysed the concentration of cyanidins eliminated by the patients during their followup periods, and found values below the detection limits.<sup>28</sup> The phenolic metabolites in urine found to have the strongest association with cranberry intake are caffeic acid, dihydroferulic acid, *p*-coumaric acid, dihydroxybenzoic acid and 4-O-*b*-*p*-glucuronic acid.<sup>28</sup>

Since the anti-adhesion activity of cranberry is dose-dependent and the best results were obtained in patients more than 1 year of age in whom the administration of more than 18 mg of proanthocyanidins was guaranteed, we believe that it is necessary to conduct other studies assessing the efficacy of different dosages of cranberry in infants less than 1 year of age.

#### Funding

This clinical trial was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Health Research Fund) of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

#### Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### Acknowledgments

We want to thank Dr Tarja Nurmi of the University of Kuopio, Finland, for her guidance in the laboratory determinations performed for this study.

#### References

- Jepson RG, Craig JC. Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;CD001321.
- Garin EH, Olavarria F, García NV, Valenciano B, Campos A, Young L. Clinical significance of primary vesicoureteral reflux and urinary antibiotic prophylaxis after acute pyelonephritis: a multicenter, randomized, controlled study. *Pediatrics*. 2006;117:626–32.
- Roberts KB. Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the initial UTI in febrile infants and children 2–24 months. *Pediatrics*. 2011;128:595–610.
- Finnell SM, Carroll AE, Downs SM. Technical report – diagnosis and management of an initial UTI in febrile infants and young children. *Pediatrics*. 2011;128:e749–70.
- Mathews R, Carpenter M, Chesney R, Hoberman A, Keren R, Mattoo T, et al. Controversies in the management of vesicoureteral reflux: the rationale for the RIVUR study. *J Pediatr Urol*. 2009;5:336–41.
- Craig JC, Simpson JM, Williams GJ, Lowe A, Reynolds GJ, McTaggart SJ, et al. Antibiotic prophylaxis and recurrent urinary tract infection in children. *N Engl J Med*. 2009;361:1748–59.
- Cheng CH, Tsai MH, Huang YC, Su LH, Tsau YK, Lin CJ, et al. Antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in children with vesicoureteral reflux receiving prophylactic antibiotic therapy. *Pediatrics*. 2008;122:1212–7.
- Iswardi I, Gomez-Caravaca AM, Arraez-Roman D, Uberos J, Lardon M, Segura-Carretero A, et al. Characterization by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in a cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacterial activity. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;58:34–41.
- Savage DC, Howie G, Adler K, Wilson MI. Controlled trial of therapy in covert bacteriuria of childhood. *Lancet*. 1975;1:358–61.
- Gonthier MP, Donovan JL, Textier O, Felgines C, Remesy C, Scalbert A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:837–44.
- Deprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapiere C, et al. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr*. 2000;130:2733–8.
- Sobota AE. Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections. *J Urol*. 1984;131:1013–6.
- Zafri D, Ofek I, Adar R, Pocino M, Sharon N. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33:92–8.
- Di MP, Agnel R, David K, Templer C, Gaillard JL, Denys P, et al. Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. *World J Urol*. 2006;24:21–7.
- Salmiinen A, Loimaranta V, Joosten JA, Khan AS, Hacker J, Pieters RJ, et al. Inhibition of P-fimbriated *Escherichia coli* adhesion by multivalent galabiose derivatives studied by a live-bacteria application of surface plasmon resonance. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:495–501.
- Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Nat Prod*. 2000;63:1225–8.
- Latti AK, Kainulainen PS, Hayirtoglu-Ayaz S, Ayaz FA, Riihinen KR. Characterization of anthocyanins in caucasian blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) native to Turkey. *J Agric Food Chem*. 2009;57:5244–9.
- Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry*. 2000;54:173–81.
- Foda MM, Middlebrook PF, Gatfield CT, Potvin G, Wells G, Schilling JF. Efficacy of cranberry in prevention of urinary tract infection in a susceptible pediatric population. *Can J Urol*. 1995;2:98–102.

## Cranberry in recurrent urinary tract infections

403

20. Schlager TA, Anderson S, Trudell J, Hendley JO. Effect of cranberry juice on bacteriuria in children with neurogenic bladder receiving intermittent catheterization. *J Pediatr*. 1999;135:698-702.
21. McMurdo ME, Argo I, Phillips G, Daly F, Davey P. Cranberry or trimethoprim for the prevention of recurrent urinary tract infections? A randomized controlled trial in older women. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:389-95.
22. Uberos J, Nogueras-Ocaña M, Fernández-Puentes V, Rodríguez-Belmonte R, Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A. Cranberry syrup vs trimethoprim in the prophylaxis of recurrent urinary tract infections among children: a controlled trial. *Open Access J Clin Trials*. 2012;4:31-8.
23. Kontiokari T, Sundqvist K, Nuutinen M, Pokka T, Koskela M, Uhari M. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and *Lactobacillus* GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ*. 2001;322:1571.
24. Ferrara P, Romaniello L, Vitelli O, Gatto A, Serva M, Cataldi L. Cranberry juice for the prevention of recurrent urinary tract infections: a randomized controlled trial in children. *Scand J Urol Nephrol*. 2009;43:369-72.
25. Howell AB, Botto H, Combesure C, Blanc-Potard AB, Gausa L, Matsumoto T, et al. Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study. *BMC Infect Dis*. 2010;10:94.
26. Combet E, Lean MEJ, Boyle JG, Crozier A, Davidson DF. Dietary flavonols contribute to false-positive elevation of homovanillic acid, a marker of catecholamine-secreting tumors. *Clin Chim Acta*. 2011;412:165-9.
27. Numi T, Mursu J, Heinonen M, Nurmi A, Hiltunen R, Voutilainen S. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J Agric Food Chem*. 2009;57:2274-81.
28. Iswaldi I, Arraez-Roman D, Gomez-Caravaca AM, Contreras MM, Uberos J, Segura-Carretero A, et al. Identification of polyphenols and their metabolites in human urine after cranberry-syrup consumption. *Food Chem Toxicol*. 2013;55:484-92.

ORIGINAL RESEARCH

**OPEN ACCESS**  
Full open access to this and  
thousands of other papers at  
<http://www.la-press.com>.

## Urinary Excretion of Phenolic Acids by Infants and Children: A Randomised Double-Blind Clinical Assay

J. Uberos, V. Fernández-Puentes, M. Molina-Oya, R. Rodríguez-Belmonte, A. Ruiz-López,  
P. Tortosa-Pinto, A. Molina-Carballo and A. Muñoz-Hoyos

UGC Pediatría, Hospital Clínico San Cecilio de Granada, University of Granada, Spain.  
Corresponding author email: [juberos@ugr.es](mailto:juberos@ugr.es)

---

### Abstract

**Objectives:** The present study, which is part of the ISRCTN16968287 clinical assay, is aimed at determining the effects of cranberry syrup or trimethoprim treatment for UTI.

**Methods:** This Phase III randomised clinical trial was conducted at the San Cecilio Clinical Hospital (Granada, Spain) with a study population of 192 patients, aged between 1 month and 13 years. Criteria for inclusion were a background of recurrent UTI, associated or otherwise with vesico-ureteral reflux of any degree, or renal pelvic dilatation associated with urinary infection. Each child was randomly given 0.2 mL/Kg/day of either cranberry syrup or trimethoprim (8 mg/mL). The primary and secondary objectives, respectively, were to determine the risk of UTI and the levels of phenolic acids in urine associated with each intervention.

**Results:** With respect to UTI, the cranberry treatment was non-inferior to trimethoprim. Increased urinary excretion of ferulic acid was associated with a greater risk of UTI developing in infants aged under 1 year (RR 1.06; CI 95% 1.024–1.1;  $P = 0.001$ ).

**Conclusions:** The results obtained show the excretion of ferulic acid is higher in infants aged under 1 year, giving rise to an increased risk of UTI for both treatment options.

**Keywords:** phenolic acids, urinary infection, cranberry, ferulic acid, pediatric

---

*Clinical Medicine Insights: Pediatrics* 2012;6:67–74

doi: [10.4137/CMPed.S9349](https://doi.org/10.4137/CMPed.S9349)

This article is available from <http://www.la-press.com>.

© the author(s), publisher and licensee Libertas Academica Ltd.

This is an open access article. Unrestricted non-commercial use is permitted provided the original work is properly cited.

---

Clinical Medicine Insights: Pediatrics 2012;6

67



## Introduction

Following reports that urinary tract infection (UTI) and vesico-ureteral reflux may be associated with different degrees of kidney damage,<sup>1,2</sup> the daily administration of low doses of antibiotics has been suggested as a possible treatment. Recent randomised, double-blind studies have shown that treatment with low doses of trimethoprim-sulfamethoxazole is associated with a modest decrease in the rate of symptomatic UTI in predisposed children.<sup>2</sup> However, prophylactic treatment with antibiotics does not completely eliminate the risk of new urinary infections; moreover, it affects the pathogens normally responsible for such infections and changes their patterns of resistance to antibiotics. It is believed that 87% of all urinary infections are caused by *E. coli*, although *E. coli* is less common in children receiving antibiotic prophylaxis.<sup>3</sup> It has been reported that cranberry syrup outperforms a placebo treatment by up to 20% in preventing UTI among fertile age women.<sup>4-6</sup> A Cochrane review published in 2008<sup>7</sup> obtained similar results, although it concluded there was a need for more studies of good methodological quality.

Depending on age, gender and associated pathologies, the prevalence of UTI among children may range from 2% to 8%. Except in the first 2 months of life, when infection may be secondary to haematogenous dissemination, UTI is caused by an ascending mechanism in the urinary tract, mainly due to gram-negative bacteria. The adhesion of uropathogenic *E. coli* is a process that takes place prior to the development of infection, when the exposed lectins on the bacteria surface adhere to carbohydrates from the epithelium. The components of cranberry syrup are known to inhibit the adherence of *E. coli* to the epithelial cells, both in vivo<sup>8</sup> and in vitro,<sup>9</sup> and this inhibition seems to be produced by a non-dialysable component, namely the A-type proanthocyanidin present at high concentrations in cranberry syrup.<sup>10</sup>

Cranberries also contain significant quantities of polyphenols such as flavonoids, isoflavonoids, coumarins and anthocyanins. Polyphenols are an important component of the diet, although they are not necessarily very active in the organism, due to a low level of intrinsic activity, or because they are poorly absorbed in the intestines, are metabolised or are eliminated rapidly. Most polyphenols are present in foods in the form of esters, glycosides or polymers

which cannot be absorbed in their native form and must be hydrolysed by the intestinal enzymes or by colonic microflora in order to be absorbed.<sup>11</sup>

The present study forms part of the ISRCTN16968287 clinical assay. Our primary objective was to determine the risk of UTI associated with cranberry or trimethoprim treatment, while the secondary objective was to determine the levels of phenolic acids in urine associated with each intervention.

## Methods

### Study participants

From January 2009 to October 2010, children aged from 1 month to 13 years and treated at the paediatric nephrology and urology departments in our hospital were considered for this study. Criteria for inclusion were a background of recurrent UTI (more than 2 episodes of infection in the last 6 months), associated or otherwise with vesico-ureteral reflux of any degree, or renal pelvic dilatation associated with urinary infection. The presence of infection was confirmed by urine culture (>100,000 CFU/mL) using a "mid-stream" urine sample or a urine collection bag, after asepsis of the urethral meatus with chlorhexidine, or >10,000 CFU/mL if a catheter specimen of urine was obtained. In both cases, the presence or otherwise of a urine sediment with >20 leucocytes per field was determined. The test endpoint was the presence of urinary infection. Criteria for exclusion were the co-existence of UTI with other infectious diseases or with metabolic diseases, chronic renal insufficiency, the presence of allergy or intolerance to any of the components of cranberry syrup or trimethoprim, the existence of blood dyscrasia or the express wish of the parent or guardian to exclude the child from the study. This study was approved by the local ethics committee, and in all cases the parents or guardians gave their written informed consent.

### Study design and intervention

The study was designed as a Phase III randomised clinical trial, with the treatment option concealed from both patients and researchers. There were two treatment branches: cranberry syrup and trimethoprim. Both groups received a single daily dose of 0.2 mL/kg of syrup at 8.00 p.m. The patients who were given trimethoprim received a concentration of 8 mg/mL, and it was masked with cochineal red dye (E-124)



and packaged in opaque tubes. Study subjects were randomised in permuted blocks of 5 using appropriate software.

### Characterization of cranberry syrup

The cranberry syrup (Pharmatoka Lab., France) was characterised at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada,<sup>12</sup> and provided as a dispersion of 2.8% cranberry extract Gykacran® in glucose syrup. The composition of the cranberry syrup, with respect to its different polyphenol fractions, has been published previously.<sup>12</sup> The concentration of phenolic acids in the syrup is shown in Table 1. The total amount of phenolic acids was 454 µg/mL.

### Determination of phenolic acids

Levels of phenolic acid in urine were determined in urine samples from 93 randomly-chosen patients from the ISRCTN16968287 clinical assay, at the Institute of Public Health and Clinical Nutrition, Kuopio, Finland. The following phenolic acids, with diverse benzoic, acetic, propionic and cinnamic acid derivatives, were analysed; *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, syringic, gallic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, *m*-hydroxyphenylacetic, homovanillic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, *m*-hydroxyphenylpropionic, dihydroferulic, dihydroisoferulic, caffeic, ferulic, sinapinic, isoferulic, *p*-coumaric and *m*-coumaric acids. These compounds cover a wide range of metabolites and dietary phenolic acids; they constitute a fragmentation product of procyanidins,<sup>13,14</sup> and were measured to evaluate fragmentation into other phenolic metabolites. Analysis of phenolic acids also provides information about the fragmentation of flavonols and catechins.<sup>15,16</sup> The phenolic acids in the cranberry syrup samples were first hydrolysed with enzymes (obtained from Helix Pomatia) and then with sodium hydroxide.

**Table 1.** Phenolic acids in cranberry syrup.

Phenolic acid	nMol/mL
Protocatechuic acid	133.5
Vanillic acid	342.7
Chlorogenic acid	411.5
Chlorogenic acid converted to caffeic acid	411.5
Caffeic acid	18.7
<i>p</i> -coumaric acid	1789.2
Ferulic acid	23.1

### Sample size and statistical analysis

There is assumed to be a 20% risk of recurrence of UTI during the first year of antibiotic treatment. The present study is a non-inferiority clinical trial, in which it is hypothesised that cranberry syrup treatment is equivalent (non inferior) to trimethoprim. The limits of equivalence were established at  $\pm 10\%$ , with an alpha error of 5% and the power of the study, 80%. In accordance with these data, the sample size was calculated to be 109 patients per group.

The inter-group comparison of urinary polyphenol excretion was performed using the following tests: *t*-test for independent samples; linear regression analysis for the concentrations of the different polyphenolic components of the cranberry syrup and in the urinary phenolic acids; Cox's regression analysis for the risk of UTI and the different polyphenolic acids excreted in the urine, as recorded during follow-up.

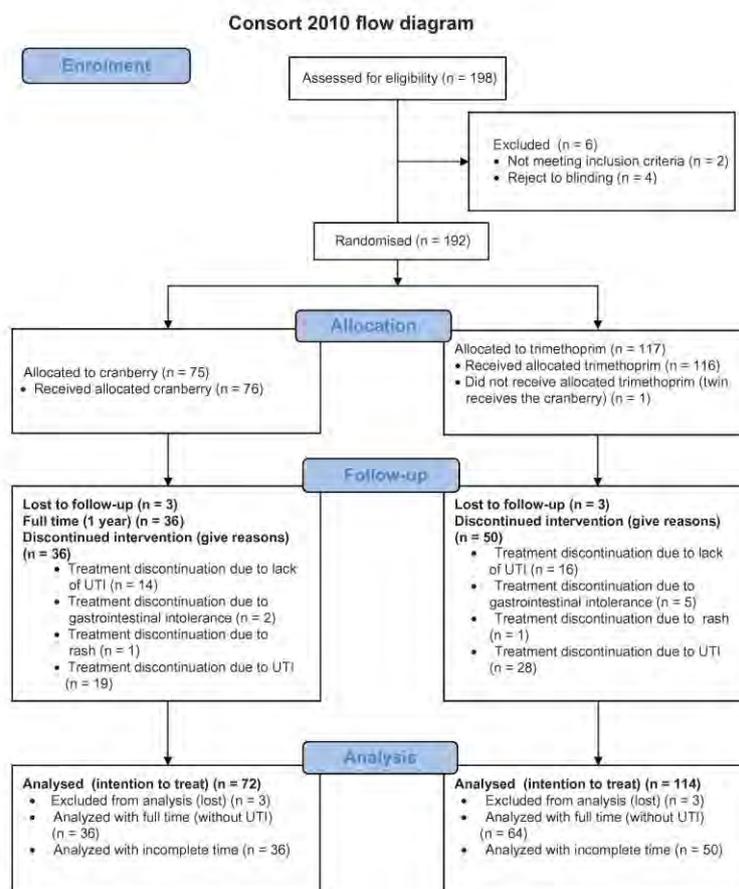
### Results

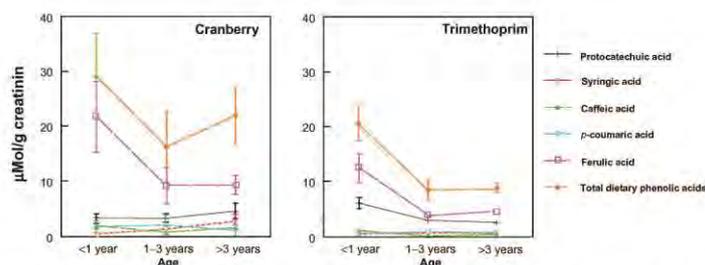
The study began on 1 January 2009 and ended on 31 October 2010 (curtailed by the lack of financial resources for its continuation). The maximum follow-up period of each patient recruited was one year. Due to problems in medical practice during the randomisation process, 75 patients received cranberry syrup and 117 received trimethoprim. 6 patients were lost to the study (3 in each group). Among the study population, 82 infants were aged less than one year. 51 of these were treated with trimethoprim and 31 with cranberry syrup. The prevalence of UTI associated with trimethoprim prophylaxis was 21%, versus 32% for those given the cranberry syrup (LogRank 1.13;  $P = 0.28$ ). Of the 49 children aged from 1–3 years, 28 were treated with trimethoprim and 21 received cranberry syrup. Among these children, the prevalence of UTI associated with trimethoprim prophylaxis was 14.2%, versus 4.7% for those given the cranberry syrup (LogRank 1.29;  $P = 0.25$ ). Of the 55 children aged over 3 years, 34 were given trimethoprim, and 21 received cranberry syrup. Among these children, the prevalence of UTI associated with trimethoprim prophylaxis was 38%, versus 38% for those given the cranberry syrup (LogRank 0.08;  $P = 0.77$ ).

Mean urinary osmolarity in lactating infants aged under 1 year was 356 mOsm/L (SD 233); in the children aged 1–3 years, the corresponding value was 725 mOsm/L (SD 199), while among the children

**Table 2.** Urinary excretion of phenolic acids of dietary origin by age strata.

(μMol/g creatinin)	Under 1 year			1–3 years			Over 3 years			Total		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD
Protocatechuic acid	37	5.2	4.8	27	3.1	2.0	29	3.2	3.0	93	4.0	3.7
Syringic acid	37	0.5	0.8	27	1.0	1.9	29	1.2	2.3	93	0.8	1.7
Caffeic acid	37	1.3	3.6	27	0.5	1.1	29	0.8	1.3	93	0.9	2.5
p-coumaric acid	37	0.8	1.5	27	1.4	4.8	29	0.7	1.3	93	1.0	2.8
Ferulic acid	37	15.6	16.9	27	6.6	9.4	29	6.0	4.3	93	10.0	12.3
Sinapinic acid	37	0.0	0.0	27	0.0	0.0	29	11.0	4.7	93	0.3	2.6
Total dietary phenolic acids	37	23.4	20.8	27	12.5	18.0	29	12.9	10.8	93	17.0	18.0

**Figure 1.** Flow diagram.



**Figure 2.** Urinary excretion of dietary phenolic acids following the intake of cranberry syrup or trimethoprim as a treatment for recurrent urinary infection. **Note:** Mean values (SEM) are shown.

aged over 3 years, it was 738 mOsm/L (SD 254). Thus, osmolarity among the lactating infants aged less than 1 year was significantly lower than that observed in the older age groups. No significant differences were detected in this respect between children who developed UTI and those who did not, and therefore, *a priori*, we discount the greater or lesser intake of water as an element associated with the development of UTI. In our sample, 44.3% of the urinary infections affected subjects aged less than one year, with 26.5% affecting those aged 1–3 years, and 29.2% affecting those aged over three years.

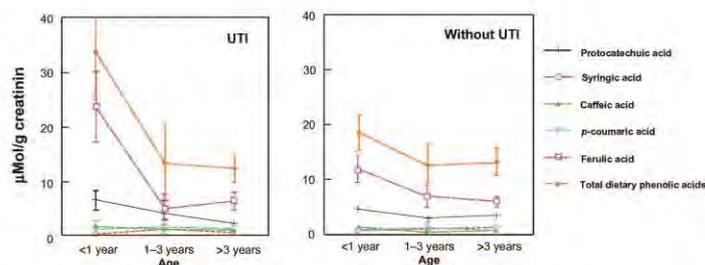
#### Analysis of urinary excretion of dietary phenolic acids

At 12 hours after receiving the cranberry syrup, these patients eliminated slightly greater urinary concentrations of total phenolic acids than did the patients who received trimethoprim (22.2  $\mu\text{Mol/g}$  creatinin (SD 23.4), vs. 13.9  $\mu\text{Mol/g}$  creatinin (SD 13.2);  $t = 2.18$ ,  $P = 0.03$ , respectively). We compared the

quantity of cranberry syrup consumed with the urinary excretion of ferulic acid, and found no statistically significant association ( $b = -3.3$ ;  $t = 1.8$ ;  $P = 0.08$ ). The urinary excretion of ferulic acid and of total phenolic acids was higher among the infants aged under 1 year, with no significant differences in this respect being observed between those given cranberry syrup or trimethoprim. Moreover, the patients who developed urinary infection during the follow-up period had higher urinary levels of ferulic acid than did those who completed the follow-up period without any such infection ( $t = 2.39$ ;  $P = 0.01$ ) (Fig. 3).

In general, increased urinary osmolarity was associated with a lower excretion of ferulic acid, with creatinine decreasing by 0.016  $\mu\text{Mol/g}$  for each increase of 1 mOsm/L in urinary osmolarity ( $b = 0.016$ ;  $P < 0.001$ ).

After performing Cox's regression analysis on the ferulic acid and adjusting for urinary osmolarity, we observed that increased urinary excretion of



**Figure 3.** Urinary excretion of dietary phenolic acids in patients who subsequently developed UTI and in patients who did not. **Note:** Mean values (SEM) are shown.



ferulic acid was associated with a greater risk of UTI developing in infants aged under 1 year (RR 1.06; CI 95% 1.024–1.1;  $P = 0.001$ ). As the prevalence of UTI was greater among the infants aged under 1 year, we adjusted the Cox's regression for urinary osmolarity and age, thus obtaining a relative risk for UTI of 1.04 (CI 95% 1.02–1.08). In the children aged 1–3 years and over three years, the relative risk of UTI associated with increased ferulic acid was 0.97 (CI 95% 0.79–1.27;  $P = 0.96$ ) and 1.01 (CI 95% 0.86–1.19;  $P = 0.88$ ), respectively.

### Analysis of urinary excretion of metabolic phenolic acids

The urinary excretion of total phenolic acids of metabolic origin among the patients given cranberry syrup was 681.5  $\mu\text{Mol/g}$  creatinine (SD 573.2), versus 664.6  $\mu\text{Mol/g}$  creatinine (SD 656.4) for those given trimethoprim. In the children aged under 1 year, the urinary excretion of homovanillic acid was significantly greater among those given cranberry syrup ( $t = 2.49$ ;  $P = 0.01$ ); this difference was not observed in the other age groups (Table 3).

Only among the children aged over 3 years did we observe levels of 4-hydroxybenzoic acid that were significantly greater among the children who

developed a urinary infection. Cox's regression analysis did not reveal any change in the risk of UTI associated with a greater excretion of phenolic acids of metabolic origin.

### Discussion

The excretion of ferulic and homovanillic acids was greater among the infants aged less than 1 year than in the other age groups. These infants presented a greater frequency of UTI, which was significantly related to the greater excretion of ferulic acid. The increased excretion of homovanillic acid during treatment with cranberry syrup could be of interest with respect to designing studies such as the determination of catecholamines and their metabolites in children with possible neuroblastomas or pheochromocytomas. This aspect has been discussed by Combet et al.<sup>17</sup> Other authors have observed that a diet of cereals supplemented with berries can cause an increase in the urinary excretion of homovanillic acid.<sup>18</sup> Ferulic acid is the phenolic acid that is most abundantly excreted in the urine when a cereal diet is consumed.<sup>11</sup> Nevertheless, the strong association observed between the excretion of ferulic acid and the risk of urinary infection requires further investigation. Ferulic acid has presented

**Table 3.** Urinary excretion of phenolic acids of metabolic origin by age strata.

( $\mu\text{Mol/g}$ creatinin)	Under 1 year			1–3 years			Over 3 years			Total		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD
3-coumaric acid	37	0.0	0.0	27	0.0	0.0	28	0.0	0.0	92	0.0	0.0
Isoferulic acid	37	5.0	7.7	27	1.4	1.7	28	2.9	3.8	92	3.3	5.6
Dihydroferulic acid	36	5.0	6.7	27	6.2	12.4	28	3.5	3.9	91	4.9	8.2
3,4-di-dihydroxy phenylpropionic acid	37	4.2	6.6	27	2.1	2.2	28	2.1	2.5	92	2.9	4.6
<i>m</i> -hydroxyphenyl propionic acid	37	1.8	4.3	27	5.1	18.4	28	2.3	3.3	92	2.9	10.5
<i>p</i> -hydroxyphenyl propionic acid	37	0.1	0.2	27	3.7	14.5	28	0.0	0.1	92	1.1	7.9
Homovanillic acid	37	116.4	39.1	27	75.7	36.8	28	50.3	22.7	92	84.4	44.1
3,4-di-hydroxyphenyl acetic acid	37	32.4	20.9	27	22.1	17.5	28	16.6	8.0	92	24.6	18.0
3-hydroxyphenyl acetic acid	37	16.1	21.3	27	48.6	55.2	28	27.3	34.2	92	29.02	39.7
4-hydroxyphenyl acetic acid	37	488.7	393	27	253.8	324	28	154.3	57.0	92	318.0	337
Vanillic acid	37	252.3	529	27	145.6	176	28	80.5	111	92	168.7	359
3-hydroxybenzoic acid	37	0.5	1.9	27	1.9	6.5	28	0.4	1.5	92	0.9	3.8
4-hydroxybenzoic acid	37	40.9	30.7	27	37.9	55.7	28	19.8	11.9	92	33.6	37.2
Total metabolic phenolic acids	37	963.1	730	27	593.6	594	28	359.7	181	92	671.0	622



in vitro activity as an inhibitor of interleukin 8,<sup>19</sup> with a pro-inflammatory and neutrophil activating effect. In consequence, various forms of traditional medicine have used the rhizome of *Cimicifuga* sp., which contains high concentrations of ferulic and isoferulic acid, as a remedy for various inflammatory processes.<sup>20</sup> It seems reasonable to believe that persistent high concentrations of ferulic acid in the urine could favour the development of urinary infections, by inhibiting the host's pro-inflammatory mechanisms.

Cranberry syrup has been found useful for treating UTI in adults<sup>5,7</sup> and children.<sup>21</sup> Various studies have related the bioactivity of cranberry with its content of proanthocyanidins.<sup>9,22</sup> Lavigne et al<sup>23</sup> observed that the anti-adherent effect of cranberry is dose-dependent, and therefore the concentration of proanthocyanidins in urine determines the anti-adherent effect and, thus, clinical efficacy. In our study, due to the lack of references to comparable studies of a paediatric population, we considered the cranberry dose recommended for adults and adjusted it according to body mass. As the determination of proanthocyanidins in urine presents results that are at the limits of sensitivity for the measuring equipment used, and as the concentrations of phenolic acids in urine are equivalent for most fractions in patients given either cranberry or trimethoprim, we believe that the doses of cranberry syrup used in this study might be insufficient for the lowest-weight infants. This age group, with urinary excretion featuring high levels of ferulic acid, should be given a fixed amount of cranberry syrup in order to ensure a minimum concentration of proanthocyanidins in the urine. The cranberry syrup used in this study was characterised and found to contain different concentrations of flavonoids, flavonols, proanthocyanidins and low concentrations of ferulic acid.<sup>12</sup> Therefore, we believe the high levels of ferulic acid detected in infants aged less than 1 year were probably due to their higher dietary intake of cereals. Although some of these compounds, and particularly the glycoside flavonoids, may be absorbed in the small intestine and eliminated in the urine,<sup>24</sup> it is accepted that while various hydroxycinnamic acids are subject to cellular metabolic metabolism, most of the polyphenolic compounds are broken down by intestinal microflora in the colon. Up to 44% of the protocatechuic acid is derived from the anthocyanins

consumed, especially the cyanidin-3-glucoside.<sup>25</sup> Dietary flavonols and especially quercetin could be metabolised, mainly into phloroglucinol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid.<sup>26</sup> The procyanidins in the diet are metabolised by the intestinal microflora, fundamentally into 3,4-di-dihydroxyphenylpropionic, protocatechuic, 4-hydroxybenzoic and 3,4-dihydroxyphenylacetic acids, which are eliminated in the urine.<sup>27</sup> In our study, the patients who were given cranberry syrup presented a urinary excretion of 3,4-di-dihydroxyphenylpropionic, protocatechuic and 3,4-dihydroxyphenylacetic acids which was similar to that of the patients given trimethoprim. It is noteworthy that the children aged over 3 years who developed UTI presented higher urinary concentrations of 4-hydroxybenzoic acid, which could indicate a greater metabolism by the intestinal microflora of the proanthocyanidins supplemented with the syrup.

According to the results obtained, the excretion of ferulic acid is higher in infants aged under 1 year. This is assumed to be related to the predominance of cereals in the diet and not to the ingestion of cranberry or trimethoprim. However, as we did not conduct a nutritional survey and due to problems in the randomization process, we cannot be categorical in this respect. This increased excretion of ferulic acid was associated with an increased risk of urinary infection.

### Acknowledgements

We thank Dr. Tarja Nurmi (Finland) for technical support.

### Competing Interests

Author(s) disclose no potential conflicts of interest.

### Funding

Funded as a part of a broader research project funded by the Instituto de Salud Carlos III.

### Author Contributions

Substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data: JU, VFP, ARL, RRB, MMO, AMH. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: JU, RRB, AMC, PTP. Final approval of the version to be published: JU. All authors reviewed and approved of the final manuscript.



## Disclosures and Ethics

As a requirement of publication author(s) have provided to the publisher signed confirmation of compliance with legal and ethical obligations including but not limited to the following: authorship and contributorship, conflicts of interest, privacy and confidentiality and (where applicable) protection of human and animal research subjects. The authors have read and confirmed their agreement with the ICMJE authorship and conflict of interest criteria. The authors have also confirmed that this article is unique and not under consideration or published in any other publication, and that they have permission from rights holders to reproduce any copyrighted material. Any disclosures are made in this section. The external blind peer reviewers report no conflicts of interest.

## References

1. American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. Practice parameter: the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. *Pediatrics*. Apr 1999;103(4 Pt 1):843-52.
2. Craig JC, Simpson JM, Williams GJ, Lowe A, Reynolds GJ, McTaggart SJ, et al. Antibiotic prophylaxis and recurrent urinary tract infection in children. *N Engl J Med*. Oct 29, 2009;361(18):1748-59.
3. Lutter SA, Currie ML, Mitz LB, Greenbaum LA. Antibiotic resistance patterns in children hospitalized for urinary tract infections. *Arch Pediatr Adolesc Med*. Oct 2005;159(10):924-8.
4. Kontiokari T, Sundqvist K, Nuutinen M, Pokka T, Koskela M, Uhari M. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ*. Jun 30, 2001;322(7302):1571.
5. McMurdo ME, Argo I, Phillips G, Daly F, Davey P. Cranberry or trimethoprim for the prevention of recurrent urinary tract infections? A randomized controlled trial in older women. *J Antimicrob Chemother*. Feb 2009;63(2):389-95.
6. Guay DR. Cranberry and urinary tract infections. *Drugs*. 2009;69(7):775-807.
7. Jepson RG, Craig JC. Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;1:CD001321.
8. Di MP, Agniel R, David K, Templer C, Gaillard JL, Denys P, et al. Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. *World J Urol*. Feb 2006;24(1):21-7.
9. Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Nat Prod*. Sep 2000;63(9):1225-8.
10. Botto H, Neuzillet Y. Effectiveness of a cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) preparation in reducing asymptomatic bacteriuria in patients with an ileal enterocystoplasty. *Scand J Urol Nephrol*. Apr 2010;44(3):165-8.
11. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. May 2004;79(5):727-47.
12. Iswaldi I, Gómez-Caravaca AM, Uberos J, Lardón M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Characterization by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in a cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacterial activity. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;58:34-41.
13. Gonthier MP, Donovan JL, Texier O, Felgines C, Remesy C, Scalbert A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med*. Oct 15, 2003;35(8):837-44.
14. Deprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapiere C, et al. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr*. Nov 2000;130(11):2733-8.
15. Rios LY, Gonthier MP, Remesy C, Mila I, Lapiere C, Lazarus SA, et al. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr*. Apr 2003;77(4):912-8.
16. Ward NC, Croft KD, Puddey IB, Hodgson JM. Supplementation with grape seed polyphenols results in increased urinary excretion of 3-hydroxyphenylpropionic acid, an important metabolite of proanthocyanidins in humans. *J Agric Food Chem*. Aug 25, 2004;52(17):5545-9.
17. Combet E, Lean MEJ, Boyle JG, Crozier A, Davidson DF. Dietary flavonols contribute to false-positive elevation of homovanillic acid, a marker of catecholamine-secreting tumors. *Clin Chim Acta*. Jan 14, 2011;412(1-2):165-9.
18. Nurmi T, Mursu J, Heinonen M, Nurmi A, Hiltunen R, Voutilainen S. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J Agric Food Chem*. Mar 25, 2009;57(6):2274-81.
19. Hirabayashi T, Ochiai H, Sakai S, Nakajima K, Teresawa K. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections in vitro and in vivo. *Planta Med*. 1995;61(3):221-6.
20. Sakai S, Kawamata H, Kogure T, Mantani N, Teresawa K, Umatake M, et al. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in RAW264.7 cells. *Mediators Inflamm*. 1999;8(3):173-5.
21. Ferrara P, Romaniello L, Vitelli O, Gatto A, Serva M, Cataldi L. Cranberry juice for the prevention of recurrent urinary tract infections: a randomized controlled trial in children. *Scand J Urol Nephrol*. May 9, 2009;1-5.
22. Tempera G, Corsello S, Genovese C, Caruso FE, Nicolosi D. Inhibitory activity of cranberry extract on the bacterial adhesiveness in the urine of women: an ex-vivo study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. Apr 2010;23(2):611-8.
23. Lavigne JP, Bourg G, Combescure C, Botto H, Sotto A. In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) capsules. *Clin Microbiol Infect*. Jan 7, 2008.
24. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MIB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*. Dec 1995;62(6):1276-82.
25. Vitaglione P, Domarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr*. Sep 2007;137(9):2043-8.
26. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res*. Feb 1998;21(1):17-23.
27. Gonthier MP, Donovan JL, Texier O, Felgines C, Remesy C, Scalbert A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med*. Oct 15, 2003;35(8):837-44.



## **5. ABSTRACT**



---

## ABSTRACT

---

### Justification

There is a strong controversy when justifying antibiotic prophylaxis in children with recurrent urinary tract infections and vesicoureteral reflux. At the same time, there is a growing interest in the potential health benefits of natural plant components such as polyphenols. Therefore, cranberry has been widely studied and proven as an effective agent in the prevention of recurrent Urinary Tract Infection (UTI). The cranberry contains at least two compounds that have been implicated in its well studied antiadhesion effect. However, it is felt that the real mechanism of action and the metabolites involved remain unclear. With this study, we intend to demonstrate the usefulness of cranberry in a large paediatric population at risk of recurrent UTI, and to understand what is the role of cranberry and its metabolites, specially phenolic acids, in its final outcome.

### Methods

A randomised double-blind clinical trial has been performed to prove the effectiveness and safety of cranberry versus Trimethoprim in a paediatric population. This study was designed as a test of equivalence or non-inferiority. The statistical analysis was performed using the Kaplan Meier method. It has been registered within the European Clinical Trial Registry EuDract 2007-004397-62.

The composition of the cranberry extract used in this study has been characterised using High Performance Liquid Chromatography Time of Flight Mass Spectrometry (HPLC-TOF-MS).

The excretion of phenolic acids has been measured in morning/evening urine within a selected group of these patients and it has been compared with the consumption of either cranberry or trimethoprim.

*Escherichia coli* (*E. coli*) subsets have also been incubated with different concentrations of cranberry and its metabolites in order to understand the change in non-specific antiadhesion properties such as hydrophobicity and haemagglutination inhibition. The influence of cranberry over these non-specific antiadhesion properties have been put in relation with its inhibition of biofilm formation.

### Results

A total of 198 patients were eligible to be included in the study. Gastrointestinal intolerance was observed in 5 of the cases assigned to trimethoprim and in 2 of those

assigned to cranberry syrup treatment. In patients younger than 1 year, the cumulative rate of UTI associated with trimethoprim prophylaxis was 19% (95% Confidence Interval: CI, 4–35) in boys and 43% (95% CI, 18–68) in girls. In patients younger than 1 year, the cumulative rate of UTI associated with cranberry prophylaxis was 46% (95% CI, 23–70) in boys and 17% (95% CI, 0–38) in girls. For both sexes overall, the cumulative rate of UTI in infants that received trimethoprim was 28% (95% CI, 13–42) while this rate was 35% (95% CI, 17–52) in infants that received cranberry.

The overall cumulative rate of UTI in children older than 1 year was 35% (95% CI, 21–50) in those that received trimethoprim and 26% (95% CI, 12–41) in those that received cranberry. By sex, the cumulative rate of UTI in males that received trimethoprim was 33% (95% CI, 1.8–65) compared to 8% (95% CI, 0–26) in males that received cranberry.

Incubation of *E. coli* with cranberry syrup resulted in a reduction in its surface hydrophobicity and did not depend upon the quantities of Type 1 or Type P fimbriae expressed. The incubation of *E. coli* with 1:1000 dilutions of cranberry extract (which do not affect the haemagglutination mediated by Type P fimbriae) did produce significant reductions in surface hydrophobicity, thus showing that extremely low levels of this extract are capable to modify the non-specific adherence properties of *E. coli*.

In TSB medium, biofilm formation was inhibited after incubation with cranberry syrup ( $W = 0.93$ ,  $P < 0.001$ ), and the formation of biofilm in the absence of cranberry syrup was significantly higher.

Our data corroborate the relation between the increased presence of hydroxybenzoic acid in urine and a decrease in the Surface hydrophobicity of *E. coli*. Besides, our results show that the presence of isoferulic acid in urine is associated with decreased biofilm formation by *E. coli*.

The excretion of ferulic and homovanillic acids was greater among the infants aged less than 1 year than in the other age groups. These infants presented a greater frequency of UTI, which was significantly related to the greater excretion of ferulic acid.

## Conclusions

Our study confirms that the use of cranberry is safe in infants and children. The efficacy of cranberry is not inferior to that of trimethoprim for the prophylaxis of recurrent UTI in children, although its efficacy in infants less than 1 year of age can be considered inferior to that of trimethoprim at the doses we administered.

Our study shows that cranberry can modify the surface hydrophobicity and the biofilm formation of *E. coli* on polystyrene (microtitre plates), the latter effect being dependent on the characteristics of the culture medium.

We believe that the doses of cranberry syrup used in this study might be insufficient for the lowest-weight infants. This age group, with urinary excretion featuring high levels of ferulic acid, should be given a fixed amount of cranberry syrup in order to ensure a minimum concentration of proanthocyanidins in the urine.

## **6. INTRODUCCIÓN**



---

## INTRODUCCIÓN

---

### 6.1. Importancia de la infección de orina en la infancia

La infección del tracto urinario (ITU) está considerada entre los más importantes problemas de salud a nivel mundial. Se han reportado hasta 150 millones de ITUs en el mundo, lo cual supone una importante carga económica para sociedad. El término infección urinaria se refiere a una serie de signos y síntomas procedentes del tracto genitourinario, así como a la presencia de bacterias en la orina, habitualmente más de 100.000 UFC.

La mayoría de las infecciones se localizan en las vías urinarias bajas, en la vejiga que da lugar a cistitis bacteriana. Aunque episodios de cistitis simple son muy comunes tanto en hombre como en mujeres, las mujeres son más propensas a desarrollarlas con una relación 2:1 con respecto a los hombres. Entre un 30-50% de todas las mujeres padecerán una ITU a lo largo de sus vidas según las fuentes consultadas <sup>1, 2</sup>. Además, hasta un 20-30 por ciento de esas mujeres experimentaran 2 o más recurrencias. En caso de infecciones recurrentes, los pacientes se ven frecuentemente expuestos a largos cursos de antibióticos lo cual es desfavorable tanto desde el punto de vista económico como por el potencial desarrollo de resistencias antibióticas.

La mayoría de las ITUs son el resultado de colonización ascendente de bacterias uropatógenas procedentes del tracto gastrointestinal que acceden a través de la uretra. El siguiente paso de la adherencia es la adhesión a la pared de la vejiga gracias a la formación de biofilm.

En cuanto a población pediátrica, la ITU es la infección constatable más frecuente en la infancia <sup>2, 2</sup>, fuentes bibliográficas consultadas muestran una prevalencia total aproximada del 2% - 5% en lactantes y niños <sup>3</sup>. Alrededor del 5-8% de niños y niñas menores de 2 años con fiebre sin una focalidad definida tienen una ITU. En los primeros 4-6 meses de vida es más frecuente en varones, cuando éstos no están circuncidados como es lo habitual en Europa, con una relación niño/niña del orden de 4-5/1. Desde los 6 meses y más aún a partir de los 3 años la ITU es mucho más frecuente en niñas, de modo que la padecen cerca de un 5% de los escolares, con una relación niña/niño superior a 10/1.

Un apartado especial ocupa la incidencia de la infección urinaria en los recién nacidos que se estima de 0,5-1% en recién nacidos a término y 3-5% en prematuros. La verdadera incidencia en este colectivo es difícil de establecer porque los métodos de recogida de orina empleados sobreestiman el número de casos debidos a contaminación. En nuestro medio la prevalencia de ITU en los recién nacidos pretérmino oscila entre 4

y 25%<sup>4</sup>. Estos datos varían además en función de si la infección es nosocomial o adquirida en la comunidad.

Como veremos más adelante, edad, sexo, estado de circuncisión son factores que modifican la prevalencia de ITU en la infancia después del periodo neonatal. Algunos estudios, han sugerido que la raza podría también ser un factor relevante siendo la infección del tracto urinario más frecuente en la raza blanca en comparación con la raza negra; sin embargo, la heterogeneidad de los estudios que analizan esta variable no han permitido concluir al respecto<sup>5</sup>.

La recurrencia de ITU es frecuente (15-20%), especialmente durante el primer año tras el episodio inicial, aumentando el riesgo con el número de episodios previos. El reflujo vésico-ureteral (RVU) se detecta en el 30-40% de niños y niñas menores de 2 años y en el 20-25% de las niñas escolares con ITU recurrente<sup>6</sup>.

Todos estos datos nos previenen de la magnitud potencial de la ITU, de hecho, la afectación renal y la posibilidad de desarrollo de cicatrices renales, establecida mediante gammagrafía renal con DMSA, se estima en el 40-70% de las ITUs febriles<sup>7</sup>. Por otra parte, la edad menor de 2 años, el retraso del tratamiento, la ITU recurrente, el RVU en grado III o superior y la uropatía obstructiva son los factores de mayor riesgo para el desarrollo de cicatriz renal cuya prevalencia se estima en un 6-15% tras ITU febril en este rango de edad.

Las cicatrices renales pueden asociarse con la presencia de hipertensión arterial (HTA) hasta un 10-20%, proteinuria persistente e insuficiencia renal crónica (IRC).

Algunas publicaciones, son desalentadoras respecto a la precocidad del tratamiento médico en la prevención de la formación de cicatrices renales. Aunque un tratamiento adecuado en las primeras 24 horas disminuye la posibilidad de afectación renal durante la fase aguda de ITU. Todas estas consideraciones fuerzan la idea de la importancia de la prevención en la infección de orina.

### 6.1.1. Definición de infección urinaria

La infección urinaria (IU) engloba un grupo heterogéneo de problemas que tienen en común la concurrencia de bacterias en orina e inflamación de los tejidos urinarios en diferente grado.

Como citamos anteriormente puede afectar frecuentemente a la uretra o la vejiga (vías urinarias bajas) pero también a los uréteres, pelvis renal, cálices y parénquima renal (vías urinarias altas). Desde el punto de vista clínico en algunas ocasiones es difícil establecer el diagnóstico topográfico, especialmente en los niños pequeños, ya que la sintomatología suele ser muy inespecífica. Con un criterio amplio y atendiendo básicamente a los aspectos relevantes para la práctica clínica pediátrica, consideramos los siguientes términos y definiciones:

1. **Pielonefritis aguda:** es la infección del tracto urinario (ITU) que presenta fiebre > 38,5° C asociada a signos biológicos de inflamación, por ejemplo, la proteína C reactiva (PCR), la procalcitonina o la velocidad de sedimentación globular (VSG) aumentadas. Comporta un riesgo potencial de lesión renal con aparición

de cicatrices corticales renales. En la exploración encontraremos afectación del estado general, taquicardia, aspecto séptico, dolor a la palpación abdominal, puñopercusión renal positiva.

2. **Cistitis:** es la IU localizada en la vejiga de la orina, que acostumbra a ser afebril, con presencia de síntomas miccionales y ausencia de dolor lumbar, y que no comporta riesgo de lesión del parénquima renal. No precisaría análisis de sangre.
3. **Uretritis:** poco frecuente en pediatría como entidad aislada, se manifiesta también con síntomas miccionales sin fiebre y, a menudo, con eliminación de exudado tal y como se ve en adolescentes. En niños más pequeños puede formar parte, prácticamente indiferenciable por la clínica, de balanopostitis, de vulvovaginitis o de cistitis.
4. **Bacteriuria asintomática:** presencia de un recuento significativo de bacterias en la orina en ausencia de signos o síntomas clínicos.
5. **Infecciones recidivantes del tracto urinario.** Se habla de recidiva cuando coexisten al menos 3 episodios de ITU al año. Cada nuevo brote de infección deberá tratarse durante 10-14 días como en la infección del tracto urinario de alto riesgo. Debe distinguirse entre:
  - a. Recaídas después de tratamiento, altamente sugestivas de malformaciones del tracto urinario.
  - b. Reinfecciones. Suelen presentarse dentro del primer año después de la última infección urinaria. Generalmente son expresión de una bacteriuria asintomática.

#### 6.1.2. Etiología de la ITU

En los primeros años de vida se dan algunas circunstancias que favorecen la contaminación perineal con flora del intestino, como son la incontinencia fecal, la exposición –a veces prolongada- a las heces en los pañales y la fimosis fisiológica.

*Escherichia coli*, es el microorganismo que más frecuentemente invade la vía urinaria en ITUs no complicadas (90% de los casos). Accede por vía ascendente al tracto urinario y es conocida su apetencia y capacidad de adhesión al urotelio mediante sus fimbrias o pili. Una vez colonizada la vejiga, las características de la infección dependerán de factores propios del paciente, así como de la cepa en cuestión. Sin embargo, es preciso tener en cuenta otros patógenos y circunstancias especiales:

Menos frecuentes:

- *Klebsiella sp* (hasta un 25% en recién nacidos).
- *Proteus mirabilis*.
- Otras enterobacterias (*Shigella*, *Salmonella*...).
- *Pseudomona aeruginosa* (frecuente en recién nacidos e infecciones nosocomiales).
- *Enterococcus faecalis*.
- *Staphilococcus coagulasa negativo* (en recién nacidos y niñas adolescentes sexualmente activas).

Raros:

- *Estreptococo del grupo B*.

- *S. aureus*.
- Otras bacterias.
- *Cándida*.
- Otros hongos (considerar en pacientes diabéticos o con sondajes repetitivos).
- *Adenovirus* (cistitis hemorrágica).

Tabla 6.1. Aislamientos bacteriológicos en niños con ITU no complicada <sup>3</sup>.

Microorganismo	Porcentaje
<i>E. coli</i>	75-90%
<i>Klebsiella sp.</i>	1-8%
<i>Proteus sp.</i>	0.5-6%
<i>Enterobacter sp.</i>	0.5-6%
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1-2%
<i>Enterococo</i>	3-8%
<i>Staphilococo</i>	2-5%
Otros	1-2%

### 6.1.3. Factores de riesgo

Los factores de riesgo en el desarrollo de cicatrices renales son:

- Edad del niño. Tras revisar la literatura los datos son uniformes en cuanto a que los niños menores de 2 años son los que tienen el máximo riesgo de cicatriz pielonefrítica.
- Obstrucción al flujo urinario. La obstrucción renal de diversas causas, se asocia con un elevado riesgo de desarrollo de cicatrices pielonefríticas.
- Reflujo vesicoureteral (RVU). Es la anomalía de la vía urinaria más frecuente en niños con una prevalencia aproximada del 1%. Existe una estrecha correlación entre la existencia de infección urinaria, reflujo vesicoureteral y pielonefritis cicatrizal.

Aunque un reflujo estéril a alta presión puede inducir daño renal experimentalmente, la acción nociva se ejerce sobre todo cuando al reflujo se asocia la infección urinaria. La lesión renal parece ser favorecida por la presencia del llamado "reflujo intrarrenal" que ocurre en los grados más altos de RVU y que permite que la orina infectada refluya a través de los colectores papilares al interior del parénquima renal, poniéndose en marcha el proceso inflamatorio parenquimatoso y las reacciones inmunológicas a ese nivel y como consecuencia de ambos factores el desarrollo posterior de cicatrices renales y la atrofia renal.

Actualmente existe gran controversia que existe en torno al tema, dado que se cuestiona su verdadera prevalencia, (incluyendo la población sana), manejo diagnóstico, terapéutico, pronóstico a largo plazo, dada la gran importancia que tiene como factor de riesgo de ITU en pediatría, merece un apartado especial.

El RVU primario es un proceso heterogéneo que se define como el paso retrógrado no fisiológico de la orina desde la vejiga al uréter, sin que exista una causa anatómica o neurológica que lo justifique.

Las clasificaciones del RVU se fundamentan en la estratificación de la magnitud del paso retrógrado de la orina de la vejiga al uréter y de la capacidad de alterar la estructura anatómica de la vía urinaria. Por tanto, son dependientes de la técnica diagnóstica utilizada.

Cuando hablamos de grados de reflujo vesicoureteral lo hacemos generalmente basándonos en la Clasificación del RVU primario, según el International Reflux Study Comité (en base a los hallazgos de la cistourografía miccional seriada –CUMS-).

- I. El reflujo solo alcanza el uréter, sin dilatarlo.
- II. El reflujo alcanza el uréter, la pelvis y los cálices renales, sin dilatarlos.
- III. El reflujo produce una ligera dilatación del uréter, la pelvis y los cálices renales, con preservación de los fónix.
- IV. Moderada dilatación uretero-pielo-caliciliar con cierto grado de tortuosidad manteniendo la visualización de las impresiones papilares.
- V. Gran dilatación uretero-pielo-caliciliar con tortuosidad grave, con pérdida de la morfología calicilar normal y de la visualización de las impresiones papilares.

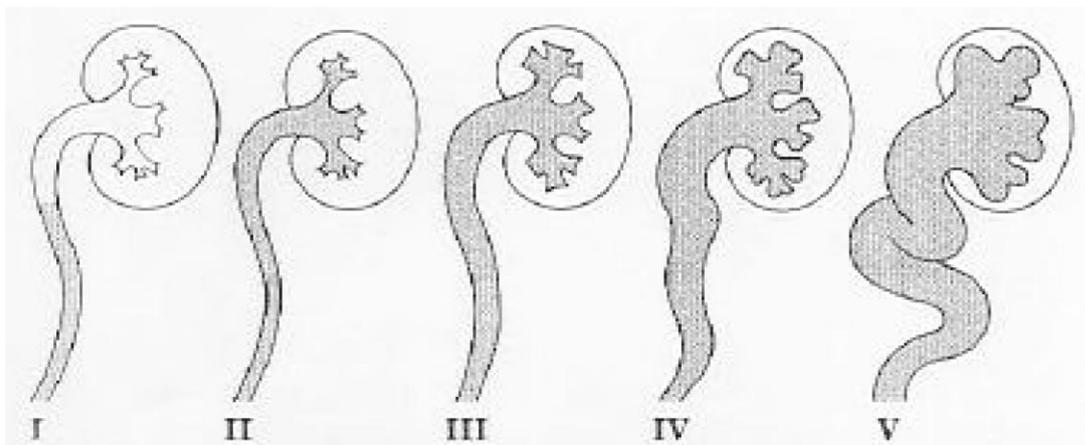


Figura 6.1. Grados de reflujo vesicoureteral <sup>8</sup>

Clásicamente se ha estimado una prevalencia en torno al 1%, siendo la anomalía de la vía urinaria más frecuente, aunque la verdadera prevalencia del RVU en la población pediátrica general sana es desconocida, dado que no existen estudios en este sector de la población.

Una revisión sistemática realizada por Sargent en *el año 2000* <sup>9</sup> muestra que existen datos epidemiológicos que indican que la prevalencia del reflujo en los niños normales puede ser más elevada de lo estimado hasta ahora y que muchos de los casos evolucionan de forma asintomática sin desarrollar nunca una infección urinaria. Por otro

lado, existen grupos de pacientes con alto riesgo de presentar un RVU, como son los pacientes con su primer episodio de infección urinaria, los recién nacidos y lactantes diagnosticados prenatalmente de hidronefrosis, y los hijos y hermanos de pacientes con RVU<sup>8</sup>.

#### 6.1.4. Cicatrices renales, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal terminal e HTA

Si tenemos en cuenta la relación con el grado de reflujo, aunque la ausencia de RVU no excluye la presencia de cicatrices renales, parece existir una relación entre el grado de RVU y la presencia de cicatrices. Diversos estudios refieren que las cicatrices renales están presentes en aproximadamente la mitad de los niños con RVU de grado igual o superior a III. La ITU es el motivo más frecuente que conduce al diagnóstico de RVU y de lesión renal segmentaria no displásica con fibrosis y atrofia (NR) tanto en niños como en adultos. En general la NR es más frecuente en las mujeres; sin embargo, en el primer año de vida es más frecuente en los varones.

De acuerdo a los datos de la European Dialysis and Transplant Association (EDTA), la NR es la causa de entrada en programas de diálisis-transplante del 20-25% de los menores de 15 años y del 5% del total de todos los pacientes.

Todos los autores reconocen una estrecha relación entre el daño renal por reflujo y la HTA, considerando que la presencia de cicatrices renales incrementa el riesgo de desarrollarla.

También coinciden en estimar que la HTA afecta al 10% de los niños con nefropatía por reflujo, aunque dependiendo de los estudios la prevalencia varía entre el 0-38%.

La patogenia del RVUp es uno de los aspectos menos controvertidos en torno al tema, y parece que existe en general unanimidad en la literatura. Uno de los mecanismos patogénicos más importantes es la anomalía madurativa del sistema valvular de la unión vesico-ureteral y para entender dicha anomalía es necesario conocer la embriología del sistema genitourinario, al menos de una forma básica.

#### 6.1.5. Profilaxis antibiótica

La administración diaria de bajas cantidades de antibiótico ha sido la solución clásica a la hora de tratar de prevenir las ITUs en población pediátrica, especialmente en pacientes con anomalías anatómicas como el RVU discutido anteriormente. Recientes ensayos clínicos aleatorizados y a doble ciego han mostrado que la profilaxis con baja dosis de trimetoprima-sulfametoxazol está asociada con un modesto descenso en la aparición de infección de orina sintomática en niños con factores de riesgo (6%) comparado con placebo, Se ha establecido el número necesario a tratar (NNT) en 1,85 para evitar un episodio de infección<sup>10</sup>. Sin embargo, esta profilaxis antibiótica no elimina completamente el riesgo de padecer nuevos episodios, de hecho, se modificaron los patógenos normalmente implicados alterando sus patrones de resistencia a antibióticos. Se sabe que hasta el 87% de todas las infecciones de orina en niños son causadas por *E. coli* y sin embargo este patógeno es menos común en los niños que han tomado tratamiento antibiótico.

Especialmente en niños con infecciones recurrentes, reflujo vesicoureteral de alto grado y/o alteraciones anatómicas del tracto urinario, los medicamentos a utilizar como profilácticos en orden de preferencia serían en nuestro medio:

- Niños que puedan tomar comprimidos: Furantoína.
- Lactantes por encima de los 2 meses, y si no hay resistencias significativas en la sensibilidad local de los urocultivos: Trimetroprim.
- Menores de dos meses: amoxicilina asociada o no clavulánico, aunque hay que tener presente que asociado a clavulánico tiene un amplio espectro y puede crear resistencias.
- Si no se pueden administrar los anteriores intentar Fosfomicina como 2ª opción o a una cefalosporina de 1ª, 2ª o 3ª generación como alternativa.

En las últimas décadas se ha intentado con creciente interés hallar una alternativa al tratamiento antibiótico usando diferentes tipos de probióticos y terapias naturales de los cuales, el arándano Americano es el que más repercusión ha tenido hasta la fecha.

Vacunas y otros inhibidores de la adherencia microbiana continúan en proceso de investigación como se comentará a continuación una vez como conozcamos este mecanismo de virulencia bacteriana.

## 6.2. Patogenia: Virulencia bacteriana e ITU <sup>11</sup>

Entre los diversos factores de virulencia bacteriana destacan los antígenos de la pared celular (antígeno O) y los antígenos capsulares (antígeno K). La capacidad de los microorganismos de adherirse a las células uroepiteliales constituye el principal factor condicionante de la colonización inicial de la mucosa vesical. Existen dos tipos principales de adhesinas en *E. coli*: los pili (o fimbrias) tipo 1 y los pili (o fimbrias) tipo 2; los primeros son causa fundamentalmente de cuadros de cistitis y bacteriuria asintomática, ya que los receptores celulares para estas adhesinas parecen ser más abundantes en la mucosa vesical que en el uroepitelio alto. Las fimbrias tipo 2 reconocen receptores uroepiteliales localizados preferentemente a nivel del parénquima renal.

Patogenicidad y virulencia son términos muy semejantes, aunque presentan algunas diferencias. El poder patógeno o patogenicidad se refiere a la capacidad que poseen los microorganismos de producir una enfermedad, ya sea espontánea en el hombre o experimental en los animales de laboratorio; es, por tanto, un atributo general o cualitativo que se refiere a una especie microbiana y que permite compararla con las demás. (*S. typhi* y *S. pneumoniae* son patógenos y *Lactobacillus lactis* o *Bitidobacterium bifidus* no son patógenos.)

En cambio, el término virulencia se emplea para indicar el mayor o menor grado de patogenicidad entre las distintas cepas que componen una especie. Es un atributo cuantitativo, que introduce el concepto de grado; así, dentro de las especies *S. pneumoniae* o *E. coli* pueden existir cepas de distinta virulencia. En realidad, el término virulencia se refiere a cepas y el poder patógeno, a especies. Sin embargo, en la práctica, muchas veces, ambos términos se consideran sinónimos y se utilizan indistintamente.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que el poder patógeno o la capacidad de producir una enfermedad no dependen exclusivamente del microorganismo, sino también de características del huésped, ya que microorganismos muy patógenos para un huésped determinado pueden ser menos patógenos o no patógenos para otros, según su grado de resistencia orgánica. En consecuencia, como el poder patógeno o la enfermedad dependen de dos variables, se pueden expresar matemáticamente (Figura 6.2.) en cuyo numerador se incluyen los factores dependientes del microorganismo, en especial su número y virulencia (que a su vez depende de su capacidad para colonizar, penetrar, multiplicarse, invadir y producir alteraciones patológicas), y en el denominador, el grado de resistencia del huésped (inespecífica y específica). En este sentido, la enfermedad podría producirse teóricamente, tanto por un aumento de la virulencia del microorganismo como por una disminución de los mecanismos defensivos del huésped.

Aunque en algunos casos ha podido atribuirse exclusivamente a características del agente, se ha visto que en su mayoría depende más de las condiciones del huésped, lo que ha permitido explicar que también los microorganismos poco virulentos pueden ser patógenos cuando existe una disminución de los mecanismos de resistencia del huésped. Incluso se ha llegado a sugerir que cualquier microorganismo podría ser patógeno, siempre que se produjera una disminución suficiente de estos mecanismos de defensa.

$$E = \frac{N \times V}{R} = \frac{\text{(capacidad de colonización, penetración, multiplicación, invasión y lesional)}}{\text{Resistencia inespecífica y específica}}$$

Figura 6.2. Factores de virulencia y del poder patógeno ( $E$ = enfermedad,  $N$ =número,  $V$ =virulencia,  $R$ =resistencia del huésped)<sup>11</sup>.

### 6.2.1. Variaciones de la virulencia

La virulencia de una cepa no es un carácter estable, sino que puede variar como consecuencia de la aparición de mutaciones en el curso de su desarrollo y la presencia de factores que condicionan la selección de estas mutantes.

La virulencia puede aumentar por pases en animales susceptibles, que seleccionan las mutantes mejor adaptadas al crecimiento, multiplicación e invasión del animal. Algo muy parecido ocurre durante el comienzo de las epidemias, cuando la frecuente transmisión de la bacteria causal incrementa progresivamente su virulencia, dado que el huésped actúa como un mecanismo de selección de las mutantes más virulentas.

### 6.2.2. Medida de la virulencia

Se determina por la dosis mínima necesaria para producir un efecto patológico, que por lo general es la muerte del animal inoculado, o dosis letal (DL). Para reducir al mínimo las variaciones individuales de la resistencia del animal, la virulencia se ensaya inoculando un lote numeroso de animales normales de la misma especie, utilizando, por

su mayor precisión, la dosis mínima que produce la muerte del 50 % de animales inoculados, dosis letal 50 (DL50); si se toma como punto final la producción de una infección, se obtiene la dosis infectiva 50 (DI50), que puede ser muy pequeña para *Mycobacterium tuberculosis* ( $1 \times 10^{-1}$ ), moderada para *S. typhi* ( $1 \times 10^{-4}$ ) o elevada para *Vibrio cholerae* ( $1 \times 10^{-8}$ ). En virología se utiliza la dosis capaz de producir alteraciones citopáticas en el 50 % de cultivos celulares (DITC50).

### 6.2.3. Factores determinantes de la acción patógena

Las bacterias para poder manifestar su acción patógena deben ser capaces de:

- Llegar a la superficie del huésped por una puerta de entrada, colonizar el epitelio y resistir la acción de los sistemas locales de defensa: capacidad de colonización.
- Atravesar la barrera cutaneomucosa para alcanzar los tejidos subepiteliales y ponerse en contacto con el medio interno: capacidad de penetración.
- Multiplicarse en los tejidos del huésped interfiriendo con los mecanismos defensivos humorales y celulares del medio interno, lo que les permite establecerse e invadir el organismo: capacidad de multiplicación y de invasión.
- Producir alteraciones y lesiones en las células y tejidos del huésped, responsables del cuadro patológico: capacidad lesional.

### 6.2.4. Colonización

Las bacterias capaces de producir una acción patógena pueden proceder:

a) del exterior y llegar al organismo por una puerta de entrada, que puede ser la piel o con mayor frecuencia, las mucosas del aparato respiratorio, digestivo o urogenital (infección exógena),

b) del propio organismo, en especial de la flora microbiana normal (infección endógena). En este caso se trata de bacterias potencialmente patógenas u oportunistas, capaces de manifestar su acción cuando llegan a otros tejidos o concurren circunstancias que disminuyen la eficacia de los mecanismos de defensa.

En cualquier caso, para iniciar la infección, los patógenos deben fijarse o adherirse a las células y colonizar el epitelio.

### 6.2.5. Interacciones en el epitelio cutaneomucoso

En el epitelio cutaneomucoso, el primer obstáculo que las bacterias tienen que superar está representado por el estrato córneo de la piel y el moco y gel mucoso que recubre las mucosas, en las que existen diversos mecanismos defensivos. Están constituidos fundamentalmente por los sistemas mecánicos de eliminación (descamación del estrato córneo, sistema mucociliar del aparato respiratorio, peristaltismo intestinal), la presencia de fagocitos, sustancias bactericidas y anticuerpos locales (IgA secretora), así como por la existencia de una flora normal que actúa como barrera. Las bacterias patógenas presentan mecanismos, en gran parte desconocidos, que les permiten evitar la acción de estas defensas locales, que son, en algunos casos,

semejantes a los que actúan en el medio interno. En este sentido se conoce que las bacterias pueden presentar o producir:

1. Fermentos del tipo de mucinasas, glicosidasas o neuraminidasas (*Vibrio cholerae*), que descomponen las glicoproteínas del moco, facilitando la penetración.
2. Factores de superficie (cápsulas, antígenos de la pared celular), que inhiben la fagocitosis y la acción de las sustancias bactericidas de la mucosa.
3. Proteasas IgA. Cierta número de bacterias patógenas (*N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*) son capaces de secretar enzimas proteolíticas, que descomponen las IgA subclase A<sub>1</sub>, y, por tanto, de inactivar el sistema de defensa local específico de las mucosas.
4. Sustancias inhibidoras y bactericidas, como las bacteriocinas, que les permiten competir con la flora normal. Estos factores favorecen la penetración a través del moco y la implantación y adherencia de los patógenos a las células epiteliales.

#### 6.2.6. Virulencia y formación de Biofilm

La fijación bacteriana a un sustrato es el primer paso en la formación de biofilm. Clásicamente la formación de biofilm se ha relacionado con las ITUs secundarias a catéter, pero recientemente también se ha sugerido que la presencia de biofilm en las paredes de la vejiga urinaria puede estar relacionado con ITU recurrentes<sup>12</sup>.

Los biofilm son micro colonias bacterianas que forman una matriz extracelular con integridad funcional y estructural en diferentes estructuras como la pared mucosa vesical. Estas estructuras bioquímicas hacen que las bacterias desarrollen mecanismos para resistir la respuesta inmunitaria del huésped alterando incluso su fenotipo<sup>13</sup> y dando lugar a gérmenes más virulentos y con la aparición de resistencias antibióticas. Se piensa que están relacionadas con hasta un 60% de las infecciones en humanos y resultan muy difíciles de erradicar por lo que suponen un reto en la práctica clínica. Uno de los gérmenes más implicados en la formación de estas estructuras es *E. coli* que, a su vez, como ya sabemos, es responsable de hasta el 80% de las ITU adquiridas en la comunidad y del 50% de las nosocomiales. La contribución de sus fimbrias tipo 1 y P a la formación de biofilm ha sido estudiada por varios autores y parece depender de las características del medio de cultivo, el tipo de cepa y las características de superficie.

#### 6.2.7. Virulencia y *E. coli*

Las diferentes cepas de *E. coli* se identifican normalmente por el tipado serológico de sus antígenos de superficie. H (flagelar), O (lipopolisacárido) y en algunos casos, K (capsular).

En general, 184 O-grupos de *E. coli* se han descrito<sup>14</sup>. Las cepas de *E. coli* consideradas uropatógenas (UPEC) son 01, 02, 04, 06, 07, 08, 015, 016, 018, 021, 022, 025, 075 y 083. Alguna de los genes relacionados con factores de virulencia causantes de ITU severa son fimbrias P (pap), fimbrias tipo 1, Adhesina afimbriada I (afaI),

hemolisina (hly), factor citotóxico necrotizante (cnf1), aerobactina (aer), fimbrias S (sfa), entre otras fimbrias y adhesinas. Sin embargo, hay otros muchos genes relacionados con virulencia como *kpsMT*, *usp*, *iroN*, *fimH* y muchos más están relacionados con la patogenicidad de este germen. Estos factores de virulencia ayudan al microorganismo a colonizar la superficie epitelial del huésped y evitar o sublevar las defensas de este, causando invasión celular y posteriormente, lesión inflamatoria y enfermedad clínica. Las cepas UPEC frecuentemente producen fimbrias P (pap y prs) que son importantes para la colonización y persistencia de *E. coli* en el colon. Desde ahí se desplazarán hasta el tracto urinario. La habilidad de constituir biofilm juega un importante rol en la virulencia bacteriana <sup>15</sup>.

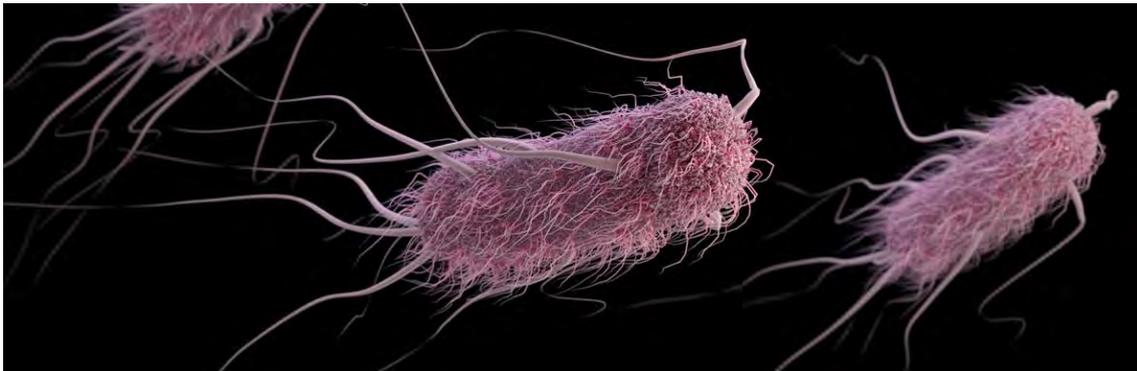


Figura 6.3. Fimbrias de *E. coli* <sup>15</sup>

Múltiples y recientes estudios muestran en la actualidad un preocupante incremento de resistencias bacterianas frente estas cepas uropatógenas de *E. coli*. En particular las resistencias a trimetoprim-sulfametoxazol, fluoroquinolonas y ciprofloxacino resultan muy preocupantes <sup>16</sup>.

#### 6.2.8 Adherencia bacteriana <sup>11</sup>

La adherencia es una propiedad de gran número de bacterias que les permite su fijación a la superficie de las células (eucariotas o procariotas) y aun a materiales inertes. Constituye uno de los factores más importantes para la colonización de la piel y mucosas por la flora normal, y para la puesta en marcha de la infección y de la enfermedad infecciosa.

La adherencia es un fenómeno de superficie que supone la interacción de la bacteria con la célula. En la mayoría de los casos se considera como un fenómeno específico como consecuencia de la combinación de sustancias presentes en la superficie de las bacterias o adhesinas con receptores de la superficie de las células.

##### 6.2.8.1. Adhesinas

Son compuestos de la superficie de las bacterias que actúan como mediadores del fenómeno de adherencia. Los estudios realizados han permitido demostrar que las adhesinas se encuentran asociadas con estructuras superficiales como las fimbrias o pili comunes, con polímeros extracelulares que forman la envoltura mucosa (glicocalix),

con diversos componentes de la membrana externa (proteínas, lipopolisacáridos) e incluso con estructuras más profundas que pueden aflorar a la superficie (ácidos lipoteicoicos). Pueden ser de naturaleza proteica (fimbrias, proteínas de la ME), hidrocarbonada (glicocalix) o lipídica (ácidos lipoteicoicos, lipopolisacáridos).

En las bacterias gramnegativas, la adherencia es debida en la mayoría de los casos a la presencia de adhesinas en las fimbrias o en otras estructuras de la membrana externa. Las fimbrias son apéndices filamentosos de naturaleza proteica frecuentemente portadores de adhesinas, que presentan la propiedad de combinarse con receptores de naturaleza polisacárida localizados en la superficie de las células epiteliales mediante uniones del tipo azúcar-lectina. Las fimbrias pueden estar repartidas uniformemente por toda la superficie de la célula o estar situadas sólo en los polos.

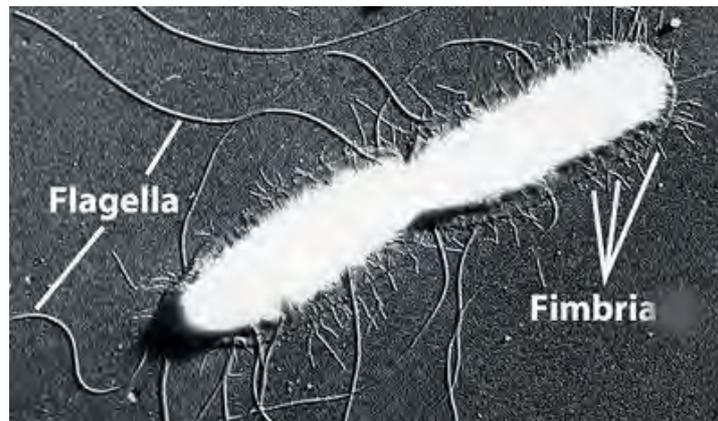


Figura 6.4. Aspecto de fimbrias y flagelos por microscopía electrónica <sup>11</sup>.

La zona combinante está constituida por un pequeño segmento de las subunidades proteicas de la fimbria (región aminoterminal). Las fimbrias se pueden diferenciar por una serie de caracteres como el tamaño, peso molecular, composición en aminoácidos y poder inmunógeno, y, además y en relación con la presencia de adhesinas, por la capacidad de fijación selectiva en los receptores de diversas células y de diversas especies de hematíes responsables del fenómeno de hemaglutinación, por la naturaleza química de estos receptores y sobre todo porque la adición de receptores o de sustancias análogas presenta la propiedad de inhibir específicamente el fenómeno de adherencia a de hemaglutinación. Las fimbrias de las enterobacterias se han clasificado en 6 tipos de los cuales cuatro (tipos 1, 3, 4, 5) se encuentran asociadas con adhesinas y las adhesinas de las fimbrias. Atendiendo a su sensibilidad al monosacárido manosa se han dividido en dos grandes grupos: sensibles y resistentes a la manosa.

Las adhesinas a fimbrias *manosa-sensibles* o fimbrias de tipo 1 son las más frecuentes y difundidas en las bacterias gramnegativas. Presentan la propiedad de combinarse con receptores que contienen d-manosa que se encuentran en muchas glicoproteínas que existen en gran número de células, incluidos los fagocitos y en los hematíes de diversas especies de animales (cobayo, caballo, aves) y del hombre produciendo el fenómeno de la hemaglutinación, reacción que es inhibida por la adición de d-manosa al medio. Estas fimbrias por su capacidad de unirse a diversas células y tejidos, se consideran poco relacionadas con el poder patógeno, pero intervienen en el proceso de colonización.

Las adhesinas a fimbrias manosa-resistentes, son menos frecuentes y difundidas y se caracterizan porque producen la aglutinación de los hematíes. Aun en presencia de d-manosa. Recientemente se ha demostrado que las fimbrias manosa-resistentes no forman un grupo homogéneo, sino que agrupan todas las fimbrias que se combinan con receptores específicos que no contienen manosa; es por tanto un grupo heterogéneo en el que se incluyen diversos tipos de fimbrias.

Las fimbrias de *E. coli* más importantes asociadas con el poder patógeno en el hombre y los animales se relacionan en la tabla siguiente.

Tabla 6.2. *E. coli*, caracteres de algunas fimbrias que median la adherencia <sup>11</sup>.

Adhesina		Origen de la cepa	Gene	Receptor (inhibición adherencia)	Aglutinación
Fimbria	Serotipo F				
<i>Manosa-sensibles</i>					
Tipo 1	F1	Ubicuo	Cromosoma	Glicoproteínas d-Manosa	Hematíes de cobayo, caballo, cordero, humanos y levaduras
<i>Manosa-resistentes</i>					
K88	F2	<i>Enteropatógenos</i> Diarrea de lechones	Plásmido	Glicolípidos Gangliósido GM1 (GalNac y GlcNac)	Hematíes Pollo y cobayo
K99	F3	Diarrea de bóvidos	Plásmido	Gangliósido GM2	Caballo y cordero
987P	F4	Diarrea en lechones	Plásmido	-	-
CFAI	F5	Diarrea humana	Plásmido	Gangliósido GM2 (Gal Nac β 1-4, Gal 1-4 glc cer)	Humanos, pollo, bovinos
CFAII	F6	Diarrea humana	Plásmido	-	Bovinos, pollo
E8775	-	Diarrea humana	Plásmido	-	Bovinos
P		<i>Uropatógenos</i> Infección urinaria (90 %)	Cromosoma	Globotetraosyl ceramido (Gal α 1-4 gal)	Humano
Otras fimbrias	F7-F10	Infección urinaria (10 %)	-	-	-

Hay que señalar las fimbrias K88 y 987P relacionadas con la diarrea de los lechones. Las fimbrias K99 asociadas con la diarrea de los bóvidos y las fimbrias a factores de colonización CFAI. CFAII y E8775 relacionadas con la diarrea humana. Estas adhesinas reconocen receptores celulares formados por glicolípidos, pero cuya composición y especificidad aún no han sido estudiadas en detalle. Mención especial merecen los *E. coli* productores de infecciones urinarias y en especial de pielonefritis que en el 90 % de casos presentan fimbrias P con la propiedad de aglutinar los hematíes humanos que contienen el antígeno P. Es un glicolípido que se ha identificado con un globósido, el globotetraosilceramide o globotriosilceramide que contiene un disacárido (Gal α 1-4 Gal) que constituye el receptor.

Por otra parte, se han estudiado las fimbrias sobre una base serológica y se han identificado doce serotipos de fimbrias (serotipos F) habiéndose observado que el serotipo (F1) está asociado con las fimbrias de tipo 1a MS. Los serotipos F2 a F6 y F10 están con las fimbrias MR de las cepas enteropatógenas para los animales y el hombre y parece que los serotipos F7 a F10 están asociadas con algunas cepas uropatógenas. Las bases genéticas de la adherencia han sido especialmente investigadas en *E. coli*. Se ha visto que la síntesis de fimbrias está codificada por genes localizados en el cromosoma o en plásmidos y que su expresión fenotípica está modulada por factores ambientales (temperatura, pH, nutrientes, fase de crecimiento, presencia de antibióticos, etc). Las fimbrias MS de tipo 1 y las fimbrias P de *E. coli* vienen codificadas por genes localizados en el cromosoma mientras que las adhesinas MR asociadas con la acción

patógena en el intestino del hombre y de los animales son codificadas generalmente por plásmidos. Además, de hallarse en *E. coli* se han demostrado fimbrias MS en la mayoría de enterobacterias (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter* y *Erwinia*) y fimbrias MR en *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *V. cholerae*, *B. pertussis*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis* (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Adhesinas en diversas especies bacterianas <sup>11</sup>.

Especie bacteriana	Adhesinas	Receptores
<i>Vibrio cholerae</i>	Fimbrias (¿flagelo?)	Glucosa y manosa
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Fimbrias de tipo 3	?
<i>Proteus mirabilis</i>	Fimbrias de tipo 4	?
<i>Shigella flexneri</i>	¿Lipopolisacárido?	Fucosa-glucosa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fimbrias de tipo 5	?
<i>Bordetella pertussis</i>	Fimbrias	¿Esteroles?
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fimbrias	Gangliósido GD1 (Gal B1-3 Gal Nac-B1-4 Gal)
	Proteínas ME	?
<i>Neisseria meningitidis</i>	¿Proteínas ME?	?
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Proteína P1 de membrana	Ácido siálico (glicoforina)
<i>Staphylococcus aureus</i>	LPT	?
<i>Streptococcus pyogenes</i>	LPT + proteína M	¿Seroalbúmina?
<i>Streptococcus mutans</i>	Proteínas fijadoras de glucano	¿Glucano?
<i>Streptococcus sanguis</i>	Fibrillas de LPT, proteína fijadora	¿Dextrano?
<i>Chlamydia</i>	?	N-acetilglucosamina

Algunas bacterias Gram negativas no tienen fimbrias, pero presentan la capacidad de adherirse a los tejidos humanos a animales. En estos casos se ha pensado que las adhesinas podrían encontrarse en otras estructuras de superficie, especialmente en las proteínas de la membrana externa en el lipopolisacárido e incluso en los flagelos. Así en *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* se han descrito adhesinas que estarían asociadas con proteínas de la membrana externa. *Mycoplasma pneumoniae* también presenta adhesinas situadas en la membrana que reconocen receptores que contienen ácido siálico. Asimismo, se ha sugerido que los lipopolisacáridos de las enterobacterias, cuyas cadenas de polisacáridos se extienden a distancia de la membrana externa, podrían intervenir en la adherencia (*Shigella flexneri*) e incluso que, en *Vibrio cholerae*, las adhesinas podrían estar asociadas con los flagelos.

En las bacterias gram positivas, la adherencia se encuentra asociada a otros mecanismos, especialmente con la presencia de ácido lipoteicoico, glicocálix u otras estructuras en la superficie de la bacteria.

**Ácido lipoteicoico:** La adherencia de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus del grupo A* se encuentra asociada con la secreción de ácido lipoteicoico que, teniendo su origen en zonas profundas cercanas a la membrana citoplásmica, aflorarían a la superficie de la bacteria, facilitando su fijación a las células de la mucosa nasal a faríngea, ya directamente (*Staphylococcus*) o formando complejos insolubles con la proteína M (*Streptococcus pyogenes*), que a manera de fibrillas los fijaría en los receptores de las células.

**Glicocálix:** Cierta número de bacterias gram positivas, cuando se desarrollan en medios apropiados, sintetizan polímeros extracelulares, en su mayoría polisacáridos insolubles, que por microscopía electrónica se observan como un entramado de fibrillas, que envuelve la bacteria formando una envoltura mucosa (glicocálix intrínseco) o se

libera en los líquidos orgánicos (glicocálix extrínseco), y que intervienen en los fenómenos de adherencia. Se observa en las bacterias recién aisladas y generalmente se pierde en los subcultivos, lo que se considera como un mecanismo de fijación y de supervivencia en los medios naturales.

En *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans*, la adherencia a los coágulos de fibrina y a la superficie del diente sería debida a la secreción por la bacteria de polisacáridos extracelulares (glicocálix) del tipo dextrano o glucano, lo que representaría un ejemplo de adherencia probablemente menos específico entre un polisacárido bacteriano y una superficie orgánica. También se ha observado que las moléculas de estos polímeros (glucano) o de otros productos presentes en el medio pueden adherirse y formar una fina película en la superficie del diente o de otros materiales, comportándose como receptores específicos de proteínas superficiales de la bacteria (glucosiltransferasa, proteínas fijadoras de glucanos), que en este caso constituirían las adhesinas. De la misma manera, la adherencia de las bacterias a materiales inertes implantados en el organismo, como prótesis, catéteres y material de sutura, sería debida a la secreción de polímeros que actuarían por un mecanismo semejante.

#### 6.2.8.2. Adhesinas múltiples

Aunque por lo general las bacterias presentan un solo tipo de adhesina, en ocasiones pueden presentar más de una al mismo tiempo. En los meningococos y gonococos se ha demostrado la existencia de adhesinas en las fimbrias y en las proteínas de la membrana externa, de manera que en una primera fase se produciría una adherencia laxa a distancia y a continuación intervendrían las proteínas de la ME, que determinarían una adherencia de membrana a membrana mucho más amplia y firme. También se ha observado que la mayoría de *E. coli* aislados de casos de pielonefritis manifiestan después del cultivo la presencia de dos tipos de fimbrias, fimbrias de tipo 1 (MS), que permiten la adherencia al moco urinario que recubre el epitelio y en particular a la glicoproteína de Horsfall y Tamm, y fimbrias P, que facilitan la adherencia a las células epiteliales del tracto urinario.

#### 6.2.8.3. Receptores de adherencia bacteriana

Son compuestos que existen en la superficie de las células animales, que se combinan específicamente con las adhesinas bacterianas. Las células de la mucosa están recubiertas por glicoproteínas y glicolípidos, de estructura fibrilar, que forman parte de la membrana y constituyen el glicocálix de la célula, que a su vez está recubierto por una capa de glicoproteínas ricas en mucina, secretadas por células especializadas del epitelio (células caliciformes) que forman el moco o gel mucoso.

Los receptores para las bacterias gram negativas se encuentran en los carbohidratos del glicocálix de la membrana y también del gel mucosa, y se identifican sus lugares combinantes con residuos de azúcares (enterobacterias) o polímeros más complejos (*E. coli*, *N. gonorrhoeae*), con una configuración complementaria de las adhesinas. Los residuos de azúcares constituyen el sitio activo del receptor, que a su vez forma parte de moléculas de glicoproteínas o de glicolípidos (gangliósidos, globósidos). La naturaleza química de los lugares combinantes del receptor se ha podido determinar estudiando la capacidad inhibidora de diversas sustancias sobre la adherencia, y se ha

observado que los monosacáridos u oligosacáridos que contienen d-manosa inhiben la adherencia de las enterobacterias que presentan fimbrias de tipo 1 (adhesinas MS), los que contienen I-fucosa inhiben la adherencia de *V. cholerae*, el disacárido (Gal al-4 gal) inhibe las fimbrias P de *E. coli*, los gangliósidos GM1 y GM2, las de *E. coli* K88 y K99, Y los gangliósidos con ácido siálico, las de *Mycoplasma*. Los receptores para las bacterias Gram positivas (*S. pyogenes*) son poco conocidos. Pueden encontrarse entre las proteínas o glicoproteínas de la membrana de la célula o sustancias existentes en el medio de origen celular (mucina, fibronectina, seroalbúmina) o bacteriano (glucanos) que se adsorben en la superficie de las células. Cada vez se concede mayor importancia a la fibronectina, glicoproteína muy ubicua, que se encuentra en forma soluble en el plasma y líquidos orgánicos, y en forma insoluble en la superficie de las células, que, si bien en ocasiones enmascararía la adhesinas de la célula, en otras, como ocurre en la cavidad bucal, presentaría la propiedad de combinarse con diversas bacterias gram positivas (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. salivarius*), en especial con el ácido lipoteicoico que constituye la adhesina de los estreptococos, lo que no ocurre con las bacterias gram negativas (*enterobacterias*, *pseudomonas*). La disminución del nivel de fibronectina en los enfermos hospitalizados podría explicar la colonización por gramnegativos que se observa en estos casos.

#### 6.2.8.4. Mecanismo de adherencia bacteriana

La adherencia es un fenómeno de interacción de superficies, en el que intervienen factores fisicoquímicos y biológicos (teoría coloidal de Derjaguin y Landau, Verwey y Overbeek). La adherencia requiere el contacto de la bacteria con la célula, pero, como ambas superficies son electronegativas, se crea una fuerza de repulsión, que solo es neutralizada en parte por débiles fuerzas de atracción (fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas), lo que da por resultado la formación de una barrera electrostática que dificulta la aproximación. La presencia en la superficie de la bacteria de moléculas hidrofóbicas y en especial de adhesinas, que por su pequeño tamaño no están sujetas a las fuerzas de repulsión, permite neutralizar esta barrera y facilitar el contacto. Por otra parte, se ha observado que las moléculas de adhesinas pueden presentar configuraciones complementarias de los receptores celulares, lo que les permite aproximarse a distancias cortas, combinarse en forma esteroespecífica y formar numerosos enlaces independientes que aumentarían la fortaleza de la unión. Su naturaleza no se conoce con certeza, pero se considera que, en la mayoría de los casos, la adherencia es un fenómeno específico, del tipo antígeno-anticuerpo o azúcar-lectina, pues se puede inhibir por la adición de moléculas libres de cualquiera de los dos componentes (adhesinas o receptores purificados) o de sustancias análogas.

Una vez producida la adherencia, la bacteria puede a su vez adherirse a otras bacterias de la misma o diferente especie por un mecanismo semejante (adherencia entre células procariontas o fenómeno de coagregación), dando lugar a la formación de microcolonias o de acúmulos de bacterias en la superficie, lo que fortalece y estabiliza la colonización. Como la adherencia en la mayoría de los casos es un proceso específico, la distribución de los receptores en el hombre y los animales explicaría los tropismos y localización de las bacterias en la colonización y en la infección. Se podría distinguir una especificidad de especie cuando los receptores se encuentran en las células de una misma especie animal, de manera que solo se producirían infecciones en

esta especie. Es el caso de *E. coli* K88, que solo produce diarreas en los lechones y de *E. coli* CFA I y II que produce diarreas en el hombre.

Dentro de una misma especie, su distribución en el organismo podría ser variable, de manera que, cuando los receptores se encontraran en las células de un determinado tejido, existiría una especificidad o tropismo tisular, como en *E. coli* con fimbrias P, cuyos receptores solo se encuentran en las células del tracto urogenital, en los meningococos que se fijan en las células secretoras de moco del tracto respiratorio superior, en *S. salivarius* que se fijan en la mucosa de la boca, en *S. sanguis* y *S. mutans* en el diente, etc., o una localización menos específica, cuando los receptores se localizaran en células de diversos tejidos e incluso en las glicoproteínas del moco, como ocurre con las fimbrias del tipo 1 o MS de la mayoría de enterobacterias. Además de su distribución, es importante la densidad de receptores en las células del organismo o en un tejido determinado, que podría estar relacionada con una mayor susceptibilidad a la infección. En los *E. coli* uropatógenos, los receptores se encuentran en los hematíes humanos y en las células del epitelio urinario de las personas que expresan el antígeno P en sus hematíes o células uroepiteliares en cualquiera de sus fenotipos (PI, P2, PK), a excepción de los raros casos del fenotipo P que carecen de dicho receptor. Estudiando el fenotipo P se ha observado que las células del fenotipo PI contienen una mayor densidad de receptores, lo que estaría relacionado con una mayor predisposición genética a la infección urinaria. Por otra parte, la adherencia de las bacterias a los materiales inertes podría considerarse como un fenómeno menos específico o inespecífico, como ocurre en la adherencia a los dientes y a diversos materiales implantados en el organismo. Se ha estudiado la adherencia de los estreptococos a los dientes, especialmente de *S. mutans*, que, en presencia de una dieta con sacarosa, interviene en la formación de la placa dental y probablemente de las caries. Esta bacteria sintetiza enzimas extracelulares que desdoblan la sacarosa (invertasa) y a partir de la glucosa y por medio de la glucosiltransferasa forman polímeros insolubles, glucanos y fructanos, que intervienen en la adherencia y formación de la placa dental. Se ha observado que en la superficie del diente se forma rápidamente una fina película de productos de origen salival (mucina, lisozima, fibronectina, Ig) o bacteriano y que en presencia de una dieta rica en sacarosa se produciría un predominio en la fijación de glucanos, que en este caso actuarían como receptores de las proteínas de superficie de *S. mutans* (proteínas fijadoras de glucanos, glucosiltransferasa), fijando la bacteria al diente.

Asimismo, los glucanos de la bacteria pueden actuar como adhesinas fijando otras bacterias de la misma o diferente especie (*S. sanguis*, *S. mitis*, *Actinomyces viscosus*, *Veillonella*, etc.), que contribuyen a la formación de la placa dental.

Por otra parte, la adherencia de las bacterias a los materiales inertes implantados en el organismo (prótesis, catéteres, anastomosis, etc.) se considera debida a un mecanismo semejante. Las bacterias productoras de polímeros extracelulares (glicocálix, capa mucosa) formarían una fina película de moco en la superficie de estos materiales, dependiendo de su estructura y composición, que a su vez podrían comportarse como receptores específicos de compuestos superficiales de estas bacterias o, por sus propiedades de hidrofobia, producir la adherencia por mecanismo inespecíficos. La observación de que, cuando se extraen estos materiales del organismo, muchas veces se encuentran recubiertos por una masa bacteriana mucosa fuertemente adherida apoya esta teoría.

#### 6.2.8.5. Adherencia y colonización

La colonización de las mucosas es un proceso complejo, en el que además del fenómeno de adherencia, intervienen otros factores que condicionan la llegada y contacto de las bacterias con la superficie epitelial. La adherencia de la flora normal es debida probablemente a mecanismos diversos y, en gran parte, desconocidos. La mayoría de estudios se han efectuado por microscopía electrónica de barrido en el tubo digestivo de animales, y se ha observado que, en las zonas más activas de la mucosa, en continuo movimiento y recambio (movimientos peristálticos, de las microvellosidades), es necesaria la existencia de mecanismos que aseguren una adherencia firme con el glicocáliz a la membrana de las células, incluso mediante la formación de estructuras especializadas, mientras que en las zonas poco activas pueden formarse adherencias menos firmes y ser suficiente en ocasiones la fijación en los receptores del gel mucosa.

La adherencia representa una ventaja ecológica para las bacterias de la flora normal, pues:

- Impide su eliminación por los factores mecánicos de la piel y mucosas, asegurando su supervivencia.
- Las sitúa en un nicho ecológico en condiciones fisicoquímicas y nutritivas adecuadas, cerca de la fuente de nutrientes, que por lo general tienden a concentrarse en las superficies y en la interfase sólido/líquido.
- Facilita su desarrollo y multiplicación, dando lugar a la formación de microcolonias, que potencian sus funciones biológicas, como comensales y mutualistas, y contribuyen a la colonización y establecimiento de una flora normal, equilibrada y estable.

#### 6.2.8.6 Adherencia e infección

La infección es un proceso secuencial cuya primera etapa sería la fijación y colonización de las bacterias patógenas en las células epiteliales de la puerta de entrada. Supone la presencia de factores que facilitan la penetración a través del gel mucosa, los cuales ya se han considerado, y de adhesinas que les permitan competir con la flora normal por los receptores de la membrana de las células epiteliales.

La adherencia de las bacterias patógenas al epitelio evita su eliminación por los factores mecánicos y facilita su desarrollo y multiplicación, lo que representa no solo una protección frente a los agentes externos (otras bacterias, fagocitos, antibióticos, sustancias inhibitorias), sino que, además, les permite alcanzar el número crítica de bacterias a la concentración adecuada de productos (fermentos, antígenos, toxinas) para poder iniciar la infección (infección aguda a subaguda). Por otra parte, en la adherencia a los *materiales inertes* implantados en el organismo, el papel de estos materiales es el de ofrecer una superficie bien protegida, dependiendo de su estructura y composición, donde las bacterias puedan fijarse, multiplicarse y sintetizar grandes cantidades de polímeros extracelulares (glicocáliz), dando lugar a la formación de microcolonias constituidas por una a diversas especies bacterianas fuertemente adheridas por el glicocáliz a estos materiales. Esta capa mucosa se puede demostrar en las infecciones de los catéteres y prótesis, y si bien las bacterias se encuentran protegidas de los mecanismos naturales de defensa y de los antibióticos, también queda limitada su capacidad de difusión a la de sus productos (toxinas) a los tejidos vecinos, dando lugar a

la producción de infecciones crónicas, persistentes y poco invasivas, en las que un tratamiento antibiótico de acuerdo con la susceptibilidad de la bacteria *in vitro* modifica poco la infección, que por lo general solo puede resolverse por la extracción del material infectado. El estudio de la relación entre adherencia e infectividad ha demostrado que en la mayoría de los casos existe un alto grado de correlación tanto en las infecciones invasivas como por toxinas (Tabla 6.2). En general se ha observado que cepas de *N. gonorrhoeae*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis* y *E. coli enterotoxigeno*, con una buena capacidad de adherencia *in vitro*, presentan un alto grado de infectividad *in vivo*. Se ha demostrado en voluntarios que la administración de una variante de *E. coli enterotoxigeno*, que había perdido la capacidad de adherencia, pero conservaba la de producir enterotoxina, fue incapaz de producir diarrea, a diferencia de la cepa original, lo que señala la importancia de la liberación de toxina a nivel de la célula diana (enterocito) para la producción del cuadro.

Por otra parte, se ha sugerido que los fenómenos de adherencia también intervienen en las *infecciones bacterianas secundarias*, sobre todo en relación con la presencia de receptores accesibles en las células de la mucosa.

Se ha señalado que las alteraciones patológicas de las células epiteliales producidas como consecuencia de la infección primaria podrían aumentar su capacidad de adherencia para otras bacterias por pérdida de ciertas sustancias de la superficie de la célula (fibronectina), que impedirían la accesibilidad de los receptores a las bacterias, o mediante la formación de nuevos receptores, como se supone que ocurre en las células infectadas por virus. En este sentido se ha observado que, en el curso de las virosis respiratorias, las células epiteliales infectadas presentan una mayor capacidad de adherencia para determinadas especies bacterianas (*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae*) y que, en los enfermos graves, las células de la mucosa orofaríngea tienen aumentada su adherencia para los bacilos gramnegativos; se ha comprobado que la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra asociada con una disminución de la fibronectina celular, que actuaría como un factor modulador no inmune de la adherencia bacteriana. Estos hechos permitirían explicar la patogenia de las infecciones bacterianas secundarias en las virosis y la colonización de las vías respiratorias superiores por bacilos gramnegativos en los enfermos hospitalizados, etapa previa para el desarrollo de procesos neumónicos. Los datos anteriores indican que la capacidad de adherencia es uno de los factores determinantes de la acción patógena; sin embargo, no constituye un factor indispensable para la infección, pues, si se anulan o reducen los mecanismos de defensa de la mucosa (factores mecánicos, fagocitos, flora normal) por cualquier causa, bacterias sin capacidad de adherencia pueden multiplicarse e incluso producir una acción patógena. En consecuencia, la capacidad de adherencia representa una ventaja ecológica para la colonización e infección, pero no constituye un requisito imprescindible.

Por último, las bacterias también pueden adherirse a los fagocitos, lo que constituye el primer paso para su incorporación y destrucción. El carácter hidrofóbico de las superficies es el factor determinante del contacto, pero, además por reacciones de inhibición con diversas sustancias, se ha observado que también intervienen fenómenos específicos (adhesinas), de manera que la misma adhesina podría facilitar la infección y más tarde la fagocitosis o estos dos fenómenos dependerían de mecanismos distintos.

Tabla 6.4. Colonización específica e infección <sup>11</sup>.

Bacteria	Adhesinas	Fijación en	Infección
<i>E. coli</i>	Fimbrias de tipo I	Epitelio urinario (ratón)	Cistitis
<i>E. coli</i>	Fimbrias P	Epitelio urinario (hombre, ratón)	Pielonefritis
<i>E. coli</i> enterotoxigena	Fimbrias P + de tipo 1		
<i>N. gonorrhoeae</i>	CFAI y CFAII	Epitelio del intestino delgado (hombre)	Diarrea
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fimbrias y proteínas ME	Epitelio uretral y cervical	Uretritis, cervicitis
	Fimbrias	Endocardio	Endocarditis (adictos a heroína)
<i>Streptococcus sanguis</i>	Proteínas fijadoras	Endocardio	Endocarditis (ratón)
<i>Streptococcus mutans</i>	Proteínas fijadoras de glucano (glucosil-transferasa)	Esmalte dental	Caries
<i>Streptococcus pyogenes</i>	LPT + proteína M	Faringe	Faringitis
<i>Staphylococcus coagulasa-</i> <i>negativo</i>	?	Catéter	Sepsis

Se ha señalado en algunas bacterias la existencia de adhesinas que presentan la propiedad de fijarse no solo en las células epiteliales, sino, además, en la membrana de las células fagocitarias, lo que facilitaría la fagocitosis, como ocurre con las fimbrias de tipo 1 de *E. coli*, las fimbrias de *P. mirabilis* y el ácido lipoteicoico de *S. pyogenes*, y que la presencia de más de un tipo de adhesinas (adhesinas múltiples), si bien sería ventajosa para la colonización en que se precisa la máxima capacidad de adherencia, podría ser perjudicial para la bacteria en etapas más avanzadas si favorece la fagocitosis. Ahora bien, las bacterias pueden evitar la fagocitosis por dos mecanismos:

- a) la síntesis de cápsulas o capas mucosas que enmascaren las adhesinas y eviten su fijación en los receptores del fagocito, o
- b) la represión de la expresión de las adhesinas, fundamentalmente por la aparición de variantes no fimbriadas.

Se ha observado que las bacterias pueden sufrir variaciones in vitro: variaciones genotípicas irreversibles por mutación o pérdida del plásmido que codifica las adhesinas, pero sobre todo variaciones fenotípicas reversibles, por la acción de factores externos. Así, es conocido que las cepas capsuladas, cuando se conservan en el laboratorio, pierden la capacidad de sintetizar la capsula que recuperan cuando se inoculan a un animal de experimentación. De la misma manera, las cepas con fimbrias de tipo 1 de *P. mirabilis* y *E. coli* pueden sufrir variaciones fenotípicas en el curso de su ciclo de crecimiento, de manera que en la fase logarítmica se produce predominio de bacterias no fimbriadas y en la fase estacionaria, predominio de bacterias fimbriadas. Estas variaciones también se han demostrado in vivo. Así se ha observado que los meningococos virulentos aislados de la sangre en los casos de sepsis forman colonias transparentes, presentan disminuida su capacidad de adherencia y son más serorresistentes, lo que es debido a la presencia de una cápsula que enmascara las adhesinas de la ME y evitaría la fagocitosis, mientras que los aislados de portadores nasofaríngeos presentan una mayor capacidad de adherencia y se desarrollan formando colonias opacas. En la pielonefritis experimental de la rata por *P. mirabilis* se han aislado del epitelio de la pelvis renal cepas fimbriadas, mientras que, del parénquima renal, solo cepas que no presentan fimbrias.

Estos hechos sugieren que, en la fase inicial de la infección urinaria, las cepas fimbriadas son las más importantes, pues son las que permiten la infección ascendente y la colonización de la pelvis renal, mientras que las no fimbriadas, al ser más resistentes a la fagocitosis, pueden multiplicarse e invadir el parénquima renal, siendo las más patógenas.

Estas variaciones permiten a la bacteria adaptarse a las diferentes condiciones ambientales. En la pielonefritis por *E. coli* uropatógenos se puede demostrar que la mayoría de las cepas eliminadas por la orina no tienen fimbrias y las adquieren después de 24 horas de cultivo en caldo, lo que indica que en el curso de su crecimiento en el parénquima renal se encontraba reprimida la capacidad de producir fimbrias. Estas cepas presentan en su mayoría adhesinas o fimbrias M5 y P. Las adhesinas M5 (fimbrias de tipo 1) parece que favorecen la persistencia de los *E. coli* en el reservorio intestinal y por su adherencia al moco urinario facilitan la colonización de la vagina, uretra y vejiga en las fases iniciales de la infección, pero en periodos más avanzados la síntesis de estas adhesinas se reprime, lo que evita la fagocitosis, pero las fimbrias P que se fijan al uroepitelio facilitan la multiplicación, la infección ascendente y más tarde la invasión. Estos hechos son los que explican que, en el curso del proceso infeccioso, la presión en las condiciones ambientales son las que hacen que la bacteria exprese la síntesis de la capsula o de una, dos o ninguna adhesina, lo que determina el éxito o fracaso del patógeno para colonizar la mucosa o evitar la fagocitosis.

### *6.2.9 Propiedades inespecíficas de adherencia bacteriana.*

#### *6.2.9.1 Hidrofobicidad de superficie.*

Como se ha comentado, el primer paso en la invasión del epitelio por bacterias uropatógenas está determinado por la capacidad para adherirse a las células del huésped. Inicialmente esta capacidad está determinada por la carga eléctrica del micro-organismo y la hidrofobicidad de superficie, y subsecuentemente por otros factores como como la formación de diversos tipos de fimbrias y adhesinas más específicas. La suma de todos estos factores propiciará la adherencia al uroepitelio con posterior invasión. Se ha demostrado que la virulencia de *E. coli* uropatógeno no sólo depende de adhesinas específicas para su adherencia <sup>17</sup>, sino que depende también de estas propiedades inespecíficas. Sin embargo, no mucho se conoce en la actualidad sobre este efecto ni el papel de estas propiedades no-específicas sobre la formación de biofilm, que es fundamental en también en las fases iniciales de la infección.

Un estudio <sup>18</sup>, analizó in vitro mecanismos específicos y no específicos de adherencia bacteriana a una sonda de silicona. Tras un breve periodo de tiempo (<3h), el zumo de arandano americano, conocido por sus propiedades antiadherentes, modificó las fuerzas de adhesión entre la punta de la sonda y la bacteria, así como la conformación de uno de los polímeros de *E. coli* asociados con fimbrias tipo P. No se necesitaron condiciones de acidificación específicas para conseguir dicho efecto. Este mismo grupo ha continuado estudiando a escala nanométrica las fuerzas de adherencia entre bacterias y ligandos de la pared uroepitelial <sup>19</sup>.

### 6.2.9.2 Hemaglutinación Eritrocitaria

Al final de la década de los 70, se reconoció por primera vez diferentes cepas de *E.coli* uropatógenas eran capaz de aglutinar células eritrocitarias humanas a pesar de la presencia de manosa. Esta propiedad se relacionó con las fimbrias específicas de *E.coli*<sup>20</sup> y se considera un factor de virulencia. Las cepas de *E.coli* capaces de producir hemaglutinación resistentes a la manosa se consideran uropatógenas y por tanto este efecto de hemaglutinación estaría mediado por fimbrias tipo P<sup>21</sup>.

Hoy en día dicha propiedad se emplea para medir la actividad antiadherente in vitro mediante un bioensayo de hemoaglutinación de glóbulos rojos. También se puede dirigir un ensayo de aglutinación in vitro más específico utilizando receptores de adherencia aislados adheridos a partículas de resina.

### 6.3 Prevención de la adherencia. Papel del jarabe de arándano americano.

Teniendo en cuenta la importancia de la adherencia en la colonización e infección, se ha intentado llegar a la profilaxis de las enfermedades infecciosas en su fase inicial, interfiriendo en el proceso de adherencia, mediante tres tipos de medidas.

- *Inhibidores de la adherencia.* Se ha observado in vitro que la administración de análogos de bajo peso molecular de las sustancias que intervienen en la adherencia, en especial del carbohidrato receptor, puede interferir en el fenómeno por inhibición competitiva. Así se ha podido inhibir la adherencia de *E. coli* con fimbrias de tipo 1 manosasensibles, por la administración de análogos de la manosa (metil-d manopiranosido), y de *E. coli* uropatógenos con fimbrias P con análogos de los globósidos (globotetraosil). También se ha podido inhibir la adherencia de *S. mutans* al diente y la formación de la placa dental administrando inhibidores de la glucosiltransferasa, que evitan la polimerización de la glucosa y la formación de glucanos. La dificultad de su empleo in vivo deriva de la necesidad de que alcancen en el organismo concentraciones susceptibles de competir con éxito con los factores de adherencia. Sin embargo, en el caso de *E. coli* uropatógenos, cuyo reservorio es el intestino, se ha sugerido la posibilidad de que puedan eliminarse selectivamente del tubo digestivo por la administración por vía oral de partículas de agarosa recubiertas de globósidos, que produciría la fijación de *E. coli* con fimbrias P y su eliminación por las heces antes de que tuvieran la oportunidad de infectar el tracto urinario<sup>22</sup>.
- *Antimicrobianos.* Por otra parte, se conoce que algunos antimicrobianos pueden afectar la capacidad de adherencia in vitro. Ocurre con los inhibidores de la síntesis proteica (tetraciclinas, aminoglicósidos, cotrimoxazol) o los que modifican la estructura de la pared celular (lactaminas), que actuarían produciendo una disminución de la síntesis o expresión de adhesinas o induciendo su liberación. En estos casos se ha observado que basta la administración de dosis subinhibitorias del antimicrobiano para que se produzca la inhibición de la adherencia sin que se afecte la viabilidad de las bacterias. Parece que las tetraciclinas inhiben la adherencia por fimbrias de tipo 1 de *E. coli* y el cotrimoxazol, la adherencia de *E. coli* uropatógenos. En modelos experimentales se ha visto que dosis subinhibitorias de vancomicina confieren una protección significativa frente a la endocarditis por *S. sanguis*. Se han

efectuado pocos ensayos clínicos, pero algunos autores han obtenido buenos resultados con dosis bajas de cotrimoxazol o ampicilina en las infecciones urinarias recurrentes. Estos estudios se encuentran en su fase inicial y deben ser confirmados, ya que existen observaciones contradictorias<sup>23</sup>

- *Vacunas.* Se ha estudiado la preparación de vacunas con suspensiones purificadas de adhesinas, en especial de fimbrias que induzcan la aparición de anticuerpos que inhiban específicamente la adherencia. En los animales de abasto, se ha visto que la inmunización de las madres con una vacuna de fimbrias purificadas de *E. coli* K88 y 987 puede proteger a los lechones y terneros de la gastroenteritis por *E. coli*. Este tipo de vacunación indirecta de las madres para proteger a los recién nacidos se aplica en veterinaria con buenos resultados.

Sin embargo, la vacunación indirecta de los adultos presenta dificultades, ya que la vacuna para ser eficaz debe inducir la aparición de anticuerpos locales (IgA) a nivel de la mucosa, que persistan durante largo tiempo, e incluir la mayoría de serotipos y las posibles variantes que se puedan presentar en las fimbrias. En este sentido se ensayan vacunas polivalentes que contengan los factores de colonización de *E. coli* (CFAI, CFAll y E8775) para la profilaxis de las gastroenteritis por *E. coli* enterotoxígenas y vacunas polivalentes de fimbrias P para la inmunización frente a las infecciones urinarias.

### 6.3.1. Interferencia con la flora saprofita

Los fenómenos de competición y antagonismo con los componentes de la flora saprofita habitual son fundamentales para el establecimiento de los patógenos. La flora residente está plenamente adaptada a su hábitat o biotopo, presenta mecanismos de fijación al epitelio, obtiene del medio ambiente las sustancias nutritivas adecuadas para su desarrollo y multiplicación, y como consecuencia de su potencial metabólico crea condiciones ambientales (pH, rH, sustancias bactericidas) desfavorables. Los microorganismos patógenos se caracterizan porque, a pesar de su reducido número, son capaces de bloquear estos mecanismos inhibidores de la flora normal, lo que puede facilitarse cuando se producen alteraciones de la flora por mecanismos diversos.

### 6.3.2. Factores dependientes del huésped en adherencia

Destaca como factor la mayor densidad de receptores glucolípidicos en las células epiteliales del tracto urinario (uroepitelio) en algunos individuos y que permiten la unión específica de los gérmenes con fimbrias tipo 2 con las células epiteliales del huésped, incrementándose la adhesión bacteriana. A mayor densidad de receptores uroepiteliales, más posibilidades de adhesión bacteriana y mayor riesgo de infección urinaria.

### 6.3.3. Jarabe de Arándano y Formación de Biofilm

Hay poca información, sin embargo, en lo respectivo a la interacción del extracto de arándano con la formación de biofilm por *E. coli*. Los resultados disponibles hasta la fecha parecen alentadores y estudios *ex vivo* parecen mostrar que el zumo de arándano puede prevenir la formación de biofilm<sup>24</sup>. Esto implicaría la presencia de metabolitos activos en la orina tras el consumo del producto.

El grupo de LaPlante usaron 3 diferentes preparaciones de arándano americano para analizar la prevención de formación de biofilm por *E. coli* y *Staphylococcus Spp*. Curiosamente la preparación que mejores resultados frente a *E. coli* obtuvo, fue la más baja en PAC por los que los autores concluyeron que otros metabolitos activos deben estar implicados en esta acción del arándano americano <sup>25</sup>. Curiosamente los resultados frente a *Staphylococcus Spp* no fueron tan significativos como se esperaba. Este mismo grupo, intentando aclarar estas cuestiones, intentaron analizar el efecto de extractos purificados de hidratos de carbono sin contenido fenólico obtenidos del arándano americano, sobre la formación de biofilm con resultado positivo por lo que concluyeron que otros componentes de este fruto, como los oligosacáridos, podrían tener un papel importante en la función anti-biofilm y antibacteriana de *E. coli* <sup>26</sup>.

Jagani y cols. <sup>27</sup>, estudiaron la inhibición de la formación de biofilm provocado por *Pseudomona auroginosa* por parte de fenol y otros componentes fenólicos naturales de mostrando que excepto el tocoferol y el etil-linolato, todos los componentes estudiados reducían significativamente la producción de biofilm.

Varios componentes de los extractos de plantas como la quercetina y el ácido tánico, han demostrado inhibir la formación de biofilm por *S. aureus* <sup>28</sup>.

#### 6.4 Polifenoles, metabolismo e importancia en antiadherencia <sup>29</sup>

Hoy en día los compuestos polifenólicos disfrutan de una creciente popularidad no solo entre la comunidad científica sino también, de forma muy llamativa, entre el público general. Los derivados fenólicos se encuentran en abundancia en frutas, legumbres, verdura, así como productos secundarios de los mismos como el vino, el aceite... cuyo consumo habitual se considera beneficioso para la salud.

Muy llamativa es, como decimos, el aumento exponencial en la cantidad de publicaciones referentes a este tema en las últimas 2 décadas.

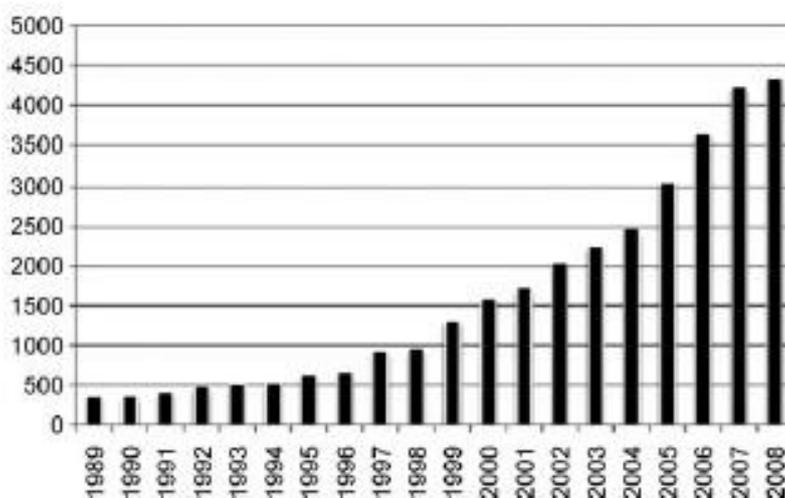


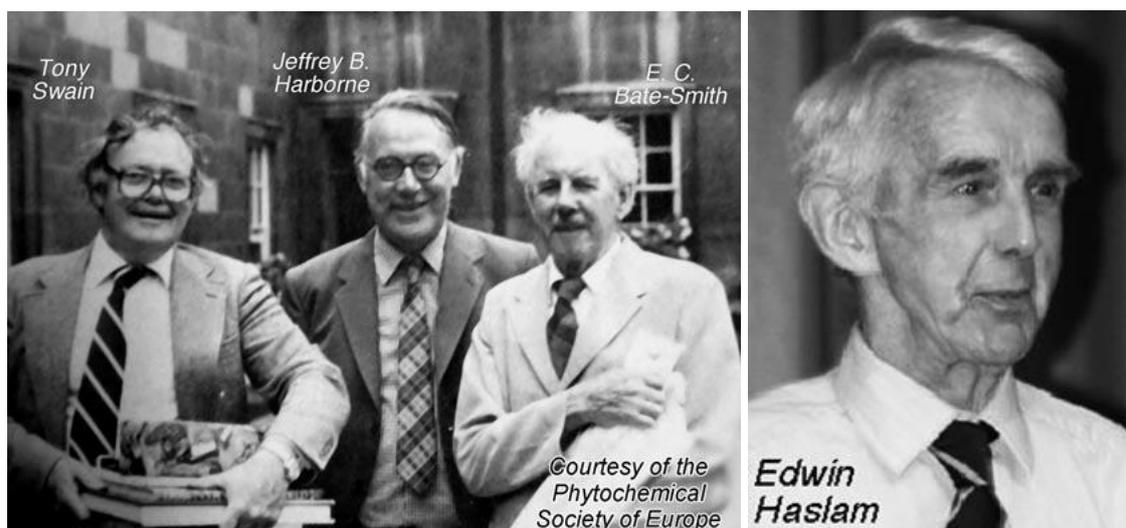
Figura 6.5. Evolución del número de publicaciones de 1989-2008 relacionadas con "Polyphenols" <sup>29</sup>.

Es su capacidad antioxidante, evitando la liberación de radicales libres, la que se postula responsable de sus efectos beneficiosos reduciendo el riesgo de ciertos procesos degenerativos o relacionados con la edad. Sin embargo, esta cualidad no es constante necesaria en todos los compuestos vegetales que consideramos polifenoles. Este término, que abarca a más de miles de compuestos descritos a lo largo de varias décadas, es en sí una muy heterogénea muestra de sustancias y rutas metabólicas sobre las que surgen más interrogantes cada día. Su baja biodisponibilidad, la dificultad para cuantificarlos y entender su acción *in vivo* constituyen el reto para la ciencia que pretende sacar el máximo beneficio de ellos.

Pero intentemos conocerlos mejor y en mayor profundidad. Veamos lo que se publica de ellos y como podíamos aplicarlos a nuestro campo, la pediatría. Es un hecho conocido que en la infancia se sientan las bases de nuestra dieta e incluso de nuestro metabolismo, por lo que cabría pensar que cualquier intervención que tenga esta población como diana tendría repercusión a muy largo plazo.

Se han propuesto varios métodos de definición y clasificación para este numerosísimo y complejo grupo de compuestos químicos vegetales. De hecho, es frecuente el mal uso de los términos fenoles vegetales, polifenoles y taninos tanto en el campo de la ciencia como en la industria. El término tanino proviene de la cualidad de algunos de estos compuestos de teñir las pieles en la fabricación de prendas textiles.

El profesor Haslam amplió la definición dada por Bate-Smith, Swain y White definiendo los polifenoles como un descriptor usado para componentes fenólicos vegetales hidrosolubles con una masa molecular de entre 500 y 3000-4000 Da y que posean de 12-16 grupos hidroxifenólicos en 5-7 anillos aromáticos por cada 1000Da de masa molecular relativa. Más allá, estos componentes de ser sujetos a las reacciones fenólicas habituales y tener la habilidad de precipitar algunos alcaloides, gelatinas y proteínas. A esta definición ya universalmente aceptada se la conoce por tanto como (WBSSH). Llama la atención, sin embargo, que la llamada propiedad antioxidante no es uno de los factores necesarios para denominar a un “verdadero polifenol” de acuerdo con la definición de la WBSSH<sup>30, 31</sup>.



*Figura 6.6 Pictures of Dr Swain, Harborne, Bate-Smith. Courtesy of Phytochemical Society of Europe. Derecha- Professor Haslam.*

6.4.1. Clasificación de los polifenoles <sup>29</sup>

Según la clasificación del Profesor Edwin Haslam, los polifenoles “verdaderos” se podrían dividir en 3 grupos. Estos grupos que describimos a continuación son ya sustancias combinadas y derivadas de otras más simples. Las rutas metabólicas de las que provienen también son detalladas posteriormente.

**Proantocianidinas:** Las proantocianidinas o PACs (Taninos condensados) como las procianidinas o las prodelfinidinas que derivan de la oligomerización de unidades flavon-3-ol como la epigallocatequina, epigallocatequina o fisitínidol. También considerados dentro del grupo de los flavonoides por dicho origen, las PACs sirven como defensa natural de las plantas. Los PAC se encuentran en muchas frutas y vegetales como manzanas, ciruelas, uvas, arándanos, café, cacao, té, etc... Todos estos frutos son ricos en PAC tipo B que no poseen capacidad antiadherente. Sólo el arándano rojo contiene PAC tipo A que posee una importante actividad de anti-adherencia contra ciertas bacterias, en especial contra *E. coli* uropatógeno frente al que estas proantocianidinas actúan inhibiendo la adherencia de sus fimbrias P. Esta propiedad se ha comprobado en hasta 10 estudios como reflejaba la revisión sistemática de la biblioteca Cochrane en 2012 <sup>10</sup>.

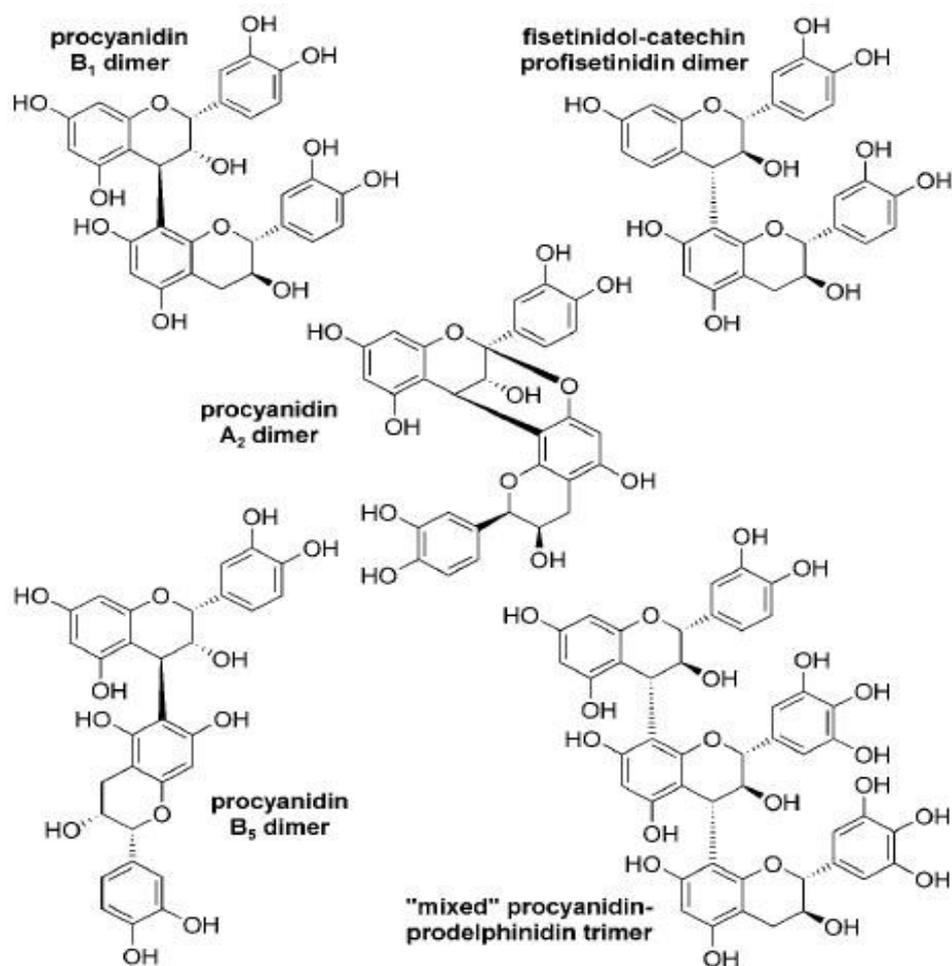


Figura 6.7. Ejemplos de taninos condensados <sup>29</sup>.

*Taninos hidrolizables:* Los galo y ellagitaninas (taninas hidrolizables) derivados del ácido gálico que a través de la esterificación y oxidación fenólica dan lugar a cerca de 1000 monómeros y oligómeros.

*Florotaninos:* Los florotaninos hallados en las algas rojas-marrones y esencialmente derivadas de la oligomerización del Floroglucinol.

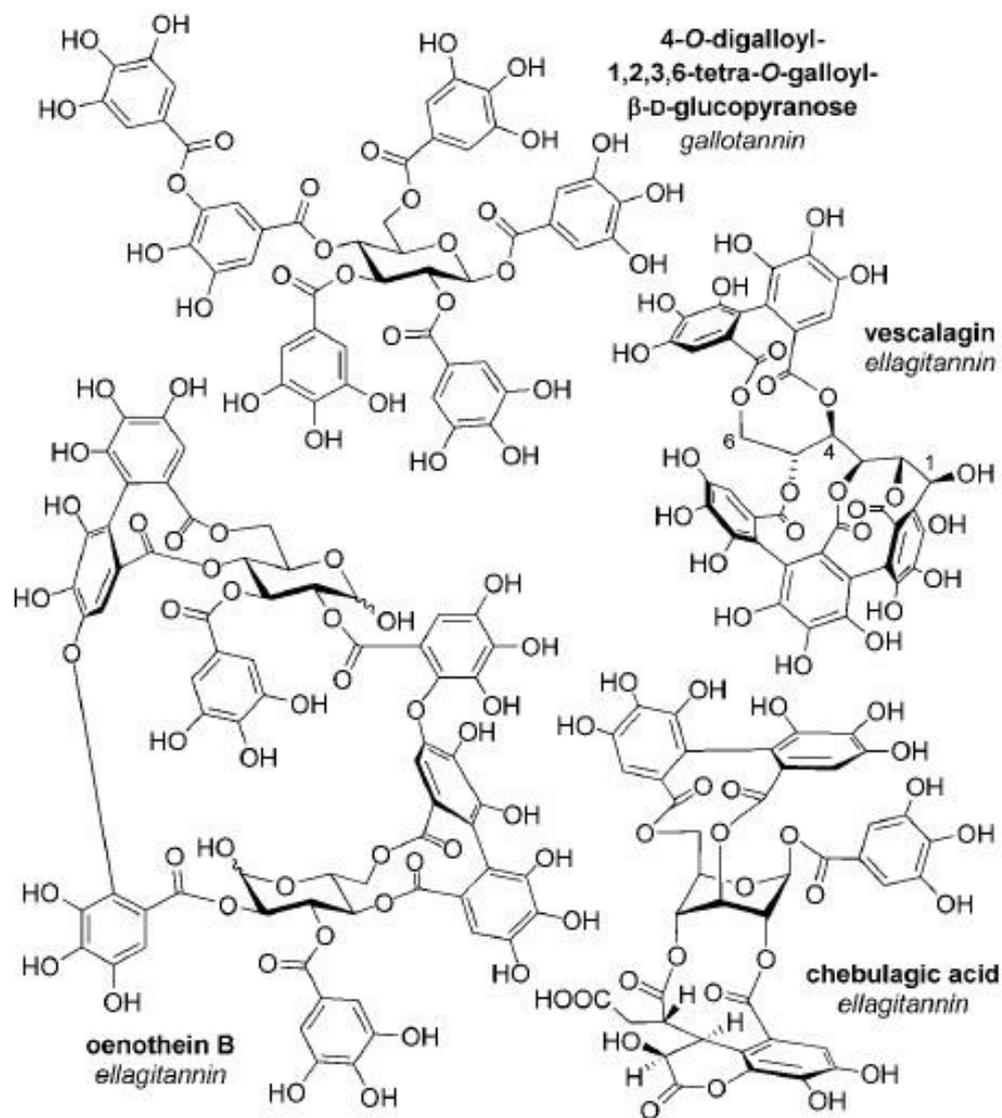


Figura 6.8. Ejemplos de taninos hidrolizables <sup>29</sup>.

#### 6.4.2. Rutas Metabólicas de los diferentes componentes polifenólicos.

*Derivados flava/flavonoides:* La ruta metabólica más productiva en términos de número de sustancias polifenólicas que se producen, es la que da lugar a los flava/flavonoides. A pesar de su origen común, los flavonoides agrupan varias subclases de entidades estructuralmente diversas. Hasta la fecha, más de 8000 estructuras han sido

clasificadas dentro de este grupo. La mayoría de ellos son pequeñas moléculas que contienen 2 unidades mono-trihidroxifenil. Estas sustancias dan lugar a través de reacciones a otras más complejas que incluyen flavonas como flavones, flavonones, flavonoles (entre los que se encuentra la quercetina), isoflavonoles, antocianinas, chalcoes, auronos y FLAVANOLES como la epicatequina, epigallocatequina y fisetinidol. Estos últimos componentes son precursores de las ya mencionadas proantocianidinas.

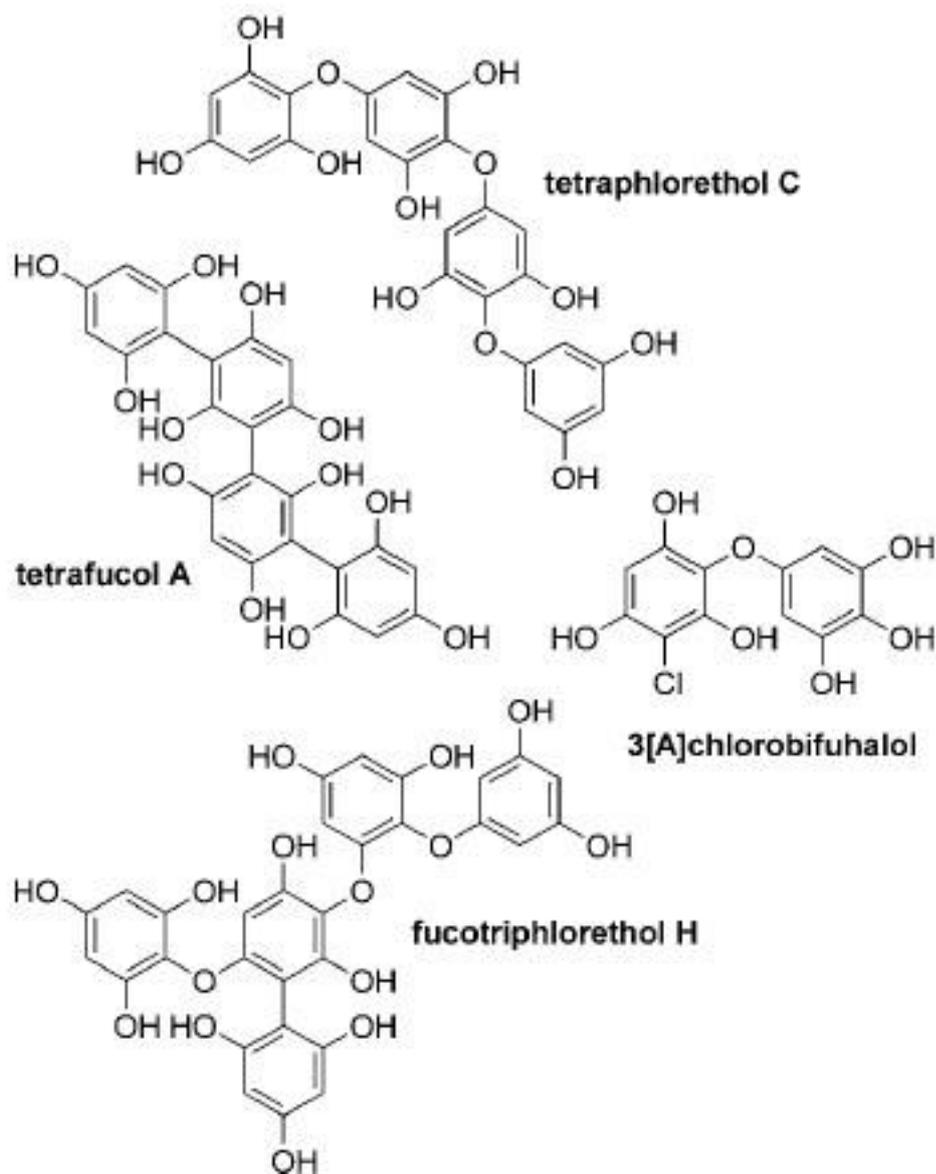


Figura 6.9. Ejemplos de Florotaninos <sup>29</sup>

*Ruta de los estilbenos:* La ruta metabólica de los híbridos fenilpropanoid/poliketidas da lugar a otra clase de sustancias polifenólicas muy importantes, los polihidroxiestilbenos (C6-C2-C6). El ejemplo más famoso por su

enorme interés científico es el fitoalexin-trans-resveratrol. En los últimos años esta sustancia se ha estudiado como agente quimiopreventivo y en relación a su presencia en vino tinto.

Los polihidroxiestibenos que tienen como característica un C=C central de doble enlace conjugado con 2 fracciones fenólicas, son especialmente proclives a reacciones de oligomerización a través de reacciones oxidativas de acoplamiento. Similar a los ácidos hidroxicinámicos, ésteres y alcoholes que se convierten en dímeros Lignan/neolignan por este tipo de reacciones de acoplamiento; el resveratrol y sus análogos naturales como el piceatanol (astringina) pueden reaccionar de la misma manera y ser transformados bioquímicamente en oligómeros polifenoles como el eviniferin, cassigarol, pallidol y el tetrámero inductor de la apoptosis Vaticanol C.

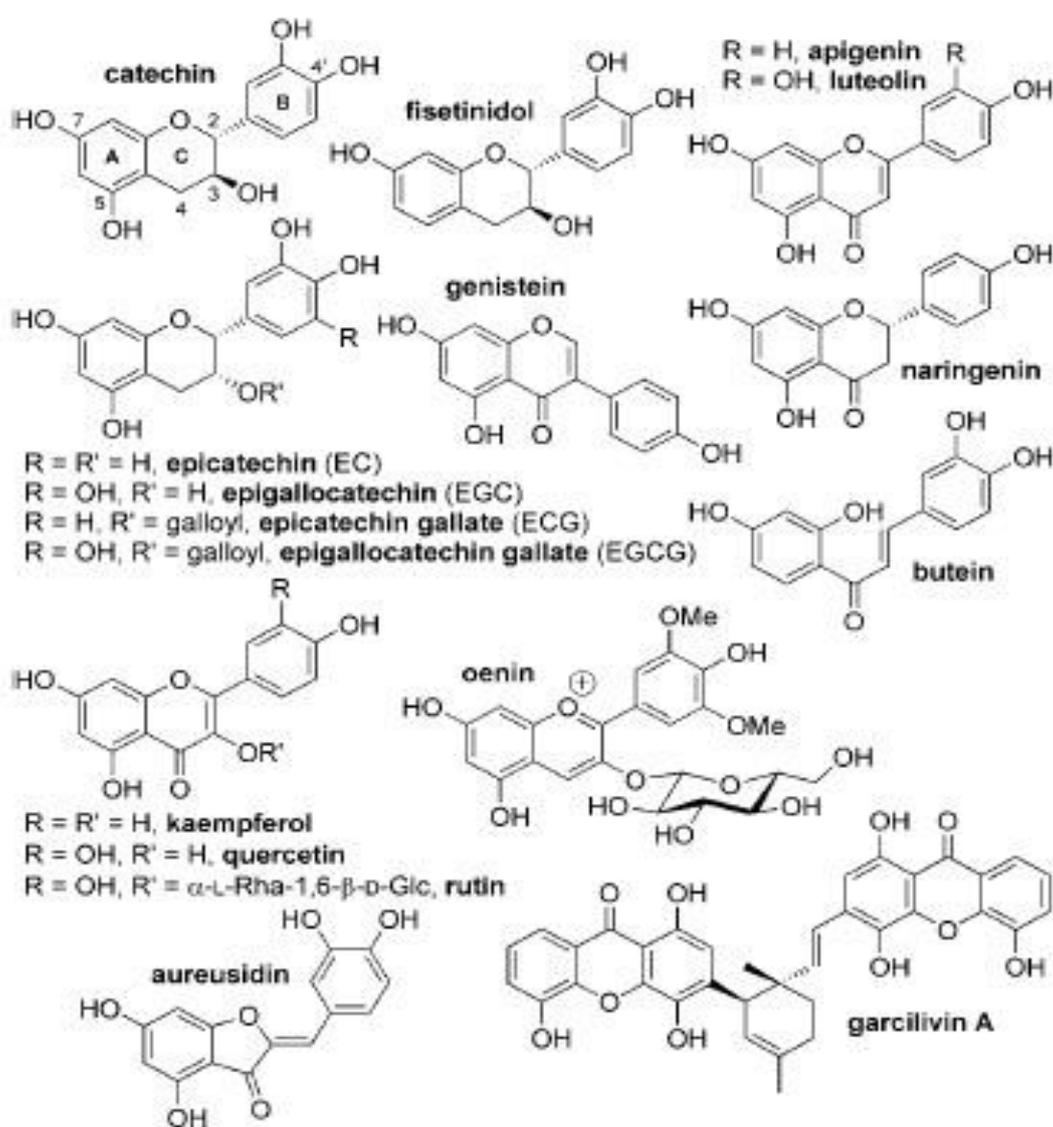


Figura 6.10. Ejemplo representativo de los flava/flavonoides <sup>29</sup>.

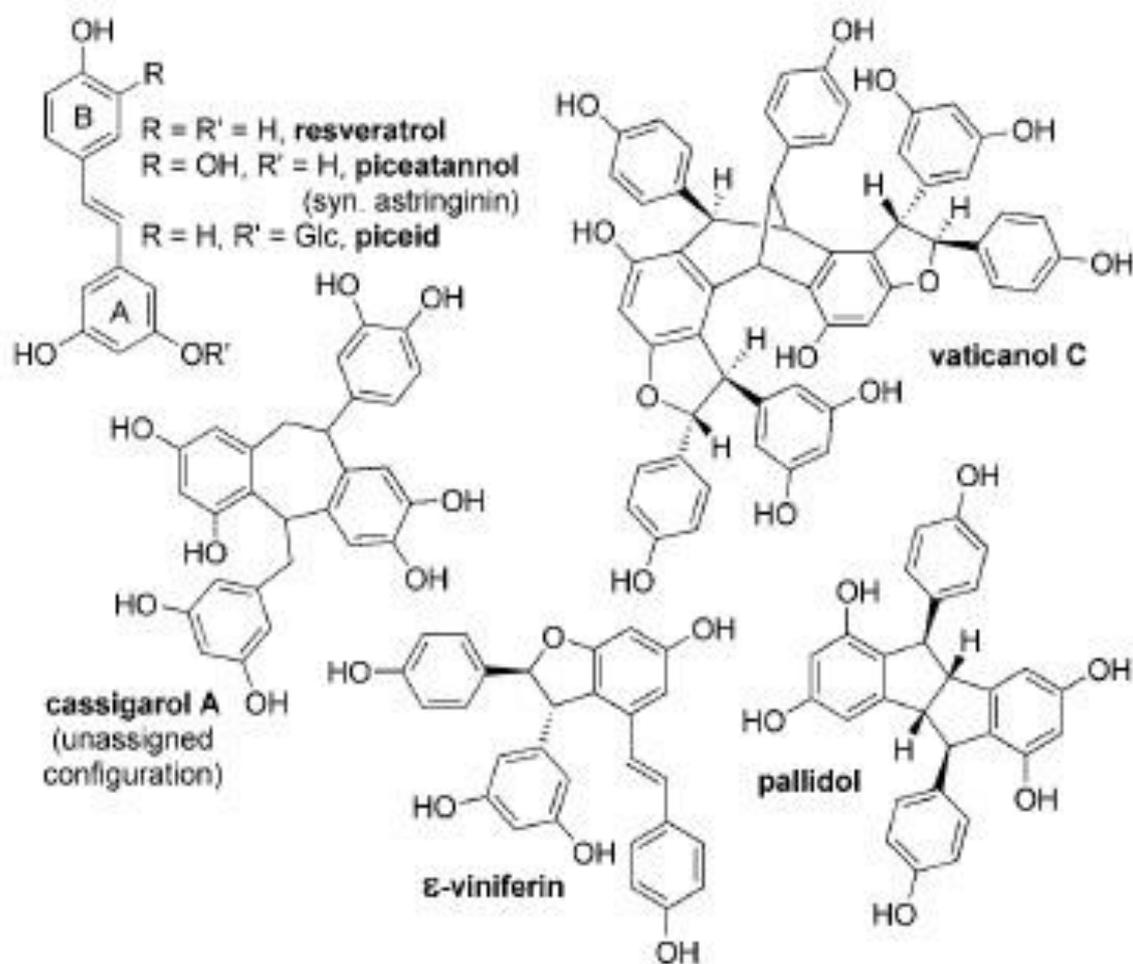


Figura 6.11. Estructuras de resveratrol y ejemplos de oligoestilbenes <sup>29</sup>.

Ácido cafeico: El ácido cafeico junto al ácido ferúlico, sinápico y p-cumárico están dentro de la serie de hidroxicinaminas, que difieren entre sí por el número de grupos hidroxi- y metoxi-, y por sus unidades fenil. Estos ácidos monofenólicos carboxílicos son frecuentemente encontrados esterificados. El ácido cafeico (3,4-dihidroxicinámico) por ejemplo se encuentra en las semillas de café como ácido 3,5-dicafeoylquinico. Estos derivados se conocen como ácidos clorogénicos, referidos generalmente como cafetaninos.

A través de la hidratación, esterificación y reacciones de acoplamiento, el ácido cafeico por sí solo da lugar a estructuras oligoméricas como el ácido rosmarínico entre otros.

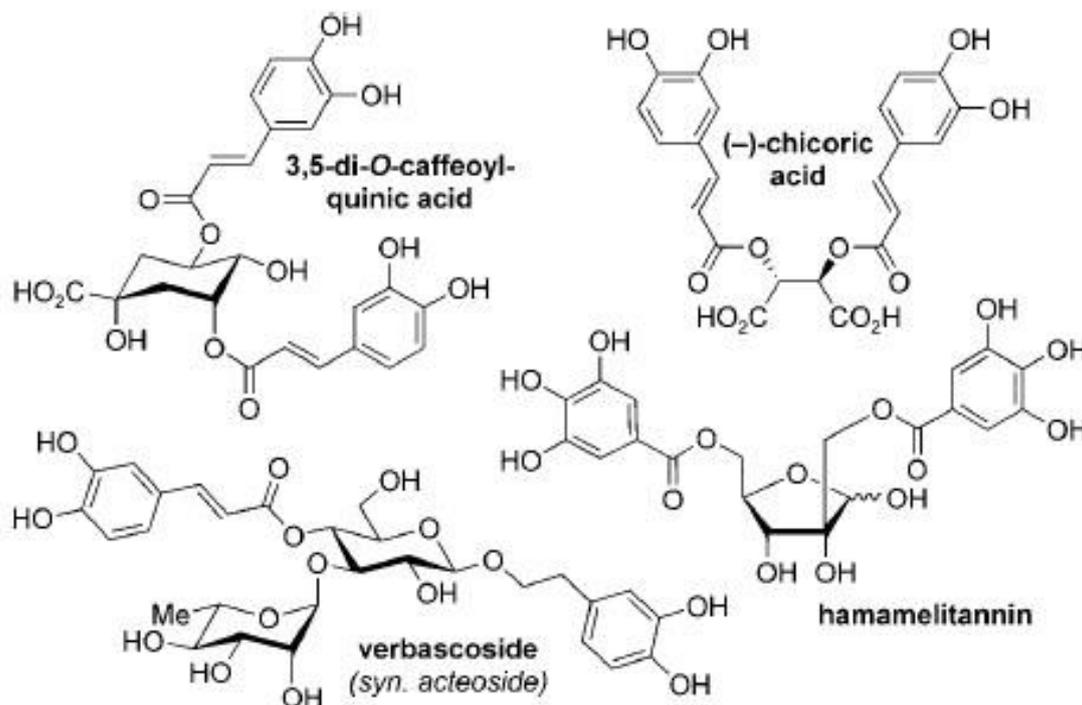


Figura 6.12 Ejemplo representativo de los derivados polifenólicos de esteres cafeólicos y estructura de los derivados hamamelitaninos de los esteres de galóicos. <sup>29</sup>.

#### 6.4.3. Otras rutas metabólicas

Llevando al límite la definición de WBSH, todos los compuestos anteriormente citados deberían aceptarse dentro de la familia polifenoles. De hecho, en la literatura el término polifenoles se utiliza comúnmente para denominar simples componentes monofenólicos de las plantas. En este contexto, los ácidos fenilpropanoides cinámicos hidroxilados tendrían otra vez un estatus especial ya que su metabolismo conlleva a varias formas adicionales monofenólicas a través de, por ejemplo, la decarboxilación, deshidratación, hidrogenización, oxidación etc. Estos derivados incluyen a la vainilla aldehídica C5-C1 (aroma característico de las semillas de vainilla fermentada. También el ácido carboxílico salicílico, el eugenol, la escopoletina, que son importantes mecanismos defensivos de las plantas, se encontraría en este grupo.

Otras sustancias monofenólicas también pueden jugar importantes roles en el mundo vegetal y también en los alimentos y bebidas derivados. Todos estos compuestos son de gran interés en el campo de la investigación, aunque no significa necesariamente que puedan ser referidos como polifenoles.

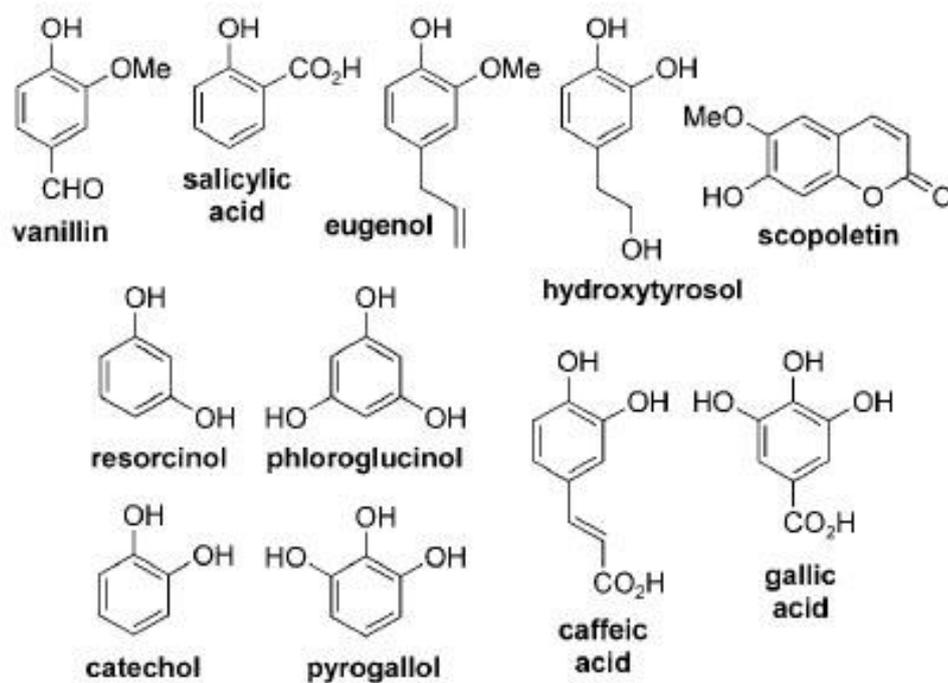


Figura 6.13. Ejemplos de los derivados simples “monofenoles”<sup>29</sup>

### 6.5 Aspectos botánicos del arándano americano

El arándano americano (inglés: American arándano americano, large arándano americano o, simplemente, arándano americano) es el fruto pequeño y rojo de *Vaccinium macrocarpon* Aiton, una planta perenne. El fruto tiene por lo general de 1 a 2 centímetros de diámetro, pesa de 1 a 2 gramos y se distingue por su intenso color rojo carmesí. El género *Vaccinium* pertenece a la familia de las *Ericaceae*. Entre las otras especies de *Vaccinium* se encuentra:



Figura 6.14 Arándano azul (*V. corymbosum* L., en inglés: blueberry) y arándano azul Silvestre (*V. angustifolium* Ait. en inglés: wild blueberry).



Figura 6.15. Arándano europeo (*V. oxycoccus* L., European arándano americano, small arándano americano), mirtilo o arándano (*V. myrtillus* L., bilberry, whortleberry) y arándano rojo (*V. vitis-idaea* L., ligo berry).

El arándano americano es una de las pocas bayas de cultivo autóctona de Norteamérica con un valor comercial significativo, junto con el arándano azul y la vid silvestre o labrusca (*Vitis labrusca* L. en inglés: fox grape), conocida por la variedad de uva Concord. El nombre inglés (arándano americano) evolución de arándano americano (baya de grulla), denominación que le dieron los colonos, que asociaron la forma de la flor con el cuello, cabeza y el pico de dicha ave. A pesar de que existen muchas variedades de arándano americano, comercialmente predominan nueve variedades. De ellas dos, Early Black y Stevens, ocupan la mayor parte de la superficie de cultivo. La variedad Early Black es una selección autóctona que se remonta a 1857 y la Stevens es un híbrido introducido por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USA) en 1950. La producción mundial de arándano americano, en 1999, ascendió a 333.690 toneladas, de las cuales el 85% se cultivaba en Estados Unidos (Massachusetts y New Jersey) y Canadá (Quebec y New Columbia), mientras que una pequeña cantidad del fruto se cultiva en Chile.

La industria del arándano americano representa un mercado mundial de 2.000 millones de dólares (estimación del 2001), cuyos productos incluyen el fruto fresco, zumos, compotas, fruto desecado e ingredientes como el fruto congelado, concentrados de zumo y el zumo desecado por atomización<sup>32</sup>

#### 6.5.1. Composición del fruto

Los componentes de principal interés en el arándano americano son las antocianinas y las PAC tanto de tipo A (con al menos un set de enlaces entre unidades de monómeros) como de tipo B (con todos los enlaces simples interflavan). Se ha demostrado la actividad bacteriana de anti adhesión de las PACs tipo A<sup>33</sup>, con un efecto de relevancia clínica en cuanto a los efectos beneficiosos sobre el tracto genitourinario. Las PACs con enlaces del tipo B únicamente no han demostrado actividad antiadhesiva in vivo<sup>33-35</sup>. Las antocianinas promueven adicionalmente una actividad anticancerígena, poseen efectos cardioprotectores y son poderosos antioxidantes. El ácido ursólico y los polifenoles también contribuyen a la promoción general de la salud, ya que poseen actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antioxidante<sup>36</sup>. Además de la bioactividad de estos constituyentes, la cuantificación de componentes específicos puede usarse para evaluación de la calidad y para la detección de adulterantes tanto de los frutos crudos como de preparaciones finales.

Los arándanos americanos contienen una gran variedad de nutrientes (ver Tabla 6.5). Los arándanos crudos contienen aproximadamente un 86.5% de agua y un 13.5% de sólidos<sup>37</sup>. Entre los constituyentes orgánicos que componen los sólidos se encuentran los carbohidratos, ácidos orgánicos, terpenes, esteroides y componentes polifenólicos<sup>38, 39, 40</sup>. El jugo de prensado contiene entre un 5% y un 7% de sólidos, la mayoría de los cuales se componen de azúcares y ácidos orgánicos<sup>32, 37, 41</sup>. El Brix °Bx (contenido de azúcar) del jugo de concentración de arándano oscila entre 6.5 y 8.7 °Bx, siendo el estándar aceptado por la industria de 7.5 °Bx<sup>32, 42</sup>. Combinado con una acidez medible en el rango de 1.9 a 2.9 g/100 mL, el jugo resultante da lugar a una bebida altamente ácida, astringente y generalmente desagradable al paladar<sup>41, 42</sup>. Para hacer la bebida más agradable, debido a la baja concentración natural de azúcares en los arándanos americanos, los fabricantes de zumo mezclan el zumo de concentración natural con agua, edulcorantes (azúcar, concentrados de zumo de otras frutas o edulcorantes no nutritivos en preparaciones de bajo contenido en azúcar) y ácido ascórbico para producir un cóctel de bebida a base de zumo de arándano. El porcentaje de concentrado usado en los cócteles varía, aunque es típico encontrar cócteles con aproximadamente un 27% de zumo puro<sup>32, 37, 41, 42</sup>.

Tabla 6.5. Contenido de nutrientes en arándano americano y sus productos.<sup>43</sup>

Nutrient	Whole raw (1 c or 95 g)	Dried sweetened (0.33 c or 40 g)	Juice, unsweetened (1 c or 253 g)	Juice (27%) cocktail (1 c or 253 g)
Energy (kcal)	44	123	116	137
Water (g)	83	6	220	218
Protein (g)	0.37	0.03	0.99	0.00
Carbohydrate (g)	11.59	32.94	30.87	34.21
Total lipid (g)	0.12	0.55	0.32	0.25
Fiber (g)	4.4	2.3	0.3	0
Potassium (mg)	81	16	194	35
Sodium (mg)	2	1	4	5
Selenium (µg)	0.1	0.2	0.4	0.5
Vitamin A (µg RAE)	3	0	6	0
Vitamin C (mg)	12.6	0.1	23.6	107.0
Vitamin E (mg α-tocopherol)	1.14	0.43	3.04	0.56
β-Carotene (µg)	34.2	0.0	68.3	13.0
Lutein + zeaxanthin (µg)	86.45	13.40	172.67	33.00

Source: McKay and Blumberg (2007).

### 6.5.1.1. Antocianinas

La pigmentación roja del arándano Americanos se atribuye principalmente a la presencia de las siguientes 6 antocianinas, que se encuentran mayoritariamente en la piel (1705.2 mg/100 g por peso seco, mientras que la fruta pelada (pulpa) contenía solamente 101.5 g/100 g)<sup>44</sup>: cianidina 3-O-galactósido, cianidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-arabinósido, peonidina 3-O-galactósido, peonidina 3-O-glucósido y peonidina 3-O-arabinósido como aparece descrito por Fuleki y Francis<sup>45</sup>. En cambio, el dímero de procianidina A-2, cuantificado por LC-MS, estaba más concentrado en la pulpa de la fruta pelada que en la piel (76.9 mg y 44.9 mg/100 g por peso seco de pulpa y piel, respectivamente). Las antocianinas galactósido son más predominantes, seguidas de las antocianinas arabinósido y niveles muy bajos de antocianina glucósido. Dos antocianidinas (cianidina y peonidina), las agliconas de antocianinas, pueden generarse por la pérdida de los restos de azúcar (galactosa, glucosa y arabinosa) como efecto del

procesado <sup>46</sup>. El contenido total de antocianina en la fruta fresca es de 25 a 100mg/100 g <sup>47</sup>, de la fruta enlatada es de 8 a 24 mg/100 mL, y del cóctel de zumo de arándano (Ocean Spray) es de 6 a 10 mg/100 mL <sup>45</sup>. El contenido total de antocianina en la fruta y productos del arándano varía y depende de la variedad, condiciones ambientales, prácticas de cultivo, condiciones de almacenamiento y procesado después de la recogida. En frutas comestibles, los valores registrados de antocianina varían entre 13.6 y 140 mg/100 g <sup>32, 40, 48</sup>. Los niveles en los zumos son generalmente más bajos que en las frutas con diferentes rangos encontrados en la literatura. Hong y Wrolstad encontraron niveles en el zumo de prensado desde 19 hasta 53 mg/100 mL para distintas variedades de arándanos. En los cocteles de zumo de arándano, se encontraron 1.3 mg/100 mL de antocianinas <sup>49</sup> y entre 8 y 25 mg/L <sup>32</sup> según los diferentes autores. De media, el ratio de cianidina:peonidina es aproximadamente 40:60 en frutas y 60:40 en zumos <sup>50</sup> y este valor además de para la detección de niveles significativos de otros tipos de antocianina, también ha sido usado como marcador para detectar alteraciones del producto del arándano; aunque los nuevos métodos son más definitivos <sup>51</sup>. El contenido de antocianina es inversamente proporcional al tamaño de la fruta, puede aumentar durante el almacenamiento y es directamente proporcional a la actividad antioxidante <sup>52</sup>.

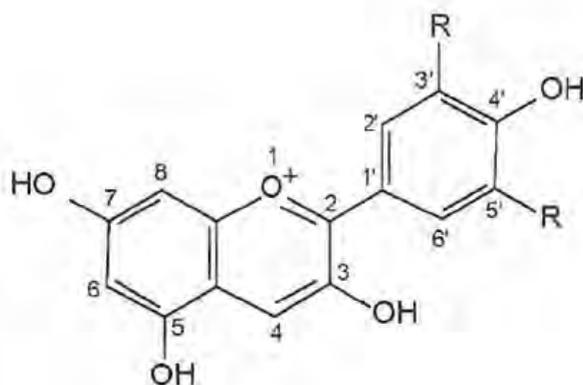


Figura 6.16. Estructura general de las antocianidinas (aglicones de los antocianósidos o antocianinas).

#### 6.5.1.2. Proantocianidinas (PACs)

Los oligómeros PAC del arándano, también denominados taninos condensados o poliflavan-3-ols, están predominantemente formados por unidades de elongación de catequina. La estereoquímica de los monómeros del flavonol es predominantemente 2,3-trans unidades <sup>33-35</sup>. La media de catequinas totales en el arándano crudo es de 17 mg/100 g con la epicatequina siendo la más abundante <sup>53</sup>. Según el grupo de Gu, el zumo de arándano contiene 6mg/L de catequina <sup>54</sup>. Oligómeros y polímeros con un grado de polimerización por encima de 3 son más efectivos en la prevención de la adherencia de *E. coli* P fimbriado a las células uroepiteliales in vitro que los dímeros <sup>33</sup>. Los PACs de arándano también aumentan la aglutinación de *E. coli* extra-intestinal patógena (ExPEC), reducen la invasión de células epiteliales ExPEC <sup>51</sup> y, en animales, mejora el estado de las capas de mucosa intestinal aumentando los niveles de mucina oral e inmunoglobulina A secretora intestinal <sup>55</sup>.

Hay 2 series comunes de dímeros de PAC. El tipo B son dímeros vinculados ya sea en el C4 a C6 o C4 a C8 posición mientras que la serie de tipo A son dímeros vinculado en el C4 a la posición C8 con un C2 adicional a O para éter C7 enlace. Los oligómeros PAC del arándano americano con un grado de polimerización (DP) superior a 2 puede incorporar tanto PAC de tipo A y De tipo B de enlaces interflavánicos. Por la extensión de esta definición, y para los fines de discutir las diferencias entre los oligómeros, PAC que contiene uno o más enlaces interflavánicos de tipo A en su estructura se conocen como PAC tipo A mientras PAC oligómeros que contienen enlaces interflavánicos únicamente de tipo B son conocidos como de PAC tipo B. En 2012 se comenzó a aplicar un método para deconvolucionar patrones de isótopos de MALDI-TOF MS (espectrometría de masas de tiempo de vuelo de laser de desorción/ionización asistido por matriz) y determinaron que más del 91% de las moléculas de PAC del arándano tenían al menos un enlace tipo A <sup>56</sup>. Los ratios de enlaces Tipo A a enlaces Tipo B en PAC son específicos de cada producto y por lo tanto constituyen una información que puede usarse para autenticar el contenido de arándano Americano. Los PACs pueden ser además solubles (extraíbles) o insolubles (no extraíbles) dependiendo de la historia de la muestra de arándano y del disolvente de extracción. Las PACs insolubles están habitualmente unidos a componentes de pared celular de carbohidratos complejos o proteínas. El grado medio de polimerización de las PACs difiere y se han publicado valores variables como 4.7 <sup>35</sup>, 8.5 a 15.3 <sup>57</sup>, y hasta 23 <sup>36</sup>. Esta variabilidad es en parte debido al uso de diferentes métodos analíticos que emplean tiolisis y fluoroglucinosis. Al igual que las antocianinas, la cantidad de PACs encontrada en el arándano puede variar, en parte debido a las variaciones en las muestras y en parte debido a diferencias en las metodologías de análisis. Basándose en los análisis de HPLC-MS-MS, <sup>54</sup> encontraron un contenido de PAC de 418.8±75.3 mg/100g de fruta fresca y 231±2mg/L en el cóctel de zumo de arándano Americano. Diferentes valores se encontraron usando otros métodos analíticos. En ambas matrices, la mayoría de los PAC tenía un grado de polimerización inferior a 10.

Los pigmentos oligoméricos que se encuentran en el arándano americano son similares a estructuras encontradas en el vino. Aproximadamente un 10% del color del zumo de arándano fresco se debe a material polimérico <sup>42</sup> y eso aumenta con la longevidad del fruto. MALDI-TOF-MS se usó para caracterizar la diversidad estructural de una serie de oligómeros antocianina-poliflavan-3-ol en arándano americano y polvo de zumo secado por spray. Los espectros de masas del MALDI-TOF proporcionaron evidencias para una serie de compuestos que se corresponden con antocianinas ligadas a PAC a través del puente CH3-CH (Krueger et al 2004). La presencia de PAC-antocianinas oligoméricas en el arándano <sup>58</sup>, se ha confirmado mediante el uso de MALDI de transformada de Fourier y espectrometría de masas de ionización electrospray y cromatografía líquida <sup>59</sup>.

#### 6.5.1.3. Flavonoles

Los flavonoles principales en el arándano americano son las galactósidos, arabinósidos y rhamnósidos de quercetina (177-250 mg/kg), myricetina (4-27 mg/kg) y kaempferol (1-3 mg/kg). Más de 20 flavonoles distintos se encuentran en el arándano americano, con proporciones relativas que difieren entre variedades de arándano <sup>40</sup>. El contenido total de flavonol en el arándano americano está en el rango de 20 a 40 mg/100g <sup>60</sup>. Tanto el quercetina como el myricetina aparecen principalmente en forma de monoglicósidos en la fruta, siendo el galactósido de quercetina la forma más

abundante. Tres agliconas de flavonol pueden generarse por la pérdida de fracciones de azúcar como efecto del procesado <sup>46</sup>. El perfil de flavonol en los productos procesados de arándano tales como el zumo y el polvo es similar al de la fruta. Sin embargo, estos productos también contienen una cantidad significativa de agliconas de flavonol.

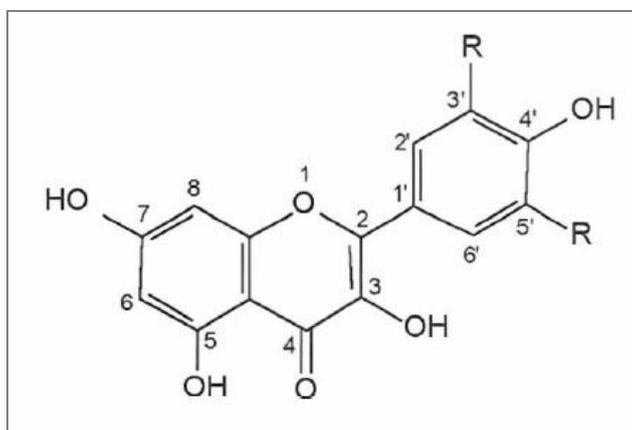


Figura 6.17. Estructura general de un flavonol

#### 6.5.1.4. Ácidos orgánicos

El arándano americano contienen 3 ácidos orgánicos primarios: ácido quínico, ácido cítrico y ácido málico. Estos ácidos componen una porción importante del total de sólidos en el zumo de arándano americano, en un rango de entre 2.2 y 3.75% (peso/volumen) <sup>42</sup>. En 2004, se publicaron unos valores medios de 3.1% para zumos no concentrados <sup>32</sup>. Los arándanos poseen un nivel relativamente alto de ácido quínico, con valores entre 0.83 y 1.62% para la fruta y un valor medio de 1.05% en el zumo no concentrado. Los mismos ácidos están presentes también en el zumo de arándano americano en ratios muy consistentes. Los estudios generalmente se ponen de acuerdo en los siguientes porcentajes medios de ácidos orgánicos: para ácido quínico 40%, ácido málico 28%, ácido cítrico 32%. La consistencia de estos ratios permite su uso en la evaluación del control de calidad de los productos del arándano americano <sup>42</sup>. Se han encontrado bajas concentraciones de ácido ascórbico (11-14 mg/100 g en arándanos enteros), ácido shikimico y ácido tartárico. El procesado de los arándanos en zumo puede resultar en significativa pérdida de ácido ascórbico en zumo de arándano no fortificado y las concentraciones de ácido ascórbico encontradas en estos productos son mucho más bajas (<2 mg/100g) <sup>37, 40</sup>. Para compensar estas pérdidas, los productos de arándano son a menudo fortificados con ácido ascórbico a niveles equivalentes a la ingesta diaria recomendada (RDI) <sup>42</sup>. El ácido cítrico aparece en concentraciones de 1.3% a 1.1% en la fruta y el zumo, respectivamente <sup>37</sup>. El ácido málico está presente en menores concentraciones con valores medios de 0.7% a 0.8% en la fruta y el zumo respectivamente. El ácido shikimico está presente en el arándano en bajas concentraciones con valores de 0.03% en la fruta y 0.02% en el zumo <sup>32, 42</sup>. Los arándanos son altamente ácidos, con valores típicos de pH de en torno a 2.5. El ácido benzoico, un compuesto con actividad antibacteriana que se metaboliza a ácido hipúrico, que también es antibacteriano, aparece en cierta cantidad en las frutas de arándano, puede aparecer en cantidades mayores en preparados de arándano americano, y puede no estar en otros preparados. Una investigación más reciente realizada por nuestro grupo sugiere que los ácidos orgánicos y sus metabolitos podrían jugar un papel

importante en la actividad antiadhesiva del arándano <sup>61</sup> aunque se necesita confirmación.

El arándano americano contienen más de 20 ácidos fenólicos simples, ácidos hidroxicinámicos y ácidos orgánicos triterpénicos <sup>40, 62</sup> y difieren entre preparados (Tabla 6.17). Más del 50% de estos fenólicos simples son esterificados a azúcar, polisacáridos de pared celular, u otros componentes. El ácido sinápico, el ácido p-cumárico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico son los ácidos hidroxicinámicos más predominantes. El ácido benzoico y el ácido salicílico son los ácidos fenólicos más predominantes; el ácido benzoico es el principal compuesto aromático del zumo de arándano americano <sup>63</sup>. De acuerdo con dicho autor, la concentración es de 4.7 g/kg de fruta fresca. Sin embargo, debido a la diversidad de estructuras de los ácidos fenólicos del arándano, el análisis por HPLC puede resultar en una subestimación de los fenólicos totales <sup>44</sup>.

El ácido oleanólico y el ácido ursólico y 2 triterpénicos lipofílicos están presentes en la cobertura cerosa de la piel de la fruta. La fruta entera del arándano contiene aproximadamente 60 a 110 mg/100 g de ácido ursólico, pero este compuesto no aparece en el zumo comercial. El ácido ursólico tiene propiedades anti-inflamatorias y varias investigaciones in vitro han probado que este ácido y sus derivados tienen actividad citotóxica y antiproliferante directa frente a varias líneas de células cancerígenas <sup>64</sup>.

#### 6.5.1.5. Aceites volátiles

El arándano americano frescos contienen aproximadamente 0.00011% de aceites volátiles consistentes en  $\geq 68$  componentes incluyendo monoterpénicos (fundamentalmente  $\alpha$ -terpineol al 24% del total de aceite volátil, mas cineol 0.7%, carvacrol 0.5%, limonene 0.4%, linalool 0.3% y otros) y diterpenos (kaurene 1.1%, pimaradiene 1.0% y manoyloxido 0.3%). Otros terpenos encontrados en el arándano incluyen  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, myrceno y nerol. Los terpenos contribuyen en gran medida al sabor y aroma de la fruta. La isofrona, un compuesto encontrado en muy pocas plantas hasta la fecha, está presente al 0.2% en el total de aceite volátil. También están presentes compuestos aromáticos tales como el benzil alcohol (9%), el mencionado carvacrol, varios ésteres ácidos benzoicos, 4-etilguaiacol (0.7%), benzodiazol (0.6%) y eugenol (0.2%). Gran parte de los datos están anticuados y se beneficiarían de análisis más modernos con las actuales tecnologías analíticas.

#### 6.5.1.6. Azúcar y carbohidratos complejos

El azúcar en la fruta de arándano americano aparece en concentraciones de 1.1% de fructosa y 4.3% de glucosa <sup>42</sup>. La pared celular del arándano está formada por celulosa, pectina y hemicelulosa. Los sólidos de la pulpa de arándano (torta de prensa) son un 35% de fibra insoluble (USDA-ARS 2004). La fracción de fibra soluble en el arándano contiene sacáridos oligoméricos con unidades monómeras mayoritariamente de arabinosa, glucosa, galactosa y rhamnosa, con menores cantidades de xilosa y manosa. Las interacciones entre los carbohidratos y los PACs resultantes del enlace covalente, dan lugar al PAC insoluble.

Phenolics	Concentration in fruits (µg/g)		Concentration in juice (µg/mL)		Concentration in fresh sauces (µg/g)	
	Free	Total	Free	Total	Free	Total
Benzoic acid	416.5 ± 32.4	5575.8 ± 363.4	234.6 ± 15.6	3256.7 ± 109.8	358.8 ± 44.9	4658.5 ± 478.4
<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid	ND*	29.03 ± 2.32	14.12 ± 2.41	34.64 ± 3.43	2.33 ± 0.32	24.73 ± 3.53
<i>trans</i> -Cinnamic acid	1.08 ± 0.31	18.29 ± 1.33	0.78 ± 0.14	7.68 ± 1.23	0.87 ± 0.21	9.07 ± 2.21
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	6.34 ± 0.34	14.82 ± 2.87	0.92 ± 0.21	3.72 ± 0.23	2.31 ± 0.12	6.35 ± 1.54
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	5.77 ± 0.24	27.83 ± 3.89	0.37 ± 0.09	3.82 ± 0.43	1.09 ± 0.13	12.89 ± 3.76
<i>p</i> -Hydroxyphenylacetic acid	ND*	4.95 ± 0.43	ND*	2.69 ± 0.21	ND*	3.64 ± 0.98
<i>o</i> -Phthalic acid	6.34 ± 0.65	19.28 ± 2.43	ND*	23.96 ± 3.56	ND*	20.45 ± 4.74
2,3-Dihydroxybenzoic acid	1.63 ± 0.22	5.02 ± 0.89	7.99 ± 1.23	39.65 ± 4.63	0.93 ± 0.09	10.73 ± 1.89
Vanillic acid	8.98 ± 0.98	33.86 ± 3.11	0.95 ± 0.76	23.99 ± 2.45	3.32 ± 0.87	43.02 ± 6.43
<i>o</i> -Hydroxycinnamic acid	16.56 ± 1.21	92.43 ± 3.89	4.68 ± 1.01	140.68 ± 21.4	0.87 ± 0.23	90.93 ± 10.32
2,4-Dihydroxybenzoic acid	1.27 ± 0.11	24.32 ± 1.23	0.78 ± 0.11	7.83 ± 2.5	5.78 ± 1.09	15.68 ± 3.52
<i>p</i> -Coumaric acid	31.63 ± 2.43	329.6 ± 23.5	10.88 ± 2.32	210.88 ± 23.6	25.86 ± 4.87	289.76 ± 33.8
Ferulic acid	7.92 ± 1.08	94.23 ± 10.9	3.86 ± 0.87	13.78 ± 1.78	3.23 ± 0.77	32.43 ± 5.78
Caffeic acid	6.94 ± 1.11	202.5 ± 23.4	0.95 ± 0.21	40.75 ± 4.82	1.24 ± 0.13	31.64 ± 4.65
Sinapic acid	0.88 ± 0.13	28.34 ± 1.32	18.87 ± 3.56	218.87 ± 34.7	0.52 ± 0.12	20.72 ± 5.23
<i>trans</i> -Resveratrol	0.76 ± 0.11	47.03 ± 3.56	0.45 ± 0.23	40.43 ± 7.54	ND*	20.87 ± 4.34
(-)-Epicatechin	48.7 ± 3.98	122.79 ± 13.67	6.12 ± 1.21	36.92 ± 3.26	35.2 ± 3.7	72.77 ± 6.23
Catechin	3.62 ± 0.33	58.23 ± 7.55	2.86 ± 0.43	42.89 ± 6.87	3.66 ± 0.54	39.96 ± 4.53
Quercetin	1399.7 ± 34.7	3445.8 ± 108.6	193.8 ± 16.5	2983.5 ± 187.3	689.4 ± 78.4	3675.8 ± 387.9
Myricetin	789.6 ± 93.9	2108.4 ± 243.8	86.9 ± 3.4	1966.8 ± 194.3	426.8 ± 39.7	2026.3 ± 213.7

Tabla 6.6. Componentes fenólicos totales y libres en los frutos, zumos y salsas de arándano americano

Los arándanos tienen un ratio alto de glucosa:fructosa, lo cual es inusual para zumos de frutas. Este ratio ha sido usado para detectar la adulteración del zumo de arándano sin concentrar sin edulcorar. Hong y Wrolstad encontraron un ratio medio de glucosa:fructosa de 3.8. La detección de sorbitol en cantidades significativas puede también dar una indicación de la adulteración, ya que el sorbitol solo se encuentra en el arándano en cantidades rastreables <sup>42</sup>.

#### 6.5.1.7. Vitaminas

El arándano contiene un número de nutrientes tales como la vitamina C y vitaminas B (ver Tabla 6.7). La vitamina C se degrada con facilidad en el procesado, resultando en que los fabricantes de zumo fortifican sus productos con ácido ascórbico. La semilla de arándano también contiene vitamina E.

Tabla 6.7. Vitaminas encontradas en el arándano Americano.

Vitamins	Concentration per 100 g fresh fruit
Ascorbic acid (vitamin C)	7.5–32 mg
Niacin	33–100 µg
Pantothenic acid	25 µg
Beta-carotene	40 IU
Thiamine (B-1)	13.5–30 µg
Pyridoxine (B-6)	10 µg
Riboflavin (B-2)	3–20 µg

Source: Fellers and Esselen 1955; Schmid 1977; Watt et al. 1975

#### 6.5.1.8. *Aceite de Semilla*

La semilla de arándano contiene ácidos grasos (~0.55%), siendo los más importantes los siguientes: linoleico, oleico, palmítico y linolénico <sup>65</sup>. La composición de los ácidos grasos consiste en grasas saturadas y no saturadas. De los ácidos grasos no saturados, de los extractos soxhlet y super critical CO<sub>2</sub>, el aceite de semilla contiene éster metil de ácidos grasos omega-3 tales como ácido  $\alpha$ -linolénico, ácidos grasos omega-6 tales como ácido linoleico y ácido eicosadienoico, y ácidos grasos omega-9 tales como ácido oleico, palmitoleico y eicosenoico. Además, varios hidrocarburos fueron identificados. También se encontraron un alquino desconocido, un hidrocarburo (posiblemente escualeno), y posiblemente  $\beta$ -sitosterol junto con tocoferos y amirin. La actividad de disminución del colesterol in vivo y mejoras en la lipoproteína de alta densidad también se han demostrado para el aceite de semilla de arándano <sup>66</sup>.

### 6.6. Productos derivados del arándano americano

#### 6.6.1. *Composición del zumo*

La composición aproximada de zumo de arándano americano de concentración natural a 7,5 °Bx, en 100 g es la siguiente: 92,9% agua, 7,1% sólidos, 27 calorías, 6,9 g carbohidratos, <0,1 g proteínas, <0,1 grasas, 96 mg minerales, 2 mg vitamina C. La graduación Brix (°Bx) es una medida de la concentración del zumo o por contaje de sólidos solubles, que se basa técnicamente en la sacarosa y se mide por hidrometría o refractometría. Una graduación Brix de 7,5 es, como se ha dicho anteriormente, la normativa industrial aceptada para el concentrado zumo de arándano americano natural.

Como se puede ver, el zumo de arándano americano está constituido casi en su totalidad por agua y carbohidratos. Los 6,9 g del total de carbohidratos incluyen 3,7 g de azúcares WLA 21, 3,1 g de ácidos orgánicos y 0,1 g de fibra dietética. En el zumo de arándano americano, la proporción de fructosa con respecto a la glucosa es menor a uno, lo cual es poco común comparado con muchos otros zumos de fruta en los que dicha proporción es normalmente mayor a uno. También es característico su contenido en ácido quínico, cuya valoración sirve para determinar el porcentaje de zumo de arándano americano en un producto, así como para detectar posibles adulteraciones.

Por lo que se refiere a la cantidad de ácido galacturónico, puede variar como consecuencia de la despectinización de la fruta o el zumo.

El análisis del Ácido 2-furoico (ácido furan-2-carboxílico), realizado junto con los ácidos fenólicos, en el cóctel de zumo de arándano americano dio un contenido de 2,9 ppm. El contenido de ácido oxálico, por su parte, fue de 5 ppm. El ácido oxálico, y el zumo de arándano americano por asociación, se han implicado en la formación de cálculos renales. No obstante, algunas investigaciones <sup>32</sup> han demostrado que el nivel de ácido oxálico en el zumo de arándano americano es insuficiente para la formación de cálculos renales (los minerales en 100 g de zumo de arándano americano incluyen sodio (4 mg), potasio (85 mg), calcio (7 mg) y hierro (0,3 mg).



Figura 6.18. Formas comerciales del arándano americano <sup>67</sup>.

#### 6.6.2. Composición del coctel de zumo de arándano americano

Comparado con otros zumos de fruta, se puede apreciar que el zumo de arándano americano tiene relativamente poco azúcar y mucho ácido. Esto afecta al dulzor y la palatabilidad percibidos. Este atributo de calidad a menudo viene descrito por la proporción de brix con respecto a la acidez valorable (BAR). Para los zumos de fruta que se consumen normalmente sin diluir y sin edulcorar, como el de manzana y el de uva, esta proporción puede hallarse en un intervalo de 22 a 24.

En comparación, el zumo de arándano americano tiene un BAR de aproximadamente 3.8, más parecido al zumo de limón, que tiene un BAR de 1.6. Los fabricantes de bebidas por lo general compensan el bajo contenido de azúcar y el alto contenido de ácido del zumo de arándano americano mezclándolo con agua y edulcorante para producir un coctel de zumo de arándano americano (CZA), con un BAR aproximado de 22. De hecho, el USDA ha establecido una descripción comercial del artículo (CID, Comercial ítem descripción) para esta forma de zumo de arándano americano, especificando el CZA como bebida que contiene al menos un 25 % de zumo de arándano americano y un 0,26 % de ácido químico. Por lo que se refiere a la cantidad de ácido galacturónico, puede variar como consecuencia de la despectinización de la fruta o el zumo.

### 6.6.3. Salsa de Arándano Americano

La salsa de arándanos se produce cociendo el fruto completo en un recipiente con pulpa de arándano (en zumo o exprimida). Se puede realizar como receta casera añadiendo agua y azúcar. El preparado casero comparado con el comercial posee más antocianinas y más PACs <sup>44</sup> posiblemente debido al empleo de más frutos frescos cuando se realiza en casa y al menor número de técnicas de manufactura). Un estudio experimental demostró que este preparado prevendría la adhesión de ciertas bacterias uropatógenas in vitro, pero solo un 40-80% de actividad comparado con el coctel de arándano <sup>68</sup>.

### 6.6.4. Arándano Americano deshidratado dulce

Este preparado comercial se obtiene infundiendo el fruto previamente deshidratado con azúcar y concentrado de zumo de arándano u otra fruta, y dejándolo posteriormente a secar.

Algunos estudios han mostrado beneficios de su consumo sobre el tracto urinario <sup>69, 70</sup>.

### 6.6.5. Suplementos Dietéticos de Arándano Americano

Los suplementos hechos con arándanos pueden hacerse de varias formas incluyendo preparaciones con el fruto completo deshidratado en polvo, zumo, pulpa (típicamente congelada), o realizadas con material previamente extraído. Por tanto, el contenido en PACs y antocianinas de cada preparado variara considerablemente. Según los costes algunas marcas utilizaran pulpa (bajo coste) o extracto de zumo (alto coste) o mezclas. Muchos preparados no concentran el origen de su materia prima.

### 6.6.6. Pulpa del Arándano (prensado)

La pulpa del arándano, una vez prensada para extraer el zumo y mezclada con los restos de semillas y tallos, es un producto secundario de la manufactura del arándano Americano que también se usa en la industria como ingrediente de complementos dietéticos. La preservación de antocianinas y flavonoles dependerá de las temperaturas del proceso de prensado. Su acción variara también en función de los aditivos con los que se unan.

## 6.7. Arándano americano en profilaxis

El principal y más conocido efecto del consumo de arándano rojo americano recae sobre el tracto urinario. Varios ensayos clínicos incluyendo meta-análisis apoyan que su uso ayuda a prevenir infecciones a este nivel. Hoy en día muchos consumidores toman diferentes formas del producto, principalmente en zumos y complementos alimenticios para la prevención y tratamiento de infecciones urinarias. Los datos actuales sin embargo no muestran evidencia suficiente de validez como tratamiento. Otras ramas de investigación han intentado demostrar la utilidad del arándano americano como antioxidante, antiviral, anticancerígeno, anticaries, protector contra úlceras, colesterol y como agente vasodilatador. Hasta la fecha la mayoría de la investigación con arándano americano consiste en ensayos clínicos observacionales

mostrando resultados variables o ensayos preclínicos centrándose en conocer los mecanismos de acción de este producto que podrían ser relevantes para sus efectos para la salud.

El consumo de arándano americano y sus derivados ha sido ampliamente recomendado para favorecer la salud del tracto urinario. La prevención y tratamiento de infecciones del tracto urinario han sido el principal objetivo de investigación dada su relevancia clínica. Un número similar de estudios con un número comparable de sujetos muestran sin embargo resultados igualmente positivos y negativos. La variedad de preparados y extractos de arándano rojo empleadas, la falta de adherencia al tratamiento y bajas en los estudios...han sido descritos como los principales factores de confusión<sup>10</sup>. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que padecen infecciones de orina recurrentes coinciden en la preferencia de un tratamiento natural comparado con la toma de un antibiótico. Este factor humano debería ser tenido en cuenta para entender los beneficios y limitaciones de este producto. Es imprescindible tratar de obtener una adecuada caracterización y dosificación del producto con el objetivo de maximizar su eficacia. En este sentido la mayoría de los estudios usan una dosis aproximada de 300mL de coctel de zumo de arándano americano que suministran unos 36mg de PACs solubles (analizado con DMAC con A2 estándar).

Hasta la fecha aún no se conoce el verdadero efecto del arándano americano en la prevención de infección urinaria. Otras teorías y mecanismos mencionados por diferentes autores incluyen además la acidificación de la orina y la conocida acción de las PACs sobre la adherencia bacteriana, la prevención de formación de biofilm, la disminución de la movilidad bacteriana, y más recientemente se ha hablado de la desregulación enzimática de la ureasa y la transcripción de la flagellina, que son importantes factores de virulencia<sup>71</sup>.

Adicionalmente a otros potenciales componentes bioactivos, los arándanos rojos contienen múltiples compuestos fenólicos. Aun se necesita nuevas investigaciones para determinar cómo estos componentes contribuyen a la antiadherencia bacteriana. Aunque los PACs han sido los más discutidos, estudios preliminares muestran como otros componentes fenólicos juegan un papel importante.<sup>72</sup>

Las bacterias deben adherirse y penetrar en las células del urotelio en el tracto urinario para causar una infección. Esto lo consiguen gracias a la unión a ciertos receptores a través de apéndices filamentosos llamados pili o fimbrias. Sobota en 1984, fue el primero en describir la acción anti-adhesiva del arándano rojo<sup>73</sup>. Posteriores experimentos han conseguido demostrar la capacidad antiadherente in vitro del zumo de arándano rojo. Al no poder adherirse al urotelio, las bacterias, en especial *E. coli*, no podrán proliferar y serán eliminadas con la orina. Al no ser esta acción bactericida, es muy poco probable que se desarrollen resistencias bacterianas<sup>33, 68, 74, 75</sup>.

Como previamente se ha discutido, un amplio rango de diferentes acciones se ha atribuido al arándano rojo. En torno a 1880, científicos alemanes observaron el incremento de ácido hipúrico en orina tras la ingestión de arándanos Americanos. En 1914, Blatherwick publicó que los arándanos son ricos en ácido benzoico y que este era excretado tras su consumo como ácido hipúrico. Tras esto siguió un largo periodo en el que la utilidad del jarabe de arándano se relacionó con la presencia de este ácido en la orina debido a su conocido efecto bacteriostático. Varios ensayos clínicos se llevaron a

cabo en los siguientes años intentando medir el consumo de arándanos en relación con la acidificación de la orina, pero concluyeron que el consumo habitual de 22-54g. De arándanos producía una muy pequeña variación en la acidificación. En un estudio muy temprano <sup>76</sup>, los investigadores probaban en 5 sujetos que el consumo de entre 1200-1400mL de zumo de arándano, modificaba ligeramente la acidez urinaria con presencia de unos 3-4 gramos de ácido hipúrico. Sin embargo, ninguna de estas muestras resultó bacteriostática frente a *E.coli*. Estas observaciones fueron confirmadas más tarde estableciendo que la pequeña cantidad de ácido benzoico presente en este fruto (<0.1% de su peso) y la cantidad ingesta máxima posible (4L/d) no conseguían la excreción de ácido hipúrico suficiente para conseguir el efecto bacteriostático. Todo esto invitaba a estudiar otros modelos de actividad del arándano frente a infección de orina.

Posteriormente, pero en la misma línea de estudio, Raúl Raz revisó el papel del arándano en la acidificación urinaria, así como su capacidad antiadherente. De esa forma, se ha intentado subrayar otros mecanismos como la generación no enzimática de óxido nítrico. El óxido nítrico (NO) posee potencial antimicrobiano que son a la vez tiempo y concentración dependientes. Enzimáticamente el NO puede ser generado in vivo desde la l-arginina y el oxígeno molecular a través de la NO sintetasa, sin embargo, el NO también se puede generar in vivo no enzimáticamente por la dismutación del nitrito en NO y NO<sub>2</sub> bajo las mismas condiciones ácidas.

En infecciones urinarias, el nitrito acidificado puede ser una fuente relevante de NO producido por la actividad de la nitrito-reductasa bacteriana y/o la inducción local de la NO sintetasa secundaria a inflamación. Carlsson comprobó que una ligera acidificación (pH 5.0-6.0) de orina de pacientes con infección de orina liberaban cantidades significativas de gas NO <sup>77</sup>. Esta acidificación era posible mediante la presencia de ácido ascórbico fisiológicamente alcanzables. Bajo estas condiciones, el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Pseudomonas aeruginosa* se veían claramente atenuados. Esto coincide con observaciones anteriores que describen al ácido ascórbico como acidificador suave de orina apoyando la idea de que la acción antimicrobiana podría ser secundaria a la facilitación de la dismutación de nitrito en NO.

Es posible por tanto que el efecto antimicrobiano del jarabe de arándano esté en parte explicado, al menos parcialmente por la capacidad reductora de sus componentes, incluyendo el ácido ascórbico que, como ya hemos comentado, facilita la generación no-enzimática de NO. Se ha de admitir de igual forma que al ser esta propiedad tiempo concentración-dependientes, esta acción puede ser limitada en el tratamiento y profilaxis de infección urinaria. Una evaluación cuidadosa de este mecanismo es necesario a la hora de probar la eficacia de del jarabe de arándano como alternativa no antibiótica contra infección de orina <sup>78</sup>.

#### 6.7.1. Farmacocinética

El arándano rojo contiene un amplio espectro de componentes con potenciales efectos beneficiosos como hemos descrito anteriormente <sup>79</sup> que incluyen flavonoides, polifenoles, antocianinas y PACs (proantocianidinas). Mas notablemente las PACs tipo A o taninas condensadas son conocidas por su actividad de antiadhesión antibacteriana. Las antocianinas por su actividad antioxidante y los ácidos orgánicos por su efecto antimicrobiano.

Los polifenoles de alto peso molecular como las PACs son mínimamente absorbibles debido a las uniones no hidrolizables entre las subunidades monoméricas y su propensión a ligarse a proteínas a través de uniones hidrogenadas. Debido a esta pobre absorción, hasta un 95% de los PACs permanecen en la luz intestinal durante su tránsito<sup>80, 81</sup>. Recientemente se ha encontrado que ciertos componentes polifenólicos pueden ser metabolizados a ácidos fenólicos simples a través de parte de la flora bacteriana y que esta metabolización tiene lugar en diferentes partes del tracto digestivo intestinal<sup>82</sup>. En el epitelio intestinal, hígado y otros tejidos se han encontrado 3 tipos de polifenoles/derivados polifenólicos: compuestos originales no metabolizados; metabolitos en fase 1 resultado de reacciones químicas como la hidrogenación, deshidrogenización, hidroxilación e hidratación; y metabolitos en fase 2, resultado de reacciones de conjugación como la metilación, glucoronización entre otras<sup>83</sup>.

También se ha estudiado la interacción del arándano Americano con medicamentos habituales. No se ha demostrado acción inhibitoria sobre enzimas como CYP1A2, CYP2C9 o CYP3A4.<sup>84</sup> demostraron resultados de inhibición de CYP3A en el metabolismo de nifedipino tanto en ratas como humanos sugiriendo que los componentes del arándano rojo son principalmente metabolizados en el hígado.

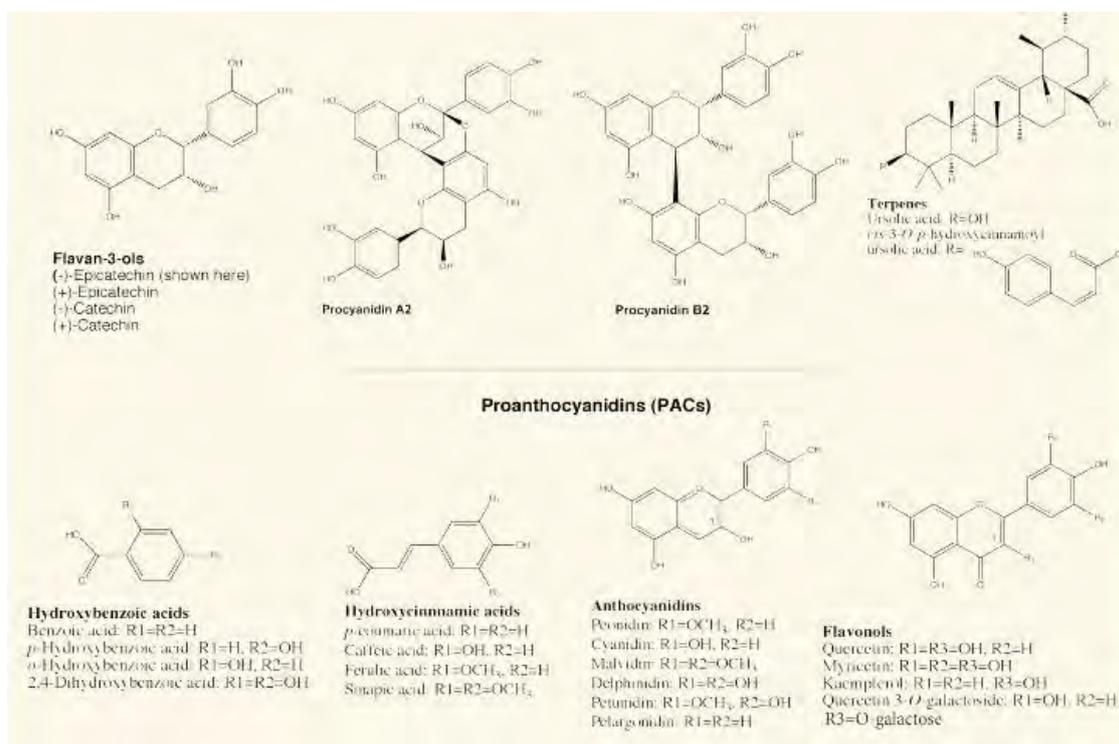


Figura 6.19. Constituyentes primarios de arándano americano relacionados con bioactividad.<sup>36</sup>

### 6.7.2. Proantocianidinas

Como sabemos el arándano rojo es rico en PACs tipo A y tipo B. La presencia de PACs es lo que hace este fruto tan especial ya que la gran mayoría de las frutas contienen PAC tipo B. Hay abundante información sobre la metabolización de PACs en frutas como las uvas, mostrando que su excreción es mayoritariamente en heces (45%) y orina (19%). Sin embargo, esta información puede no ser aplicable a todos los PAC por

lo que se necesitan más estudios con frutos ricos en PAC tipo A como el arándano rojo. También se ha demostrado recientemente que ciertos PACs se convierten en pequeños metabolitos absorbibles, pero de nuevo, más investigación es necesaria en este campo para saber si los PAC tipo A se incluyen dentro de ese grupo.

Un estudio de la doctora Howell en 2001<sup>85</sup>, demostró la capacidad anti adhesiva bacteriana del extracto purificado de PACs sobre *E. coli* de fimbrias tipo P inicialmente en ratones y posteriormente también en humanos. El grupo de McKay en 2015<sup>86</sup>, midieron las cantidades de derivados fenólicos en plasma y orina mostrando un más elevado y precoz pico en orina que en plasma. Se pudo demostrar la presencia de PAC A2 en orina por primera vez. Concluyeron haber demostrado la biodisponibilidad de componentes fenólicos en zumo de arándano Americano tras su consumo por humanos. Anteriormente nuestros compañeros de la facultad de ciencias habían realizado un estudio ex vivo tras el consumo de extracto de arándano en el que los PACs fueron prácticamente indetectables en orina<sup>83</sup>. Este grupo utilizó la técnica HPLC-DAD-TOF-MS.

Además de la acción anti-adhesiva en el tracto urinario se ha hipotetizado también con su posible efecto anti adhesivo en el tracto gastrointestinal<sup>87</sup>.

Sin embargo, nuevos estudios sugieren diferentes mecanismos de acción del arándano rojo en su acción antibacteriana. En 2013, 2 estudios relacionaron el efecto protector del arándano americano con la disminución de 8 proteínas/péptidos en orina humana tras la suplementación con este fruto. El significado de estas proteínas no es del todo conocido<sup>88, 89</sup>.

También recientemente, se ha mostrado que la exposición de *E. coli* extraintestinal a PACs inhibe la invasión intraeritrocitaria, altera la estructura superficial de *E. coli* e incrementa la destrucción de esta bacteria por macrófagos<sup>88</sup>.

Por tanto, podemos concluir que la acción de PACs y sus metabolitos en la prevención de la adherencia, invasión, así como su función inmune y farmacológica es más compleja de lo que se ha pensado hasta ahora y se requiere nuevos estudios para su conocimiento.

### 6.7.3. Antocianinas

Además de las PAC, los arándanos rojos contienen 6 pigmentos antocianinas. Estos componentes se creen responsables de su función antioxidante<sup>90</sup>. La metabolización de estos componentes es muy poco conocida y además altamente variable entre individuos. Diferentes estudios realizados en humanos muestran que la peonidina 3-galactosido era la más abundante en orina siendo la segunda más abundante en el zumo de arándano americano. El mismo estudio mostró un pico de concentración máxima en orina en torno a las 3-6 horas tras la ingesta siendo casi indetectable su presencia tras 12 horas<sup>91</sup>.

Sin embargo, otros estudios<sup>92</sup>, no encontraron presencia de fenoles, antocianinas o catequinas en plasma de individuos sanos tras el consumo de 750 mL zumo de arándano durante 2 semanas. Se ha descrito la presencia de antocianinas en plasma tras el consumo de otras frutas como sauco (elderberry), uvas y arándano azul<sup>93</sup>.

Las antocianidinas parecen ser únicas comparados con otros flavonoides debido que se absorben en su forma original, aunque pueden posteriormente se conjugan y metilan como otros flavonoides <sup>48,94</sup>.

Un estudio en animales mostró la presencia de peonidina 3-galatosido y cinianidina 3-galactosido intactas en orina de rata 1 hora tras el consumo de concentrado de arándano americano. Esta rápida eliminación junto con la baja presencia en plasma podría indicar que el efecto antioxidante no es en plasma sino secundario a una acción local en la vejiga y tejidos <sup>95</sup>.

#### 6.7.4. Flavonoles

Además de las antocianinas y los PACs, el arándano americano tiene un muy diverso perfil fitoquímico que incluye ácidos fenólicos y flavonoles. El arándano rojo es uno de los frutos más ricos en contenido de quercetina basado en peso.

En un estudio en humanos se midieron hasta 32 metabolitos de polifenoles en orina tras el consumo de jarabe de arándano americano incluyendo metabolitos de fase 1 y 2 <sup>83</sup>. Entre los flavonoles fueron identificados en dicho estudio metoxyquercetina, 3-ol-galactosido, mircetina y quercetina. Dichos componentes tuvieron un pico máximo de concentración en orina tras 4 horas y comenzaron a declinar tras 6 horas.

Estudios en animales han mostrado que hasta 13 metabolitos de la quercetina y metilquercetin fueron identificados en orina de rata tras ingesta de arándano americano. No se pudo detectar ningún nivel de quercetina en plasma tras 1 hora de la ingesta <sup>95</sup>. El mismo estudio confirmó mediante Cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (HPLC-MS), la presencia de quercetina e isorhmentina en células de la vejiga de estas ratas tras el consumo crónico de arándano americano.

#### 6.7.5. Ácidos fenólicos

Muchos flavonoides dietéticos son pobremente absorbidos a través de tracto digestivo. Sin embargo, bacterias colónicas han demostrado poder convertir flavonoides en simples ácidos fenólicos que pueden absorberse al torrente circulatorio y pueden por tanto contribuir a parte de los efectos beneficiosos del arándano rojo <sup>96</sup>. Los ácidos fenólicos parecen ser el último producto del metabolismo de flavonoides y otros polifenoles tras su digestión por parte de la flora bacteriana intestinal.

Varios ácidos fenólicos han sido reconocidos por su efecto beneficioso para la salud. Por ejemplo, el ácido ferúlico ha demostrado mejorar la hipertensión <sup>97</sup>, la peroxidación lipídica <sup>98</sup> y mejorar la secreción de insulina entre otras acciones <sup>99</sup>. El ácido cafeico ha demostrado mejorar la utilización de la glucosa y reducir la glucemia en ratas diabéticas <sup>100</sup>. El ácido clorogénico mejora la hipertensión y la función celular endotelial en ratas hipertensas <sup>101</sup>)

El ácido o-cumárico has resultado efectivo mejorando síntomas de síndrome metabólico y obesidad <sup>102</sup>. El ácido 3,4 dihidroxibenzoico está presente en numerosos vegetales y plantas medicinales. Uno de sus metabolitos más conocidos, la cianindina-3 glucósido se ha postulado como agente antioxidante y quimoprotector <sup>103</sup>.

Igual que los flavonoides predecesores pueden conjugarse por metilación, glucoronoconjugación, sulfatación, etc., durante su proceso de absorción, los ácidos fenólicos pueden conjugarse de manera similar. Sin embargo, pocos estudios han demostrado la presencia de estos metabolitos. Ya que existe una producción endógena de ácidos fenólicos por parte de la microflora intestinal y de los tejidos, conocer la cantidad de ácidos fenólicos en orina tras la ingesta de productos ricos en polifenoles es fundamental <sup>80</sup>.

#### *6.7.5.1. Metabolismo de los ácidos fenólicos en humanos*

Hay pocos estudios en humanos que estudien la metabolización de ácidos fenólicos tras la ingesta de arándano americano. En un estudio se midió la farmacocinética de los componentes fenólicos en humanos tras recibir zumo de arándano americano, salsa y fruta deshidratada. Solo 4 ácidos fenólicos incluyendo el ácido benzoico, 4-hidroxibenzoico, 3- metoxi-hidroxibenzoico y 4- hidroxicianimico fueron detectados en plasma en su forma intacta. Otros 6 ácidos fueron hallados tras hidrólisis. Su perfil en cuando a pico máximo etc. resultado muy variable. Todos los componentes estudiados aparecieron en orina con excepción de quercetina y miricetina que fueron indetectables tanto en plasma como en orina <sup>62</sup>. Otro estudio en humanos mostro que los componentes fenólicos del arándano rojo están biodisponibles y activos como antioxidantes <sup>104</sup>.

Un estudio en 2007, demostró la presencia de fenoles totales, quercetina, ácido hipúrico, salicilúrico e hidroxibenzoico en orina de voluntarios que habían tomado extracto seco de jarabe e arándano en capsulas durante 8 semanas <sup>75</sup>. En 2015 un estudio evidencio la elevación en la excreción de ácido hipúrico y de ácido cítrico en plasma tras el consumo de concentrado de zumo de arándano rojo al 57% <sup>105</sup>. Pedersen y cols. <sup>106</sup>, demostraron un pequeño, pero significativo, incremento de componente fenoles totales en plasma después de consumir zumo de arándano rojo comparado con zumo de arándano azul o placebo. A pesar de un mayor contenido de fenoles totales en el zumo de arándano azul comparado con el cóctel de arándano rojo (2589 versus 893ugGAE/mL), solo aquellos que tomaron arándano rojo mostraron un incremento en la concentración plasmática de componentes fenoles totales y una mayor tasa antioxidante.

#### *6.7.5.2. Metabolismo de los ácidos fenólicos en el modelo animal*

Estudios recientes muestran la importancia de medir tanto las formas intactas como los metabolitos secundarios de ácidos fenólicos tras la ingesta de alimentos ricos en polifenoles.

Tras ingesta de arándano rojo aumenta la excreción de ácido hipúrico, hidroxicinámico y 3-metoxi-4 hidroxibezoico. El ácido benzoico está presente en zumo de arándano rojo entero, otras preparaciones pueden carecer de él. Este ácido, que tiene un alto poder antibacteriano, es excretado en forma de ácido hipúrico. Además, el ácido hipúrico ha demostrado reducir la saturación urinaria de oxalato cálcico con un efecto potencial beneficioso sobre la formación de cálculos renales <sup>107</sup>.

### 6.7.6. Mecanismos de Antiadherencia del arándano americano

Los resultados *in vitro* con arándano rojo indican la existencia de múltiples mecanismos que contribuyen al efecto beneficioso de este fruto. La mayor parte de los estudios se han centrado en la probar capacidad antiadhesiva de sus compuestos.

Como ya se ha comentado, Se le atribuye a Sobota en 1984 el hecho de haber mencionado por primera vez la capacidad antibacteriana del arándano en relación con la inhibición de la adherencia antibacteriana. Sobota encontró una reducción del 75 al 60% en la antiadherencia bacteriana de 77 muestras de *E. coli* aisladas en pacientes con ITU. Esto sucedió secuencialmente tras 1 y 3 horas del consumo de 443.6 mL de zumo de arándano <sup>73</sup>. Tras sus ensayos otros muchos autores han sido capaces de probar esta acción antiadherente.

Las bacterias utilizan fimbrias y pili, estructuras de superficie proteica, para adherirse a otras superficies. Estas estructuras se consideran una característica heredada y las bacterias pueden expresar diferentes tipos de fimbrias en función de la condición de cultivo, manosa-sensible (fimbria tipo 1) y manosa-resistente (Fimbrias P). Ambos tipos de fimbrias, se regulan genéticamente en el cromosoma bacteriano y su expresión puede modificarse dependiendo de las características del medio de cultivo o del propio medio interno del huésped.

#### 6.7.6.1 Acción antiadherente de las PACs. Estudios *In vitro*, *Ex vivo* y estudios en animales

Zafiri en 1989 <sup>108</sup> y el grupo de la doctora Howell desde 1998 <sup>109</sup>, describieron muy precozmente la existencia de al menos 2 compuestos químicos presentes en el arándano americano que han sido asociados con la prevención de la adherencia bacteriana: la fructosa (un monosacárido) y las Proantocianidinas (PACs). La fructosa inhibe la adherencia de fimbrias manosa-sensibles a las células uroepiteliales. Este efecto viene dado por la afinidad de la fructosa a las fimbrias tipo 1 FimH adhesina, aunque esta afinidad es 15 veces menos fuerte que la afinidad por su ligando natural <sup>110</sup>. El incompleto metabolismo de la fructosa en el hígado podría dar lugar a la excreción de fructosa en orina, pero esto solo tendría significancia clínica tras la ingesta de altas cantidades de azúcares o en casos de diabetes <sup>111</sup>. Por tanto, es poco probable que la fructosa contenida en los preparados de arándano americano tenga una repercusión real *in vivo* sobre la adhesión antibacteriana.

La mayor parte, por tanto, de las investigaciones se centraron entonces en las propiedades de las PACs que contiene estos arándanos sobre la inhibición de la adherencia de las fimbrias P de *E. coli* al urotelio teniendo sin embargo un efecto limitado en las fimbrias tipo1 <sup>33-35, 38</sup>. Interesantemente, las PACs que como hemos dicho, tienen un fuerte efecto inhibitorio sobre estas adhesinas manosa resistentes de *E. coli* aislados en orina; tienen solo un efecto antiadherente moderado sobre *E. coli* aislado en heces <sup>35</sup>. La capacidad antiadherente del arándano ayudaría a prevenir la infección de orina de 2 modos, por tanto, la primera de forma directa previniendo la adherencia de *E. coli* a células epiteliales y secundariamente seleccionando cepas menos adherentes en las heces. Recientemente en 2012, Gupta y cols. <sup>112</sup> demostraron que los PACs extraídos del arándano rojo deshidratado prevenían la adherencia *in vitro* de ambos, *E. coli* sensible y multiresistente, a concentraciones de 10-50ug/mL/día.

Preparados purificados de PACs administrados a ratones durante 20 días también presentaban una actividad significativa de antiadherencia en orina al compararlos con orina de ratones que solo consumieron agua ( $p < 0.01$ )<sup>85</sup>

Las PACs parecen tener múltiples efectos sobre la prevención de la adherencia bacteriana, incluyendo cambios morfológicos en la bacteria como la variación de longitud y de densidad de las fimbrias, evitando su adhesión al urotelio<sup>18</sup>. En otro estudio en animales, se administró 1 mL de preparado puro o diluido al 25% de zumo de arándano rojo a ratas, 3 veces al día. Los autores encontraron disminuciones significativas en la hemaglutinación de *E. coli*, adherencia al urotelio y formación de biofilm tras la ingesta de ambos preparados. También se observó un aumento de destrucción de nematodos. Los resultados con el preparado puro fueron más potentes estadísticamente.

#### 6.7.6.2 Acción antiadherente de otros componentes fenólicos. Nuevas teorías.

El estudio de Gonzalez del Llano y cols.<sup>72</sup>, estudió una gran variedad de componentes fenólicos y sus metabolitos en relación con la inhibición de la adherencia bacteriana. En concreto, catecol, ácido benzoico, ácido vinílico, ácido feniacético, y ácido 3.4-dihidroxifenilacético; demostraron actividad antiadherente contra *E. coli*. Sin embargo, estos compuestos son metabolitos de los PACs así que los resultados no resultaron tan sorprendentes. Este grupo que realizó el estudio con cultivos de células uroepiteliales, concluyó que la relevancia de estos hallazgos, también debían ser establecidos en vivo. Los PACs solo resultaron inhibidores de la antiadherencia a concentraciones de 500uM.

Otro estudio muy actual de 2015<sup>19</sup>, investigó la capacidad antiadherente in vitro, in vivo y ex vivo de 2 extractos de arándano rojo, uno enriquecido en PACs y otro carente de ellos. 4 hombres recibieron 600mg de extracto de arándano rojo con 1.24% de PACs (Determinado con LC-MS y calculado como cianidina) y otro grupo recibió un preparado sin PACs (determinado por TCL) durante 7 días. Las muestras de orina se tomaron a los 0,3 y 7 días. Posteriormente se procedió al estudio de acción antiadherente mostrando efectos significativos a los 3 y 7 días en ambos grupos comparados con control (día 0). Estos hallazgos confirmaban estudios anteriores realizados in vitro (Feliciano y cols. 2013) que demostraron que altas concentraciones de PACs resultaban en una aglutinación de bacterias en la superficie de las células de la vejiga urinaria, mientras que el preparado de arándano rojo sin PACs también inhibían selectivamente la adhesión antibacteriana. Efectos que podrían ser sobre, por ejemplo, las fimbrias tipo 1 como ya decía y Zafiri anteriormente<sup>108</sup>. Los investigadores insinuaron tímidamente que estos efectos in vitro tras la ingesta humana del preparado rico en PACs serían debidos a la aglutinación “inducida por taninos”, una nueva teoría.

Aunque el preparado rico en PACs mostro actividad antiadherente frente *E. coli*, Rafsanjany<sup>19</sup> y su grupo postuló que diferentes metabolitos podían tener un papel importante en esta actividad del arándano rojo, como recientemente ha postulado Gonzalez del Llano<sup>61</sup>.

Por último, el grupo de Rafsanjany, observó que ninguno de los dos preparados inhibía la formación de biofilm. En contraste con otros estudios, ninguno de estos preparados tuvo efecto sobre las fimbrias tipo P<sup>19</sup>.

Otro estudio *in vitro* novedoso a este respecto <sup>113</sup>, tenía como objetivos evaluar la capacidad antimicrobiana del zumo de arándano y de 3 de sus extractos (fenoles hidrosolubles, componentes fenólicos apolares y antocianidinas) a un pH neutro sobre *E. coli* O157:H7 EDL 933, *S. typhimurium* SL1344, *L. monocytogenes* HPB 2812 1/2a, *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, ATCC 25922, *S. Aureus* ATCC 29213 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *E. coli* y secundariamente determinar el efecto antimicrobianos del zumo de arándano en la inhibición cinética de estas bacterias. El extracto número 2, compuesto por fenoles apolares incluyó principalmente flavonoles, flava-3-oles y proantocianidinas. La cantidad de fenoles del jarabe de arándano y de los 3 extractos se midieron en equivalentes de ácido gálico siendo respectivamente 19.583, 10.370, 16.490 y 16.050/g. En cuanto a la actividad antimicrobiana del zumo de arándano y de los diferentes extractos estudiados, el extracto rico en fenoles hidrosolubles fue el más eficiente en la inhibición de crecimiento bacteriano sin relación encontrada entre el tipo de Gram (positivo o negativo) y el grado de inhibición. *P. aeruginosa* y *E. coli* resultaron también susceptibles en cuanto a grado de crecimiento al compuesto rico en antocianidinas. Esto resultó novedoso ya que solo se conocía de dicha susceptibilidad por parte de *S. aureus*. En general *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurinum* fueron resistentes a la actividad antibacteriana de los extractos de arándanos ajustados a pH 7. Los resultados confirman por tanto que las propiedades antimicrobianas del arándano no están basadas en un bajo pH. Los autores concluyen que a pesar de que las proantocianidinas se hayan postulado como las principales responsables del efecto antiadherente y por tanto protector frente a agentes patógenos, de acuerdo con estos resultados, los componentes hidrosolubles tales como ácidos fenólicos de bajo peso molecular, flavonoides como las antocianidinas y flavonoles fueron los que presentaron mejores propiedades antibacterianas. *Enterococcus* resistente a vancomicina y *L. monocytogenes* fueron totalmente inactivados frente al zumo de arándano puro neutralizado. Los autores sugieren que en vista de los hallazgos el arándano debería ser tenido en cuenta como ingrediente natural en la industria alimenticia para la prevención de infecciones transmitidas por alimentos.

Otros estudios postulan que la interferencia del arándano modificando propiedades físicas de la bacteria, por ejemplo, su hidrofobicidad, sería también parte del efecto biológico del mismo. De esta manera se impediría su aproximación a la superficie y por tanto su adherencia.

Un último mecanismo que se ha intentado relacionar con los PACs contenidos en el arándano americano, es la inhibición de la motilidad del flagelo principal de *E. coli*, se postula que los PACs inhibirían la expresión del gen *fliC* y además modificarían la movilidad de los flagelos ya expresados <sup>114</sup>.

Los autores indican que nuevos estudios son necesarios para llegar al fondo de la cuestión sobre el verdadero papel de arándano rojo y sus componentes sobre la salud del tracto urinario. Todos coinciden en que puede que este efecto sea multifactorial y complejo. Las cuestiones más importantes que quedan sin responder son las propiedades antiadhesivas *in vivo*, limitadas por la falta de biodisponibilidad de PACs que son polímeros de gran tamaño. Se necesita conocer mejor el metabolismo de los PACs en el organismo para entender la presencia en orina de diferentes tamaños y concentraciones de PACs. Puede que la respuesta de antiadherencia venga determinada indirectamente desde el intestino a través de la fijación de PACs de mayor tamaño.

También puede como se ha comentado anteriormente que esta fijación de PACs a *E. coli* se da en el tracto gastrointestinal previniendo así de esta forma la posterior migración ascendente a través del tracto urinario. Por último también se ha demostrado la inhibición de la invasión de *E. coli* a las células del epitelio digestivo. Reduciendo el reservorio de *E. coli* uro patógeno contribuiría con su acción innegablemente <sup>51</sup>. Otros estudios realizados *ex vivo* y pendientes de publicación aportaran valor a lo que conocemos sobre propiedades antiadherentes en esta materia.

#### 6.7.7 Ensayos clínicos en población humana

En el caso de la utilización de jarabe de arándano americano para prevenir ITU recurrente, encontramos en la literatura un buen número de ensayos clínicos que sugieren que este producto aporta un beneficio clínico en la prevención de ITU en ciertas poblaciones. El grupo poblacional que parece más favorecido es el de mujeres sexualmente activas con historia de ITU recurrente. En mujeres ancianas la bacteriuria asintomática pareció también reducida de forma considerable. <sup>10, 115</sup>.

En estos grupos en los que la profilaxis con jarabe de arándano aporta más beneficio, diferentes ensayos muestran hasta un 50% de riesgo de reinfección. Desde el punto de vista clínico este resultado podría considerarse modesto si se considera la carga acompañante de toma a diario de este compuesto. No menos significativo es el inconveniente de la cantidad de zumo que es necesario tomar para probar la biodisponibilidad continúa precisando de una posología de hasta 2-3 tomas diarias para asegurar su eficacia. Todo ello podría repercutir en falta de adherencia al tratamiento y por tanto reducción de la tasa de eficacia.

Además, diversas revisiones del tema sugieren que los resultados no son concluyentes ya que muchos estudios sufrieron de varias limitaciones como falta de aleatorización, ciego inapropiado, escasa muestra, escasa duración de los ensayos, bajas en el seguimiento etc... Probablemente la limitación más consistente hallada es la falta de uniformidad de la intervención, incluyendo la particular preparación del producto evaluado (zumo, coctel, cápsulas/píldoras), concentración, dosis, duración de la intervención. Por ello la mayoría de revisiones y metanálisis concluyen que más ensayos apropiadamente diseñados son necesarios para aclarar estos puntos <sup>10</sup>.

Sería también razonable proponer estudios en el futuro que revisen la aceptación y adherencia al tratamiento. Algunos autores sugieren que el sabor y la cantidad de calorías del coctel de arándano pueden ser aceptable para la mayoría de los pacientes, especialmente a largo plazo. Las cápsulas de extracto de arándano podrían ser una buena alternativa en este caso. El coste económico sería otra complicación asociada a la adherencia al tratamiento. Stother, concluyó tras un ensayo simple que las píldoras sería la opción mejor desde el punto de vista coste-efectivo <sup>116</sup>.

A pesar de esta problemática, el potencial efecto beneficioso de un producto natural e inocuo como el arándano en un problema de salud de tan importante magnitud sigue siendo de gran interés científico y de salud pública. Por ello desde 2002, el Centro Nacional de Medicina Alternativa y Complementaria perteneciente al Instituto Nacional de Salud Americano, dedica parte de sus fondos a la investigación en esta materia para promover la salud del tracto urinario. El aumento de resistencia antibióticos también

anima a continuar investigando sobre la utilidad de los productos derivados del arándano.

El primer ensayo clínico conocido evaluando el efecto del arándano sobre patología del tracto urinario fue publicado en 1966 por Papas <sup>117</sup>. Una muestra de 60 pacientes con bacteriuria, recibieron 480mL de zumo durante 3 semanas. Un 53% del total mostró una respuesta positiva y un 20% adicional una modesta mejora. En casi todos ellos la bacteriuria reaparecía tras 6 semanas sin tratamiento.

Tras este estudio más de una docena de estudios similares se han llevado a cabo con el objetivo de probar la utilidad de los productos del arándano en la prevención de síntomas urinarios. En algunos estudios el parámetro estudiado era la aparición de ITU. En otros de ellos, la presencia de bacteriuria era el criterio para finalizar el seguimiento. Estos ensayos tuvieron como poblaciones diana diferentes grupos, incluyendo mujeres jóvenes sexualmente activas, mujeres ancianas y niños con diferentes patologías.

Las infecciones del tracto urinario son las infecciones más comunes a nivel comunitario en Estados Unidos <sup>118</sup>. Aunque ambos sexos pueden desarrollar infección urinaria, las mujeres son más propensas a este tipo de patología. Se estima que más del 50% de las mujeres experimentarán una infección urinaria en su vida y del 20-30% de estas mujeres tendrán 2 o más infecciones recurrentes. Otras poblaciones de riesgo son los niños, las mujeres embarazadas, los ancianos, pacientes con patología de medula espinal, pacientes portadores de catéteres, y aquellos con patología crónica y/o enfermedades inmunodepresoras como diabetes o VIH/SIDA.

Foxman en 2015 demostró que la administración del equivalente a 2 onzas (56 gramos) de arándano rojo diario en forma de capsula reducía la incidencia de infección de orina en pacientes postoperatorios cateterizados en un 50% <sup>119</sup>.

Una reciente revisión de ensayos clínicos y evaluación del ratio eficacia/seguridad en la prevención de infección urinaria apoya el uso de arándano rojo tanto en niños como mujeres de mediana edad <sup>115</sup>. Sin embargo, la evidencia en otros grupos de población permanece incierta. Diferentes resultados en similares metaanálisis, factores confusores, la falta de estandarización de medida en PACs se consideran responsables de la falta de conclusiones. Si resulta de gran interés, sin embargo, que en la revisión Cochrane de Japson en 2012, cuyos resultados eran desalentadores, el uso de arándano Americano mostrase una eficacia similar al de bajas dosis de antibiótico <sup>10</sup>. Esta similitud debería ser considerada de por sí como una gran ventaja.

De hecho, un estudio realizado por Beerepoot en 2011, mostró que la profilaxis antibiótica daba lugar a resistencias a Trimetoprim-sulfametoxazol hasta en un 86.3% de *E. coli* en heces y un 90.5% en bacteriuria asintomática tras un mes de tratamiento comparado con un 23.7% y 28.1% respectivamente en tratados con arándano rojo. El mismo grupo también mostró incrementadas resistencias a trimetoprim, amoxicilina y ciprofloxacino.

Las resistencias antibióticas son hoy en día cada vez más preocupantes para las autoridades sanitarias. La Organización Mundial de la Salud en 2014 mostró que la resistencia a quinolonas está cada vez más extendida mundialmente y desde 1980 hasta la actualidad, la resistencia ha aumentado de 0-100% en muchas partes de mundo <sup>120</sup>.

Todo esto postula al arándano americano como un potencial agente de máximo valor terapéutico.

#### 6.7.7.1 Ensayos clínicos en población anciana

En el grupo de población formado por mujeres ancianas, en general se utilizó la aparición de bacteriuria ( $>10^5$ UFC) y piuria (presencia de leucocitos en orina) como criterio limitante. En 1994 se publicó un estudio en este tipo de población en el que se tomaron una muestra de 153 mujeres ancianas y las observaron durante 6 meses <sup>121</sup>. Tomaron respectivamente coctel de zumo de arándano o placebo. Tras el tratamiento, la presencia de bacteriuria y piuria se redujo hasta un 50% en el grupo que tomó el producto con arándano rojo. Similares resultados obtuvieron también Haverkorn y Mendinger <sup>122</sup>. En general la bacteriuria no precisa tratamiento antibiótico pero la necesidad de estos se vió reducida en los grupos que consumieron derivados de arándanos americanos. Varios estudios de diferente calidad al final de los 90 mostraron similares resultados. El más destacable, un estudio retrospectivo con 538 ancianos (77% mujeres y 23% hombres), comparó los resultados en cuanto a infección de orina durante un periodo de 20 meses pre-intervención y 8 meses durante la intervención (jarabe/capsulas con arándano rojo). Encontraron una reducción significativa de las infecciones de orina de 545 episodios a 164. ( $p=0.008$ ) <sup>123</sup>. El mismo grupo realizó también un estudio longitudinal con la misma población en la que solo pudieron demostrar una tendencia a la reducción de la aparición de ITU.

En 2012, un ensayo a doble ciego aleatorizado intentó identificar la dosis adecuada para la reducción de bacteriuria y piuria en población anciana <sup>124</sup>. Se establecieron 4 grupos que recibieron 0, 36, 27 o 108mg de PACS determinados con DMAC. Se analizó piuria y bacteriuria a los 7, 14, 21 y 28 días. En los que consumieron alguna dosis de arándano americano se pudo demostrar una reducción dosis-dependiente sobre ambos efectos, especialmente en mujeres. En arándano americano sólo previno la bacteriuria positiva a *E. coli*, no demostrando efecto sobre otros patógenos. Los grupos que recibieron 72 o 108 mg de PACs obtuvieron resultados similares. Otro estudio aleatorizado a doble ciego multicéntrico realizado en Holanda, consiguió reunir una muestra de 928 sujetos (caracterización y dosis administrada 2 veces al día durante 12 meses, sin determinar). Se establecieron 2 grupos, de bajo y alto riesgo de desarrollar ITU. El grupo de alto riesgo incluía pacientes con catéter urinario de larga duración, diabetes mellitus y más de un episodio de ITU el año anterior. Comparado con placebo, se obtuvo un 26% de reducción de incidencia de ITU en el grupo de alto riesgo. No se pudo, sin embargo, demostrar beneficio en el grupo considerado de alto riesgo <sup>125</sup>. Otro estudio reciente a destacar en 2015, administró de forma profiláctica 120 mg diarios de arándano rojo (sin caracterizar) a una población frente a un grupo control que recibió placebo. Se obtuvo una reducción del 38.75% al 12.9% en aparición de ITU en el grupo de pacientes cateterizados tratados con arándano rojo <sup>126</sup>.

#### 6.7.7.2 Ensayos clínicos en mujeres con ITU recurrente.

Hasta la fecha, se han realizado 5 ensayos clínicos para determinar la eficacia del arándano americano en la prevención de ITU recurrente en mujeres. 3 de estos ensayos tuvieron un resultado positivo <sup>87, 127, 128</sup>; mientras que los otros 2 estudios no mostraron un efecto significativo <sup>129, 130</sup>. Sólo 3 de ellos fueron ensayos aleatorizados a doble ciego, controlados con placebo <sup>128-130</sup>. Ninguno de ellos estuvo calculado con

suficiente poder estadístico. Todos los estudios reclutaron mujeres sanas de entre 18 y 72 años de edad con antecedente de al menos 1 ITU el año anterior. Las dosis y preparados de arándano rojo variaron enormemente. Walker y cols.<sup>128</sup>, administró 400 mg de preparados de arándano americano tomado en una única dosis durante 3 meses. Kontiokari<sup>87</sup>, utilizó un preparado de arándano rojo/arándano azul (Arándano americano/Lingonberry). Un segundo grupo recibió una bebida con lactobacillus y un tercer grupo actuó como control. Tras 6 meses de seguimiento, las mujeres que recibieron el preparado con arándano rojo, presentaron un 56% menos de ITU que el grupo control. Esta tendencia también persistió a los 12 meses.

El estudio de Stother<sup>127</sup> tuvo 2 diferentes ramas de tratamiento con arándano americano; zumo y cápsulas. El grupo asignado a consumir zumo, tomo 250mL de zumo puro de arándano rojo sin edulcorante 3 veces al día mientras que el otro grupo tomó 2 cápsulas diarias. El seguimiento se hizo durante 12 meses. Las participantes en el estudio de Barbosa-Cesnick<sup>129</sup> tomaron 240 mL de bebida de arándano una vez al día durante 6 meses. Finalmente, el grupo de Stapleton en 2012<sup>130</sup> recibió el mismo zumo de arándano rojo, 120 o 240 mL diarios durante 6 meses.

Un estudio anterior de Papas y cols.<sup>117</sup>, trató a una población mixta de hombre y mujeres con antecedentes de ITU. Tras demostrar un 53% de reducción de aparición de infección tras la ingesta de 480 mL de zumo de cóctel de arándano rojo, también analizaron la reaparición de bacteriuria una vez finalizado el tratamiento. Tras 6 semanas, casi todos los sujetos volvían a presentar bacteriuria en orina.

Todos los estudios citados anteriormente aportaban concentración total de PACs, pero obtenidas con diferentes métodos. Por tanto, los resultados resultan variados e inconsistentes.

Un estudio reciente en el que mujeres con ITU recurrente recibieron 42g de arándanos rojos deshidratados al día durante 2 semanas que fueron observadas durante 6 meses mostrando una reducción del 24-1.1% de aparición de ITU cuando fueron comparados con un grupo control de un previo ensayo clínico<sup>69</sup>. Además, las mujeres en el grupo que consumió arándano rojo, tuvieron una reducción significativa en cultivos periféricos rectales positivos a *E. coli*. También en 2013, en un estudio de Takahashi y cols.<sup>131</sup> se administró 125 mL al día de zumo de arándano rojo a un grupo de mujeres de entre 20 y 79 años de edad con ITUS recurrentes. Un segundo grupo control recibió placebo. En el subgrupo de mujeres mayores de 50 años, hubo una reducción significativa en la aparición de nuevos episodios de ITU. En otro estudio se encontró mejora en la sintomatología y reducción de ITU en 2 grupos de estudio que recibieron 1000 mg y 500 mg de un concentrado en polvo de arándano rojo, comparado con la evaluación inicial en un ensayo clínico aleatorizado con 60 mujeres entre 18 y 40 años<sup>132</sup>.

Otro ensayo reciente aleatorizado a doble ciego con 164 mujeres con antecedentes de ITU en los 12 meses previos, recibieron 500 mg de polvo procedente del fruto completo de arándano rojo (piel, semillas y pulpa) aportando un total de 2.8 mg de PACs diarias usando el DMAC A2 standard, durante 6 meses. Reclutaron 78 mujeres en el grupo experimental y 86 mujeres en un grupo placebo. Similar que otros múltiples estudios, los autores encontraron un descenso significativo en ITU recurrente en el grupo que tomo el preparado de arándano rojo con respecto al grupo placebo

(10.8% versus 25.8%). Los autores también reportaron que no se hallaron proantocianidinas en plasma u orina, y que no hubo diferencias significativas en fracciones fenólicas urinarias entre grupos. Este grupo hipotetizó que la concentración de PACs no estaría relacionada con este efecto y que otros componentes como el ácido ursólico podría jugar un papel <sup>133</sup>. Este grupo ha sido el primero en demostrar eficacia de todo el fruto completo.

La bacteriuria asintomática es definida como  $>10^5$  UFC/mL de bacterias uropatogenicas en orina, sin los tradicionales síntomas de ITU. La presencia de ésta en mujeres embarazadas ha sido siempre preocupante por su asociación con parto prematuro y bajo peso al nacimiento <sup>134</sup>. La bacteriuria no tratada durante el embarazo puede fácilmente progresar a ITU y particularmente a pielonefritis que supondría un alto riesgo para ambos la madre y el feto <sup>135</sup>.

#### 6.7.7.3 Ensayos Clínicos en Mujeres Embarazadas.

El primer ensayo clínico realizado en población embarazada para demostrar la eficacia del arándano rojo en la reducción de bacteriuria, ITU o riesgos neonatales, no encontró resultados significativos. El estudio de Wing y cols. <sup>136</sup>, no tuvo la suficiente potencia estadística, pero mostró una importante tendencia a la reducción de bacteriuria asintomática y aparición de ITU en el grupo experimental que tomó el preparado de arándano rojo 2 veces al día. Los otros grupos tomaron placebo o el preparado en una única dosis diaria. Los autores concluyeron que más estudios serían necesarios para aclarar el significado de esta tendencia.

Lo que sí parece claro, como muestra un estudio poblacional con más de 100.000 embarazos y partos en Noruega entre 1998-2008 <sup>137</sup>, es que la ingesta de derivados de arándano americano sería segura para la madre y el neonato. Esta revisión de casos incluyó resultados como muerte neonatal, parto prematuro, bajo peso al nacer, APGAR bajo al nacer e infecciones neonatales. Si se mencionó en esta revisión, una posible asociación entre ingesta de arándano americano y sangrado vaginal durante el embarazo pasado la semana 17. A este estudio, que no caracterizaba el producto ni concretaba las dosis administradas, le siguieron otros con resultados contrarios y una amplia revisión en 2011 que rechazaba dicha asociación <sup>136 138</sup>.

#### 6.7.7.4 Infección de orina recurrente en la Infancia

En población infantil encontramos el mismo problema que en ensayos realizados en otros grupos de edad; diferentes preparados en diferentes dosis para una población que varía mucho en masa corporal según la edad. El grupo de Ferrara <sup>139</sup> utilizó 7.5g de concentrado de arandano americano mas 1.7g de arandano azul diluidos en 50mL de agua y administrados diariamente durante 6 meses. El estudio de Salo en 2012<sup>140</sup> usó un jarabe comercial de zumo de arandano con 8.2g de concentrado por cada 200mL de agua a una dosis de 5mL/kg de peso durante 6 meses. Otro estudio, empleó un zumo de arandano rojo que contenía un 37% de PACs (la cuantificación absoluta de PACs no fue especificada) <sup>141</sup>.

En cuanto a los resultados, el estudio de Afshar demostró que el jarabe de arandano fue en eficaz con una reducción del 65% en el riesgo de ITU <sup>141</sup>. El de Ferrara en 2009 obtuvo resultados positivos en relación a la recurrencia de nuevos episodios. El

de Salo en 2012 no obtuvo significación estadística para la prevención de nuevos episodios de ITU recurrente, sin embargo, sí redujo el número de episodios en total y el número de días con antibióticos <sup>142</sup>.

El meta análisis recientemente publicado basado en población infantil concluye que los productos de arándano rojo son efectivos en niños sanos y al menos equivalentes en niños con anomalías del trato urogenital. Las recomendaciones en cuanto a dosis y posología persisten confusas por la amplia variabilidad de productos empleados en los ensayos incluidos en el análisis <sup>143</sup>.

#### *6.7.7.5. Arándano americano y salud del tracto urinario en pacientes con vejiga neurogénica y lesiones de medula espinal*

El diagnóstico de vejiga neurogénica es el resultado de la falta de control nervioso sobre la retención y vaciado de la vejiga. Los ensayos clínicos realizados en población con este problema médico aportan datos variados. Un ensayo a doble ciego, controlado con placebo, no encontró reducción significativa en la presencia de bacteriuria en niños de entre 2 y 18 años de edad con vejiga neurogénica tras el consumo de 60 mL al día de zumo de concentrado de arándano americano <sup>144</sup>. Los autores concluyeron que la disfunción del vaciado de la vejiga añadida a la vejiga neurogénica podía estar influyendo en el resultado. En 1995, en el ensayo de Foda y cols. <sup>145</sup>, el consumo de zumo de arándano americano tampoco resultó efectivo en una población infantil con vejiga neurogénica. Los 21 participantes consumieron 15 mL/kg/día de zumo de coctel de arándano rojo o una cantidad equivalente de agua durante 6 meses sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Sin embargo, en un estudio no controlado, se evidenció la disminución de células rojas en orina tras la ingesta de 540 mL la primera semana y 660 mL la segunda semana en una población de 17 niños con vejiga neuropática <sup>146</sup>.

Tampoco está clara la efectividad de la suplementación con arándano americana en la prevención de ITU o reducción de bacteriuria sintomática en población con lesiones de medula espinal. 2 ensayos no encontraron beneficio sobre la reducción de bacteriuria o piuria <sup>147, 148</sup>. Sin embargo, un ensayo aleatorizado, a doble ciego, controlado con placebo con una población de 47 sujetos con lesiones medulares y vejiga neurogénica encontró una reducción significativa de síntomas y un 60% de reducción en el número de ITUs y de pacientes con ITU en un periodo de 6 meses en sujetos que recibieron 500mg al día de arándano americano en comprimidos comparados con aquellos que tomaron placebo. Los sujetos que recibieron extracto de arándano, no experimentaron una reducción del pH urinario. El filtrado glomerular también fue analizado en este ensayo. Los pacientes con un filtrado glomerular por encima de 75 mL/min vieron reducido casi en su totalidad el riesgo de ITU. Los autores hipotizaron que la combinación de una buena filtración glomerular urinaria junto con la inhibición de la adhesión bacteriana intervendrían juntas en la prevención de formación de biofilm y la eliminación de patógenos bacterianos <sup>149</sup>. La formación de biofilm se redujo de forma significativa en un estudio con una muestra de 15 pacientes con lesiones de medula espinal que consumieron 3 vasos de zumo de arándano en los días 7 y 15 del estudio comparados con los que sólo tomaron agua. La reducción de formación de biofilm en el grupo experimental se refirió tanto gram-positivos como a gram-negativos <sup>150</sup>. Estos hallazgos sugieren que los diferentes factores de riesgo o poblaciones estudiadas pueden

contribuir a la variabilidad de resultados en los ensayos que estudian la profilaxis con arándano americano. Sin embargo, e independientemente de estos resultados, el enfoque nutricional de Blumberg en 2013<sup>36</sup>; deja claro que cualquier beneficio de esta profilaxis es positiva comparado con el uso de profilaxis antibiótica.

#### 6.7.7.6 Otros efectos sobre el tracto urinario

La administración de cápsulas con 36mg de PAC medidos con DMAC A2 standard, redujeron de forma significativa la bacteriuria en pacientes con reconstrucción de vejiga mediante enterocitoplastia<sup>151</sup>. También se ha comunicado la reducción de formación de moco en este tipo de pacientes, que podría contribuir a la obstrucción de catéteres urinarios<sup>152</sup>.

El consumo de arándano americano parece también contribuir al cambio en el olor de la orina. *E.coli* alcaliniza y fermenta la orina con eliminación de amonio. El arándano americano con su efecto reductor de pH (de 6.6 a 5.8) retardaría esta acción bacteriana y por tanto reduciría el olor a amonio.

Hay controversia en la literatura sobre el consumo de derivados del arándano rojo y la formación de cálculos renales. Algunos textos han reportado un incremento ligero en la formación de cálculos<sup>153</sup>, mientras que otros autores comentan justo el efecto contrario<sup>154</sup>. La mayoría de estas opiniones están basadas en la medición de biomarcadores relacionados con la formación lítica y no con resultados clínicos en la población estudiada. Los biomarcadores utilizados incluyen la excreción de calcio en orina con resultados muy variados en la literatura (incremento, reducción o no variación de la calciuria). La excreción de oxalatos también parece incrementada o reducida según el autor. Sucede algo similar con la excreción de citrato en orina tras el consumo de arándano rojo<sup>153</sup>. Estas variaciones se deban muy probablemente a los diferentes preparados utilizados en los diferentes estudios.

En cuanto a los cálculos de oxalato cálcico, la alarma surgió en un estudio en el que el consumo de zumo de arándano Americano era muy alto, 1L/día<sup>146</sup>. En un estudio antiguo, el consumo de 2.4L/día de zumo de arándano rojo reducía significativamente el calcio ionizado en orina asociado con la producción de cálculos con calcio en un 50%<sup>154</sup>. Siguiendo con la controversia, Brinkley afirmó que el zumo de arándano americano contenía poco o prácticamente ningún contenido de oxalato y que era seguro para pacientes con litiasis renal<sup>155</sup>. Sin embargo, en el texto ya citado de Gettman<sup>153</sup> se refería que el consumo de arándanos aumenta la formación de cálculos de oxalato cálcico y ácido úrico mientras que reduce la formación de calculos de brushita. Ambos autores concluían, sin embargo, que probablemente el consumo de zumo de arándano no era realmente significativo en la producción de cálculos renales.

En 2001, Terris y cols.<sup>156</sup>, demostraron un potencial incremento en la formación cálculos de oxalato basado en la excreción de calcio, sodio y fosfatos, iones litogénicos; en la orina de voluntarios sanos, aunque también se observó la excreción aumentada de magnesio, potasio, iones antilitogénicos. También encontramos diferentes resultados en cuanto a la formación de cálculos de estruvita. Las bacterias en orina facilitan la alcalinización urinaria y por tanto la formación de cálculos de estruvita. En un estudio realizado en 1968, 53 pacientes consumieron 946mL/día de zumo de arándano durante 9

años. Un 60% de esta población mejoró sus síntomas sin producción de cálculos renales, un 32% no presentaron incremento en el tamaño de los cálculos y un 8% presento nuevas litiasis o incremento en el tamaño de las ya existentes <sup>157</sup>. Este efecto se atribuyó a la acidificación que el arándano americano produce sobre la orina y que podría estar asociada con la disminución de formación de litiasis secundarias a la infección de orina.

## **6.8. Otros efectos del arándano americano sobre la salud**

Los efectos más conocidos y estudiados del arándano americano además de sobre el tracto urinario, son los ejercidos sobre el aparato cardiovascular, digestivo y sobre la cavidad oral.

### *6.8.1. Arándano rojo y salud cardiovascular*

Una amplia variedad de posibles mecanismos podría contribuir a los efectos beneficiosos del arándano americano sobre la salud cardiovascular incluyendo efectos sobre la dislipemia, diabetes, hipertensión, inflamación, estrés oxidativo, disfunción endotelial, rigidez arterial y función plaquetaria.

#### *6.8.1.1. Dislipemia*

Estudios en animales y humanos sugieren que el consumo de zumo de arándano rojo y sus antocianidinas disminuye el LDL-colesterol e incrementa el HDL-colesterol. Ha mostrado estos efectos sobre pacientes con comorbilidades adyacentes como diabetes u obesidad. El mecanismo de acción no es completamente conocido. Estudios con cultivos celulares de hepatocitos mostraron que la presencia de extracto de arándano aumenta la expresión de receptores de superficie a LDL-colesterol por los que éste reduciría su nivel en plasma. Un ensayo clínico en población con dislipemia sugirió en las antocianinas inhiben la proteína transportadora de esteres de colesterol (CETP) lo cual daría como resultado un incremento de HDL-C. Actualmente es controvertido si la inhibición de esta proteína tiene o no un impacto sobre el riesgo cardiovascular.

#### *6.8.1.2. Diabetes e hipertensión*

Los datos actuales apoyan que existe un efecto directo entre el extracto de arándano rojo y la hipertensión. Se ha comprobado en ratas anestesiadas que recibieron una infusión intravenosa de un producto diluido de zumo de arándano con efecto reductor de tensión arterial a través de la vasodilatación inducida o dependiente de óxido nítrico <sup>158</sup>. También ha mostrado funcionar la prevención de hipertensión en hámsters con alta ingesta de grasas en la dieta. Un estudio in vitro sugirió que el extracto de arándano rojo inhibiría la enzima convertidora de la angiotensina lo cual tendría un impacto sobre la presión arterial <sup>159</sup>. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha podido demostrar reducción en presión arterial en pacientes diabetes con problemas cardiovasculares.

Si se ha demostrado efecto del extracto de arándano rojo o derivados flavonoles del mismo sobre la sensibilidad a la insulina reduciendo la glucosa en plasma en estudio in vitro con modelos de DM. Sin embargo, de nuevos los ensayos clínicos en humanos han fallado hasta la fecha en corroborar dicho efecto en vivo.

#### 6.8.1.3. Estrés oxidativo

El aumento del estrés oxidativo y la modificación oxidativa de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos contribuyen en la patogénesis de arteroesclerosis y otras formas de daño cardiovascular. Hay una amplia evidencia en la literatura que muestra la acción antioxidante *in vitro* y *in vivo* en modelos experimentales del arándano rojo y sus constituyentes bioactivos. El mecanismo no queda completamente claro y su acción sobre especies reactivas del oxígeno es controvertida. Ensayos clínicos han mostrado un aumento en la capacidad antioxidante plasmática con reducción de LDL-c en su forma oxidada en sujetos sanos tanto hombres como mujeres, así como en población sedentaria y mujeres con síndrome metabólico que tomaron zumo de arándano rojo.<sup>92, 160</sup>

Sin embargo, permanece incierto cual es el beneficio de los principios bioactivos del arándano rojo en la disminución del daño oxidativo en lípidos o ácidos nucleicos, reflejados a través de biomarcadores como la F2-isoprostanos o 8-hydroxideoxiguanosina.

#### 6.8.1.4. Inflamación

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria, por tanto, hay un creciente interés en las últimas décadas para hallar agentes con propiedades antiinflamatorias con acción sobre biomarcadores como PCR y otras citoquinas inflamatorias. Entre estos agentes, se ha estudiado el papel del arándano rojo. Varios estudios *in vitro* sugieren que los componentes bioactivos del arándano americano suprimen la activación de macrófagos y células T expuestas a estímulos proinflamatorios. Este mismo efecto se cree responsable de los efectos favorables del zumo de arándano americano contra la enfermedad periodontal. Las antocianidinas tienen un efecto similar sobre células endoteliales de la microvasculatura. La mayor parte de la literatura coincide sobre este efecto antiinflamatorio con disminución de biomarcadores en ensayos clínicos, aunque hay otros que difieren. Las diferencias poblaciones y medicación de base a la que están expuestos este tipo de pacientes pueden tener que ver con los resultados contradictorios obtenidos.

#### 6.8.1.5. Disfunción endotelial:

Estudios experimentales han mostrado efecto favorable de los componentes bioactivos del arándano rojo sobre la función endotelial y la biodisponibilidad del Óxido nítrico (NO), un importante agente vasodilatador. Como mecanismo de acción se postulan la capacidad como agente antioxidante y una modificación específica en la fosforilación de la NO sintetasa que daría lugar a un aumento en la producción de NO entre otras.

En cuanto a ensayos clínicos, Zhu y cols. 2011<sup>161</sup>, observaron una mejora rápida en la dilatación dependiente de endotelio 1-2 horas tras la ingesta de zumo de arándano en pacientes con hipercolesterolemia. También en ese mismo año, otro grupo contradujo dichos resultados<sup>162</sup> pero en este caso se midió el efecto tras 12 horas de la ingesta de zumo de arándano rojo, momento en el que los niveles en sangre se presuponen bajos.

#### 6.8.1.6. Rigidez arterial

La rigidez de la aorta central es un parámetro de creciente importancia y significado de la función vascular en relación con la hipertensión arterial y fallo cardiaco. Este parámetro se mide fundamentalmente a través de la velocidad de onda de pulso carótideo y femoral. Estudios clínicos ya citados como los de Dohadwala y cols.<sup>162</sup> y Ruel y cols.<sup>160</sup>, estudiaron el impacto de la ingesta de zumo de arándano americano sobre diferentes factores de riesgo cardiovasculares incluyendo la rigidez arterial con resultados contradictorios, aunque los más relevantes y prometedores fueron además medidos en PWV (velocidad de pulso de onda), que es el que se relaciona más estrechamente con función cardiovascular.

#### 6.8.1.7. Función plaquetaria

La importancia de la agregación plaquetaria en los accidentes cardiovasculares agudos, como la angina inestable y el infarto agudo de miocardio, es bien conocido. Agentes antiagregantes plaquetarios como la aspirina y el clopidogrel reducen el riesgo de enfermedad cardiovascular. Se sabe del efecto de otros polifenoles como el té y el zumo de uva sobre la agregación plaquetaria, pero hasta la fecha no hay ensayos clínicos empleando derivados del arándano americano. Yang y cols. 2012<sup>163</sup> mostraron en un ensayo en animales que una antocianidina presente en el arándano rojo, delphinidin-3-glucosido, inhibía significativamente la activación plaquetaria y la trombosis en ratones con lesiones carotídeas.

#### 6.8.2. Otras acciones sobre el organismo

El arándano rojo también ha demostrado efecto anticancerígeno, antitumoral, protector anticaries a través de la reducción de *S. mutans* en saliva. Existen pruebas de que las PAC del arándano americano pueden impedir la adherencia de determinadas cadenas de bacterias responsables de la placa dental y la gingivitis en la cavidad oral<sup>164</sup>.

Existen también investigaciones preliminares que dan a entender que las PAC del arándano americano pueden impedir la adherencia de *Helicobacter pylori* a las células epiteliales del estómago. *H. pylori* provoca más del 90% de las úlceras duodenales y hasta un 80% de úlceras gástricas<sup>165, 166</sup>.



## **7. JUSTIFICATION AND OBJECTIVES**



## OBJECTIVES

---

There is at present a controversy when justifying antibiotic prophylaxis in children with recurrent urinary tract infections and vesicoureteral reflux. Alternatively, clinical trials in adults have been carried out where the efficacy of cranberry extract prophylaxis in patients with recurrent urinary tract infection is evaluated. In these tests after 12 months of follow-up a decrease of 20% in the prevalence of urinary tract infection was observed within the group of patients treated cranberry extract (95% CI: 3-36%).

The cranberry contains at least two components that have been implicated in its well studied antiadhesion effect. Proanthocyanidins (main active ingredient) and fructose, both known to prevent bacteria from fixing to the epithelium of the urinary tract, being instead passively eliminated with urination. Previous studies by our group<sup>79</sup><sup>167</sup> have identified over 30 polyphenolic fractions in cranberry extract and the different in vitro activity of each of these fractions<sup>168</sup><sup>169</sup> has been established.

Prior to the completion of this study, polyphenolic components excretion in urine from healthy volunteers was analysed after ingestion of concentrations three times higher than those planned in our clinical trial. Cranberry procyanidins and anthocyanidins were not found in human urine by the proposed methodology. Similar results were found in rat urine after 5 days of repeated treatment with procyanidin dimer B3<sup>170</sup>, and very low amounts were found after a single treatment of grape seed procyanidins B1, B2 and B3 to rats<sup>171</sup>. The metabolism of procyanidins is controversial and a recent study suggests further degradation by the gut microflora before absorption, and therefore subsequent microbial metabolites could be active forms<sup>172</sup>. Notably, human urine treated *ex vivo* with dried cranberry juice had an inhibitory effect on the adhesion of bacteria related to UTI, although procyanidins were not detected<sup>75</sup>. In a previous work, petunidin was the only anthocyanidin found in cranberry syrup and at a low concentration<sup>79</sup>. This fact together with the instability of this class of compounds and their metabolites<sup>173</sup> hamper their detection in biological samples, such as in urine.

In view of the above facts and given the state of current knowledge on the subject, we considered the following assumptions:

1. The cranberry extract could have anti-adherent urinary activity resulting from anthocyanidins and procyanidins metabolites, especially phenolic acids.
2. If cranberry extract proves to be useful in children, and with the current methodology we cannot determine measurable urine levels of procyanidins and

anthocyanidins, metabolites of these molecules should be involved in the anti-adherent activity.

3. In the experimental model of clinical trial, the formulation of cranberry extract in glucose syrup suspension with an indication on the pediatric population should be effective.

With these assumptions, we consider that the overall objective of this study is the assessment of the efficacy and safety of cranberry extract in the prophylaxis of urinary tract infection within the children population. In our experimental model, we follow a non-inferiority principle to prophylactic interventions which have proven to be effective in the past, such as trimethoprim. Therefore, the following primary objectives are presented:

1. Check if the cranberry extract is safe and effective in the prophylaxis of recurrent urinary tract infection in children.
2. Evaluate the antibacterial resistences of the bacterial isolates in the urine of patients who completed follow-up.
3. Evaluate the in vitro anti-adherent properties of cranberry extract used in the study.
4. Assess whether cranberry may affect the “non-specific” adherence properties of *E. coli*. In addition, we wished to determine whether the inhibition of haemagglutination by cranberry is associated with changes in nonspecific adherence properties vs surface hydrophobicity, adherence to nitrocellulose or biofilm formation by *E. coli*.
5. Analyse the excretion of phenolic acids in urine and its relationship with recurrence of urinary tract infection.
6. Analyse the pattern of excretion of phenolic acids in different ages and its relationship with recurrence of urinary tract infection.

To achieve the objectives outlined we propose an experimental model of randomised clinical trial with the following flowchart:

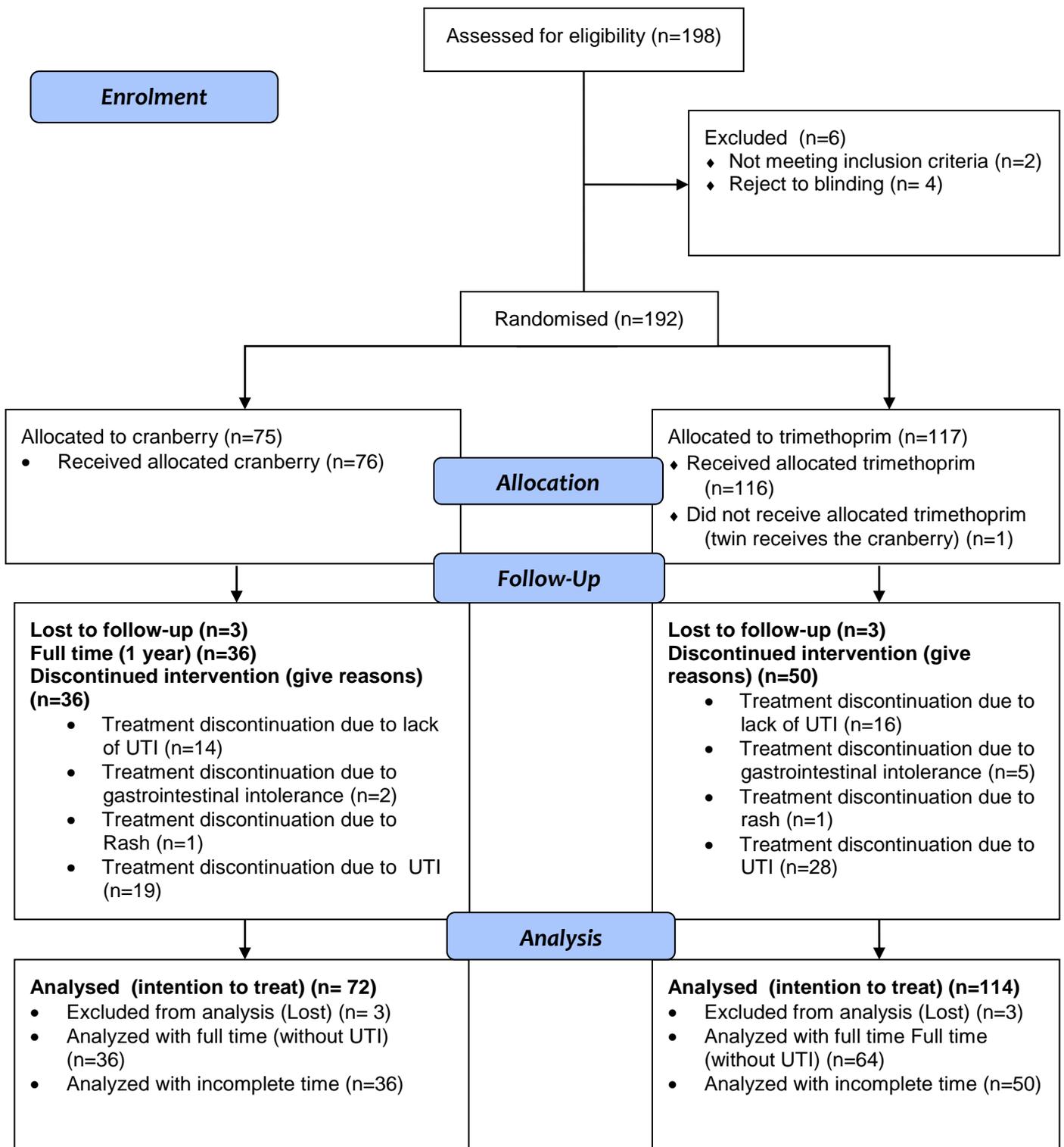


Figure 7.1. Consort 2010 flow diagram



## **8. MATERIAL Y MÉTODO**



---

## MATERIAL Y METODO

---

### 8.1. Estudio experimental

#### 8.1.1. Caracterización del jarabe de arándano

Dada la gran variabilidad en cuanto a su composición de los diferentes preparados comerciales de arándano americano existentes en el mercado, de forma previa al inicio de este ensayo se consideró necesario realizar una caracterización del jarabe utilizado.

#### *Material*

Los estándares de ácido p-cumárico, miricetina, 7-hidroxycumarina y proantocianidina A2 fueron de Extrasynthese (Genay, Francia). El reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu era de Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El ácido fórmico y acetonitrilo utilizado para preparar las fases móviles fueron de Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y Lab-Scan (Gliwice, Sowinskiego, Polonia), respectivamente.

El agua destilada con una resistencia de 18.2M $\Omega$  fue desionizada en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Los disolventes se filtraron antes de su uso con un disolvente 58.061 en un aparato de filtración (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.).

#### *Preparación de la muestra*

Se utilizaron 200  $\mu$ l de jarabe de arándano, elaborado como una dispersión de extracto de arándano al 3% en jarabe de glucosa. El jarabe se disolvió en 4 mL de metanol, se realizó vórtice durante 2 minutos en un G560E Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, EE.UU.) y se filtró con un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) (0.2  $\mu$ m de tamaño de poro) y se inyecta directamente en el sistema HPLC.

#### *Medición de polifenoles totales, y proantocianidinas en el jarabe de arándano*

Para cuantificar el contenido fenólico total en el jarabe de arándano, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu 38. La proantocianidina (taninos condensados) y el total de antocianina se determinaron de acuerdo con el método de la vainillina-HCl 39 y los métodos descritos por Fuleki y Francis, respectivamente 40.

*Separación cromatográfica*

El análisis HPLC se realizó con un sistema Agilent 1200 serie LC de rápida resolución (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una bomba binaria, un muestreador automático y un detector de red de diodos (DAD). La separación se lleva a cabo con una columna analítica, ZORBAX Eclipse Plus C18 150 mm × 4.6 mm, tamaño de partícula de 1.8 μm). La elución en gradiente se llevó a cabo usando dos programas diferentes. Un programa de gradiente 1 se utiliza para el modo de ionización negativo MS que consta de un 1% de ácido fórmico en acetonitrilo – agua (90:10, v/v) (fase A ) y acetonitrilo (fase B ) a un caudal constante de 0,5 mL / min usando el siguiente gradiente : 0-20 min, gradiente lineal de 5 % B a 20 % de B; 20-25 min, gradiente lineal desde 20 % de B a 40 % de B; 25-30 min , gradiente lineal de 40% B a 5 % de B; y 30-35 min, isocrático de 5 % de B. Posteriormente un método cromatográfico diferente (programa de gradiente 2) se utilizó para el modo de ionización positivo MS. Debido a su equilibrio ácido-base, las antocianinas necesitan un pH más ácido, por lo que el gradiente se modificó de la siguiente manera: ácido fórmico - agua ( 90:10, v/v) (fase A) y acetonitrilo (fase B) en una velocidad de flujo constante de 0.5 mL / min usando el siguiente gradiente : 0-13 min, gradiente lineal de 0% de B a 20 % de B; 13-20 min, gradiente lineal desde 20% de B a 30% de B; 20-25 min, gradiente lineal desde 30% de B a 80% de B; 25-30 min, gradiente lineal desde 80% de B a 0 % de B; y 30-35 min, isocrático de 0% de B.

La adición de ácido fórmico dio mejores resultados para la ionización de los compuestos en modo positivo. El volumen de inyección fue 10 μl para ambos programas de elución de gradiente. Los dos métodos diferentes fueron elegidos ya que los dos proporcionaron tiempos de análisis cortos y buenas separaciones cromatográficas. Datos de UV se recogieron usando DAD fijo en 280, 320, 360 y 520 nm.

*Condiciones ESI -TOF -MS*

El TOF-MS se realizó utilizando un microTOFTM (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) ortogonal con aceleración TOF espectrómetro de masas equipados con una interfaz (ESI) de ionización en electrospray. Los parámetros para el análisis se establecen utilizando los modos de iones negativos y positivos con espectros adquiridos en un rango de masas de 50 -1000 m/z. Los otros valores óptimos de los parámetros ESI-MS fueron: tensión capilar, 4500 V; temperatura del gas seco, 190°C; flujo de gas seco, 9.0 L / min; la presión del nebulizador, 2.0 bar; y la tasa de espectros 1 Hz. El flujo suministrado en el detector de MS de HPLC se dividió usando un divisor de flujo (01:02) para lograr ionización por electrospray estable y obtener resultados reproducibles. El calibrador era un clúster de formiato sódico que contiene hidróxido de sodio 5 mM y ácido fórmico al 0.2 % en isopropanol - agua (01:01, v / v), se inyecta en él al comienzo de cada serie con una bomba Cole Palmer 74900-00-05, jeringa (Vernon Hills, IL, EE.UU.), conectado directamente a la interfaz. Todos los espectros fueron calibrados antes en el compuesto de identificación. Todas las operaciones se controlaron mediante el analizador de datos software 3.4 (Bruker Daltonik), que proporciona una lista de posibles fórmulas elementales mediante el uso de la GeneraMolecularFormula TM Editor.

### Evaluación del método

La cuantificación se hizo de acuerdo con las curvas de calibración lineales de los compuestos estándar. Cuatro curvas de calibración se prepararon usando los siguientes estándares: miricetina, ácido p-cumárico, 7 - hidroxycumarina y procianidina A2. Los diferentes parámetros de cada compuesto estándar se resumen en la Tabla 8.1. Todas las curvas de calibración muestran una buena linealidad entre las diferentes concentraciones dependiendo de los analitos en cuestión. Las curvas de calibración revelaron buena correlación entre áreas de los picos y las concentraciones de analito, y los coeficientes de regresión fueron siempre superiores a 0.995. LOD siempre estuvo dentro de la gama 0.053-0.233 µg/mL mientras que el límite de cuantificación estuvo dentro de 0.175-0.679 µg/mL. Se desarrollaron dentro del mismo día y entre días precisiones para evaluar la repetibilidad/reproductibilidad del método. Se inyectó un extracto de jarabe (n = 6) durante el mismo día (precisión intradía) durante 3 días consecutivos (precisión entre días, n = 18). Se determinaron las desviaciones estándar relativas (RSD) del tiempo de análisis y el área del pico. La repetibilidad intradía del área del pico, expresada por el RSD, fue de 1.2 %, mientras que la repetibilidad interdía era 3.8 %. La precisión del ensayo se pudo determinar por la cercanía del valor de la prueba para el valor nominal y se evaluó con soluciones preparadas por separado, individuales stock primario, mezclas y soluciones de trabajo de todos los estándares.

Se calculó sobre el rango lineal dinámico a tres niveles de concentración: bajo (LC), medio (valor de concentración intermedia de la gama de calibración lineal), alto (valor de la concentración más alta de la gama de calibración lineal) a través de tres ensayos por concentración en días diferentes. Las concentraciones de analito se calcularon a partir de curvas de calibración y la exactitud se calculó por la relación de esta concentración calculada con respecto al teórico.

Tabla 8.1. Método de parámetros analíticos.

Analito	RSD	LOD (g/mL)	LOQ (g/mL)	Rango calibración (g/mL)	Ecuación calibración	r <sup>2</sup>	Precisión
Miricetina	0,23	0,053	0,175	LOQ-25	$y = 22.852x + 21.117$	0,996	98,7
A.p-cumarínico	0,31	0,204	0,679	LOQ-250	$y = 127.13x + 7.2384$	0,999	99,2
Proantocianidina A2	0,36	0,152	0,287	LOQ-100	$y = 5.8648x + 3.8544$	0,997	101,3

#### 8.1.2. Selección de la muestra y criterios de inclusión y exclusión

Se valoran como criterios de inclusión un antecedente de infección urinaria recurrente (más de 2 episodios de infección en los últimos 6 meses) asociada o no a reflujo vesicoureteral de cualquier grado o cualquier otra alteración nefrourológica. La confirmación de infección urinaria se realiza por urocultivo (>100.000 UFC/mL) en una muestra de orina recogida al acecho o con bolsa colectora de orina, previa asepsia de meato uretral con clorhexidina o mas de 10.000 UFC/mL si la orina se obtuvo tras sondaje. En ambos casos se valora la existencia de un sedimento de orina con mas de 20 leucocitos por campo.

Se consideran como criterios de exclusión las siguientes situaciones:



Tabla 8.2. Pacientes reclutados en el estudio experimental (Cont.)

Id	Nombre	Historia	Fecha nacimiento
35	□○□□ □○□□ □□□□□□ □:→□□□	678918	14.10.2007
36	□□→□□□ □□□□□□□□ □□→□□□□○	529747	09.11.2002
37	λ□→□□○ □□○□□□ □□○□→□□	719104	06.01.2009
38	λ□→□□○ □:→□□□□ □□→□□□□→	723865	19.03.2006
39	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□	688907	27.12.2007
40	□□□□□□□□ □:→□□□□□□ □:□□□□ □□□□□□	667824	04.06.2007
41	□□□□□□□□ □:→□□□□□□ □□□□→	723828	23.12.2008
42	λ□□□□□ □:□□□□ □□□□□□□□	693387	07.03.2008
43	□□□□□□ □:→□□□□□□ □□□□□□	.	02.08.2000
44	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	710180	14.09.2008
45	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	659390	16.10.2006
46	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	535246	12.02.2002
47	□□□□□□□□ λ□□□□□□□□ □□□□□□	701757	16.06.2008
48	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	649362	02.06.2004
49	□□□□□□□□ □□□□□□ □□□□□□□□	723684	09.01.2009
50	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□	329212	10.11.2001
51	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	725592	19.06.2000
52	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	733956	15.07.2001
53	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	678295	12.06.2007
54	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	700581	19.12.2007
55	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□	714735	30.11.2007
56	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□	688992	08.11.2007
57	□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	677880	06.10.2007
58	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	550388	03.05.2006
59	□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	728236	17.01.2006
60	□□□□□□□□ □□□□□□ □□□□□□□□	675827	26.08.2007
61	□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□	696665	10.03.2008
62	□□□□□□ □□□□ □□□□□□	600756	31.07.2003
63	□□□□□□ □□□□ □□□□□□□□	582788	08.12.2004
64	□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□	718339	28.10.2008
65	□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□□□	715075	19.09.2008
66	□□□□□□□□ □:→□□□□ □□□□□□□□	727745	07.08.2008
67	□□□□□□ □:→□□□□ □□□□□□□□	654243	17.01.2007
68	□□□□□□□□ □□□□□□ □□□□□□	728924	05.12.2005
69	□□□□□□ □:→□□□□ □□□□□□□□	726895	02.01.2008
70	□□□□□□ □:→□□□□ □□□□□□	502227	06.11.2001
71	□□□□□□ □□□□□□ □□□□□□ □□□□□□	730585	17.01.2002
72	□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□□□	730027	06.04.2006
73	λ□□□□□□ □:→□□□□ □□□□□□□□	719196	07.01.2009
74	□□□□□□ □□□□ □□□□□□□□	558951	13.08.2003
75	λ□□□□□ □□□□□□ □□□□□□□□	720957	27.01.2009

Tabla 8.2. Pacientes reclutados en el estudio experimental (Cont.)

<b>Id</b>	<b>Nombre</b>	<b>Historia</b>	<b>Fecha nacimiento</b>
76	□ℓ↕→ □_□□○□□○ ...□□→_□_	373934	19.02.2005
77	:→□_□ℓ ·: ...□□→ □□_□_	740327	15.11.2008
78	λ→□□□ℓ □□_□□□□□□ .·:→_→_○	728639	21.04.2009
79	□_↕□□ :○□□→ :→_□□	707525	17.08.2008
80	□_→□→ □□ℓ□_ □→_→□○	721842	28.08.2008
81	□ℓℓ_□□□→ □□○ℓ→ □○□_□□_□□	733223	23.08.2007
82	□ℓ□_→↕□_ℓ □□_□_ □→_□□□	733226	24.05.2008
83	□□_○□□○ :→□_□ℓ □○□○ □□□↕ℓ□□	671122	22.07.2007
84	□□↕_○_ □□_→□□□ □□_ℓ□→□□ □→ℓ○ℓ○	714688	13.10.2008
85	□□_→□□□ □○□□ □□_□	732657	17.04.2009
86	□□_□_→ :→□□□→ □□_□□□□□□ □○□_□□_□	730317	16.07.2008
87	□□→_□□□ □□_□□ ...□□→_□_	722655	06.10.2008
88	...→_→_ :→_□→ □→_↕□→ :→_□□	633683	23.06.2005
89	□□□□_ □→ℓ○_ □→↕→ℓ→	732794	05.06.2009
90	:→_□→ □○□□_○ ...□<□□	684759	11.12.2007
91	□→ℓ□_□→ :○□□→ □○□○	691979	13.08.2003
92	□○↕□○ □○□□ℓ→_ □→_↕□→	716798	19.11.2008
93	...→_→_ □○□_□□_□□ □□→ℓ<○_	727194	04.04.2009
94	:○□□↕→ □→_↕□→ □□_□□□□□□	.	17.02.2009
95	:□ℓ○□□ :○_→ℓ□_ □□→_ℓ○□→	739008	01.08.2001
96	□□→□□□ℓ→ □□□□□□ □□□↕ℓ□□	722680	11.01.2009
97	.·:□_□→ □_□□→_ □□_□ℓ□_→	572978	19.11.2005
98	...↕□→ □□_□□ □□□□	748312	06.04.2007
99	□→_ℓ □□□□□□ □_□_→□→	727454	27.03.2009
100	□→↕ℓ○ □□□→ □→□□□□	703436	17.05.2008
101	□_ℓ□→ □□_□<○ □□_□□	716892	09.12.2008
102	:→_□→ □□_□<○ □□_□□	716888	09.12.2008
103	□○□□→ □□□□_□ℓ □→□□□	556336	04.10.2003
104	:→_→_→ .·:□□_→_ □□→_→_○	684243	22.07.2007
105	□ℓ↕→ □_<□□→_□_ □_□□	619809	15.01.2006
106	:→_□→ :○□□○ □○<□_○	439970	15.10.1999
107	□ℓ□□→□□_→ □→ℓ→_ ...□<□□	702953	01.11.2007
108	□□□_□→ :□ □→↕→ℓ□_→ :→_□□□□□	744894	18.12.2000
109	□○↕□○ □ℓ_→_□□ :_□○□	747946	07.09.1999
110	□□□↕→ℓ □_→□□□ □○□_□□_□□	724093	17.02.2009
111	□○>□→ :○□→ □ℓ→_→	675636	30.06.2007
112	□→ℓ→_→ :□□→_ :_□○□	713607	01.11.2008
113	□_→□↕□_↕○ □→□□□ ...□<□□ □→_↕□→	748754	22.06.2009
114	□○□ .·:ℓ□_→ □□□○□○	702855	22.06.2008
115	.·:□ℓ□ □→_↕□→ □○_□_	744309	12.10.2009
116	:→_□→ □→_□○_ :○_→ℓ□□→	749267	14.08.2006

Tabla 8.2. Pacientes reclutados en el estudio experimental (Cont.)

Id	Nombre	Historia	Fecha nacimiento
117	:t→...t→ □t→_ϕ□t→ □□□ϕh□□	745920	04.10.2009
118	□t→□_ℓ□□ ·.ℓ□_□t→ □_□□□	749095	17.12.2009
119	□_ϕ□□ □_□□t→ □t→..._°	716809	22.06.2008
120	□ℓ_t→_° □t→_ϕ□t→ □□F□□□□	731396	23.05.2009
121	□t→□□□ℓt→ □_<□□_° :t→...□□	688849	01.02.2008
122	□_□_□ ...□_ □_ □_□_□_□_□_□_ □t→_□t→_	743516	02.06.2009
123	.·t→ϕh° □□F□□ :t→_□t→_	719612	23.12.2008
124	□>_□ϕt→ □t→F_° □_□□_	728756	19.03.2009
125	□_□t→□ □□F□□□□ □□ℓ□_□t→_	747857	17.12.2009
126	□t→ϕ_□□ℓ :°□_□_° □t→_□t→_□_□ℓt→	749800	24.11.2009
127	:□□_□ℓ □□□□ℓ □_□□_□□ □□□ϕh□□	737861	09.07.2009
128	□ℓ_□_□t→ □t→□□t→ □t→F<□ℓℓ_°	512786	25.04.2002
129	□□□□ℓt→ □t→_□□□ λ_°F□□□_□□	740678	31.07.2009
130	□_ϕ□□ □_□□_° □□_□□□t→	727588	09.04.2009
131	:t→_□t→ □□□ϕh□□ □t→_h□□	731640	22.05.2009
132	□h_□_□_□t→□ □□□_□t→ □□□_□t→	745221	13.11.2009
133	.·t→_□t→ □□□ϕh□□ :t→...□□	749975	13.12.2009
134	□_□ℓℓ□_F_° □_□t→□_° □t→□□_□□	752695	01.03.2009
135	□_□_° □□_□□□□□□ :t→...□□	752064	17.01.2010
136	λt→_□□ □t→_ϕ□t→ □t→_□_□ϕh□	710709	30.09.2008
137	.·.Ft→□_□t→ :°□□_° □_□_□_	701389	30.12.2004
138	...t→_□t→ □t→□_□_ϕ_° □ℓ_t→_□□	512287	17.05.2002
139	:t→□□□ℓ □t→□t→_□_° :°□□_°	588004	31.12.2004
140	:t→_□t→ :°□t→ □_□□	542049	23.10.2002
141	□_ϕ□□ □□<□_□_° ·.·...□□t→	593006	06.03.2005
142	□t→□□ ·.·□ϕ_°ℓ□ □t→□□t→ :°_□ℓℓ_°	593070	19.09.2003
143	.·t→_□t→ℓ□t→ □_□_□□_□□ □_□_□□_□□	645325	26.09.2006
144	□ℓ_t→_° □□ ℓt→ □_□□_□ :°ℓ□t→	746213	31.05.2009
145	λt→□□□ℓt→ □□_□t→□_° :t→_□□	739560	16.08.2009
146	□ℓ□t→□□_° □_□_□_° ...□<□□□□□□□t→_	720509	17.11.2008
147	...t→_□t→ □□_°_ □_°_ϕ□ℓ	531963	08.10.2002
148	□_ℓ□_° :°ℓ□□t→ □_°ϕ_°	755406	08.03.2010
149	□ℓ_t→_° □_□□□ℓ□_ λ□ℓ□t→□_°	755232	07.03.2010
150	□□ϕ_°_° :°ℓ□□t→ :°_□t→ℓ□□t→	721185	27.01.2009
151	□□□_ □t→Ft→□_° □t→_ϕ_□t→ℓ	752579	17.02.2010
152	□t→_°ℓt→ :t→...□□□□ □□□_□□t→	759402	29.09.2007
153	□_□t→_□t→□ℓ □□□_□t→ □□□_□t→	745220	13.11.2009
154	□t→_□t→ □ℓϕt→□_□t→_□t→ □t→ϕt→ℓℓ□_°	734656	30.06.2009
155	..._ϕ□t→ □_□_□□_□□ □□ℓℓ□□t→	759405	16.07.2004



### 8.1.3. Cálculo del tamaño muestral

Aun cuando los cálculos proporcionan datos aproximados, estos son importantes porque permiten tener una idea de cuántos sujetos deberían participar en el estudio y si sólo se dispone de un número fijo de estos, nos puede indicar si realmente vale la pena emprender la investigación dado que la población a la que tenemos acceso puede ser inferior a la recomendada para alcanzar significación estadística.

Un conjunto de variables deberán ser consideradas en esta estimación:

a) *Error alfa*: Corresponde, según la definición usual a "la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera". El investigador deberá establecer hasta qué punto estará dispuesto a aceptar que los hallazgos de interés pudieran ser justificados por variaciones explicables por el azar. Convencionalmente, se considera en estudios clínicos un error alfa aceptable de 5% o menor, aunque más precisamente inferior a 5%. Ello significa que si bien los resultados pudieran ser explicados por el azar en 5 o menos de cada 100 veces que se repitiera la experiencia, se decidirá interpretarlos, en tales circunstancias, como no atribuibles al azar, es decir, "significativos". La elección de un error alfa más pequeño (por ejemplo 1%) proporciona mayor probabilidad que los resultados de interés correspondan a una situación real. Sin embargo, aumenta el riesgo de atribuir al azar hallazgos que no debieran ser interpretados de tal modo (puesto que sólo sería "significativo" un valor de "p" igual o menor a 0,01 (1%)). En los cálculos se emplea el valor "Z de alfa" ( $Z_{\alpha}$ ) que corresponde en la curva normal estandarizada al número de desviaciones estándar que aplicadas en ambos lados del promedio cero dejan fuera un área de 5% (correspondiente al error alfa elegido) (en cada cola queda entonces 2,5%).  $Z_{\alpha}$  para alfa 5% (0,05) en prueba bilateral es igual a 1,96 y para prueba unilateral es 1,64.

b) *Error beta*: Este error corresponde a la probabilidad de no detectar un hallazgo como importante y atribuirlo al azar. Habitualmente se le define como "la probabilidad de no rechazar la hipótesis nula cuando esta es falsa". En estudios clínicos se considera apropiado un nivel de error beta de 20%. Naturalmente, se puede utilizar un nivel menor. Como sea, el poder del estudio, es decir la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es falsa, es igual a 100 menos el error beta. Esto significa que habitualmente se trabaja con un poder de 80%. Es importante destacar que la reducción del error beta invariablemente va acompañada de aumento del error alfa, para un mismo tamaño muestral. Una reducción de ambos errores sólo es posible aumentando el tamaño de la muestra.

En los cálculos se emplea el valor "Z de beta" ( $Z_{\beta}$ ) que corresponde al número de desviaciones estándar de la curva normal estandarizada que deja fuera, unilateralmente, un área igual al error beta escogido, 20% si empleamos poder de 80%.  $Z_{\beta}$  en este caso es igual a 0,84 y si el error beta es 10% (0,10) el valor es 1,28.

c) *Diferencia clínicamente significativa*: Aquí se puede suponer una comparación entre dos grupos en un ensayo clínico, donde se espera poder detectar una diferencia en los resultados. Esta diferencia no es cualquiera, sino una igual o mayor a cierto nivel que desde un punto de vista clínico sea de relevancia.

Un criterio similar se utiliza para elegir detectar razón de ventaja (OR), riesgo relativo (RR) o razón de verosimilitud (LR). Es importante tener presente que una misma diferencia inducirá a tamaños de muestra variables de acuerdo con los valores entre los que tal diferencia se establece. Así, 15% no opera igual si es entre 20% y 35% o entre 45% y 60%, por lo que no basta con plantear en qué magnitud serán diferentes los resultados. Si no se dispone de más información respecto a este asunto, la solución es ensayar diferentes cálculos y utilizar el tamaño muestral que resulte mayor. Si la falta de información no es solucionable con relativa facilidad, se puede efectuar un estudio piloto para obtener una aproximación. En tales circunstancias se recurriría a los intervalos de confianza de los estadígrafos de interés para obtener tamaño mínimo y máximo probable requerido para el estudio.

Mucho interés tiene la orientación que se requiere al pretender verificar "igualdad de resultados". Esta situación, planteada en nuestro estudio, podría corresponder a la comparación de un tratamiento ya aceptado con otro que tiene varias ventajas (requiere menos dosis al día, es menos costoso, etc.), aunque se supone que genera resultados iguales. Si se establece "cero" como diferencia a detectar, el tamaño de la muestra ascendería a infinito, por ello es necesario plantear la detección de la diferencia más grande que no sea clínicamente significativa. Así, si se plantea que cualquier diferencia igual o menor a 6% se considerará como sin importancia, el estudio será diseñado como capaz de pesquisar esta última cifra. Entonces, si ambos tratamientos aparecen como comparables ( $p > 0,05$ ), se podrá pensar que o son iguales o difieren en una cuantía igual o menor que 6%, lo que ya fue declarado como sin importancia clínica.

d) *Hipótesis uni o bilateral*: Un aspecto muy importante a considerar es si el tamaño de la muestra se está estimando para la verificación de una hipótesis uni o bilateral. Esto se refiere a que si al comparar dos grupos la hipótesis es que los resultados diferirán sin poder predecir de seguro cuál grupo resulta mejor o más favorable (bilateral, porque A puede ser mejor que B o viceversa), o definitivamente se postula que, específicamente, uno de los grupos dará mejores resultados. El problema planteado corresponde a lo siguiente: si se realiza un ensayo clínico controlado para probar un nuevo tratamiento, comparándolo con aquel generalmente aceptado, sólo es éticamente aceptable que el investigador, aunque tenga sus esperanzas puestas en que el nuevo tratamiento es mejor, no sabe si ello es así y por tanto la hipótesis debe contemplar la posibilidad que el nuevo tratamiento resulte comparable o aun inferior al generalmente utilizado. Se entiende que si el investigador está razonablemente convencido que el nuevo tratamiento es mejor, simplemente no puede someter al grupo control a una terapia que considera inferior, menos efectiva.

Esta es una de las razones por las que en el diseño de nuestro estudio se considera el comparador con trimetoprim en lugar de placebo.

En los ensayos clínicos controlados y aleatorizados, la intención más común es evaluar si un tratamiento es mejor que otra estrategia o un placebo establecido como control. La pretensión en este caso es demostrar la eventual "superioridad" de un tratamiento respecto de otro.

Un problema cada vez mas frecuente en el diseño de ensayos clínicos es la necesidad de comparar intervenciones no contra placebo, sino contra procedimientos o

fármacos que ya han demostrado su utilidad en ensayos previos contra placebo, o que en la práctica son considerados como estrategias standard de tratamiento. En algunos casos el estudio puede mantener la hipótesis de que el nuevo tratamiento será “superior” al previo frente a la reducción de eventos clínicos relevantes (internaciones, recidivas de tumores, mortalidad) lo que permite mantener un diseño clásico. En otras circunstancias no se esperan ventajas sobre estos puntos finales, pero algunas características de la nueva medicación la hacen preferible (facilidad de la administración, menores costos o efectos adversos). En este caso el ensayo se orienta a demostrar que la nueva intervención tiene efectos “similares” o “no inferiores” sobre el evento clínico relevante, lo que permitirá luego su utilización clínica sobre la base de otras ventajas colaterales o simplemente como una alternativa frente a quienes no pueden recibirlo por intolerancia o hipersensibilidad.

La expectativa consiste en que la nueva estrategia, aun sin ser superior, conserve una “equivalencia clínica”. Esta propuesta guarda similitud conceptual con los ensayos farmacológicos de biodisponibilidad de nuevas formas farmacéuticas o genéricos, que deben demostrar que conservan las propiedades bioquímicas de la droga o la forma de administración original, es decir, son “bioequivalentes”.

El concepto de “equivalencia clínica” tiene valor conceptual, porque transmite la idea de una similitud en la acción del fármaco. Desde el punto de vista estadístico, la demostración de una “equivalencia” implica que la nueva intervención no es superior ni inferior. La mayoría de los autores prefieren no utilizar actualmente el concepto de equivalencia por un motivo entendible: si la nueva estrategia es superior a la previa, no es equivalente. Y si no demuestra superioridad, nuestro único interés es establecer que no sea inferior. De tal manera que cuando se proyecta un ensayo con una nueva intervención que se estima no superará a la previa, todo el diseño se aplica a demostrar que no es inferior. Este diseño de ensayo es el denominado de “no inferioridad”.

Del análisis de estudios previos<sup>174, 175</sup>, se parte de un riesgo de recurrencia de infección urinaria del 20% durante el primer año de vida. El presente estudio considera que el arándano americano es equivalente a la profilaxis de la infección urinaria con trimetoprima. El límite de equivalencia se estima en  $\pm 10\%$ . El error alfa se estima en 5% y la potencia del estudio en 80%. De acuerdo con estos parámetros el tamaño muestral se estimó en 109 pacientes en cada grupo.

Para el análisis de no inferioridad se consideró una diferencia de la prevalencia del efecto (d) de 0.105 (18.9%-8.4%=10.5%),

$$SE = \sqrt{\frac{Var.cranberry}{n1} + \frac{Var.cranberry}{n2}};$$

$$SE = \frac{0,174}{37} + \frac{0,203}{58} = 0.09.$$

El límite de equivalencia se estimó como  $\pm 0.1$  (10%)  $\rightarrow \delta L = -0.1, \delta U = 0.1$ ;

$Z\alpha = 1.96$ .

En nuestro estudio evaluamos la no inferioridad del arándano americano sobre el trimetoprim en la profilaxis de la infección urinaria recurrente. Contemplamos un hipótesis unilateral, es decir de no inferioridad:

$H1L = \text{Pr arándano americano} - \text{Pr trimethoprim} > \delta L \rightarrow H0L = \text{Pr arándano americano} - \text{Pr trimethoprim} \leq \delta L$

Que se evidencia por el estadístico  $Z_L = \frac{d - \delta L}{SE}$ ;  $Z_U = \frac{d - \delta U}{SE}$

#### 8.1.4. Definición de variables

Seguidamente se describen las variables estudiadas en el presente proyecto de Tesis doctoral.

Ácidos Fenólicos de origen metabólico: Se determinan mediante HPLC los niveles de polifenoles metabólicos totales y sus fracciones:

1. Ácido m-cumaríco (m-3): Es un ácido hidroxicinámico, se diferencia del ácido p-cumarico y o-cumarico por la posición del grupo hidroxilo en sustitución de 1 grupo fenil. Esta presente en el vinagre.

2. Ácido isoferúlico: Es un isómero del ácido ferulico. Se ha relacionado con propiedades antibacterianas.

3. Ácido dihidroferúlico: Es un ácido monocarboxílico procedente del ácido propionico en el que uno de los hidrógenos en posición 3 ha sido reemplazado por un grupo 4-hidroxil-3-metoxifenil.

4. Ácido 3,4-di-dihidrofenilpropiónico: Derivados del compuesto ácido por p-hidroxifenil propiónico caracterizados por tener dichos derivados las fórmulas generales (I) y (Ia), donde n puede tomar los valores 1,2,3; R puede ser H ó CH<sub>3</sub> y R1 puede ser CH<sub>3</sub> ó H con actividad farmacológica y su aplicación en medicina para el tratamiento de desórdenes del sistema inmunológico.

5. Ácido m-hidroxifenilpropiónico: Derivados del compuesto ácido propionico son conocidos por su actividad farmacológica y su aplicación en medicina para el tratamiento de desórdenes del sistema inmunológico.

6. Ácido p-hidroxifenilpropiónico, Derivados del compuesto ácido propionico son conocidos por su actividad farmacológica y su aplicación en medicina para el tratamiento de desórdenes del sistema inmunológico.

7. Ácido homovanílico, Es un producto correspondiente de la degradación metabólica de la dopamina que no contiene grupo hidroxilo en la cadena lateral, y es, por tanto, uno de los parámetros de la actividad dopaminérgica en el sistema nervioso central.

8. Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético: El ácido di-hidroxil-fenil-acético (DOPAC) es el metabolito más importante de la dopamina

9. Ácido m-hidroxifenilacético (m-3), como otros derivados del ácido fenilacético (abreviado en inglés PAA) es un compuesto orgánico que presenta dos grupo funcionales: un fenilo y un carboxilo. Es un sólido blancuzco de olor desagradable que se usa en la producción ilícita de fenilacetona (empleada en la fabricación de metanfetaminas) por lo que es objeto de controles por parte de la Chemical Diversion and Trafficking Act en Estados Unidos.

10. p-hidroxifenilacético (p-4): Es un componente promario producto de la oxidación del tirosol (4-hidroxifeniletanol). Esta presente en el aceite de oliva.

11. Ácido p-hidroxibenzoico: El ácido p-hidroxibenzoico o ácido 4-hidroxibenzoico es un ácido monohidroxibenzoico, un derivativo fenólico del ácido benzoico. Es principalmente conocido como base para la preparación de sus ésteres, conocidos como parabenos., los cuales se han usado tradicionalmente como conservantes en muchos tipos de fórmulas químicas debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, si bien ahora crece la controversia sobre sus beneficios por sus posibles efectos cancerígenos.

Ácidos Fenólicos de origen dietético: Se determinan mediante HPLC los niveles de polifenoles dietéticos totales y sus fracciones:

1. Ácido protocatéquico: El ácido protocatequico o 3,4-dihidroxibenzoico esta presente en multiples plantas como la olive, Hibiscus sabdariffa, y Eucommia ulmoides. Hay multiples articulos en la literatura que comunican sus efectos antioxidants, antibacterianos, antitumorales, antidiabeticos, neuroprotectivos.

2. Ácido siríngico: El ácido siríngico es una forma natural del ácido trihidroxibenzoico O-metilado. El ácido siríngico se puede encontrar en la "Palma azai" y en su aceite También está presente en el vino.

3. Ácido cafeico: El ácido cafeico, tambien conocido con ácido hidroxicinámico, no está relacionado con la cafeína. Es biosintetizado mediante la hidroxilación del cumaril éster del éster quínico. Esta hidroxilación produce el éster cafeico del ácido shikímico, el cual se convierte a ácido clorogénico. Es el precursor del ácido ferúlico, alcohol coniferílico, y alcohol sinapílico, todos ellos pilares significativos en la lignina.<sup>3</sup> La transformación a ácido ferúlico es catalizada por la enzima ácido cafeico-O-metiltransferasa.

4. Ácido p-cumárico: El ácido p-cumárico se puede encontrar en una amplia variedad de plantas comestibles como el maní, habichuelas blancas, tomates, zanahorias y ajo. También se encuentra en el vino y en el vinagre de vino. Se biosintetiza a partir del ácido cinámico por la acción de la enzima dependiente de P450, ácido 4-cinámico hidroxilasa (C4H). También se produce a partir de L-tirosina por la acción de la tirosina amoníaco liasa (TAL).

5. Ácido ferúlico: El ácido ferúlico (Fig.1) es un compuesto que forma parte del grupo de los ácidos hidroxicinámicos, entre ellos es el más abundante en la pared celular vegetal. Este se encuentra enlazado covalentemente a polisacáridos, incluyendo glucoarabinosilanos (GAXs) y pectinas, a través de enlaces ésteres.

6. Ácido sinapínico. Es un derivado del ácido cinámico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-cinámico). Es uno de los componentes polifenólicos más representativos presentes en el aceite de oliva.

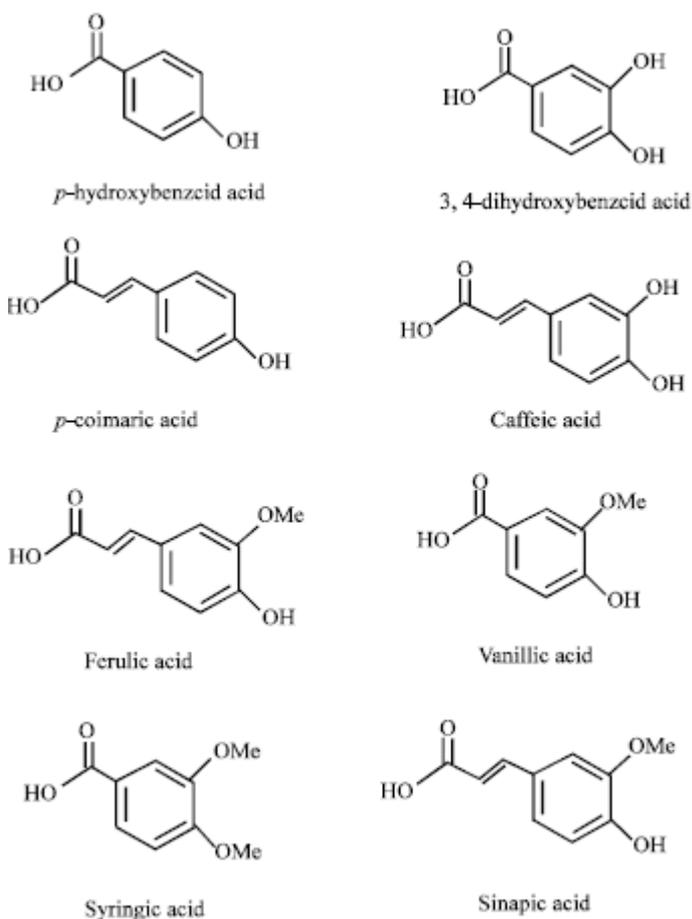


Tabla 8.3 Ejemplos de ácidos fenólicos.

- Urocultivo y antibiograma: El urocultivo es el cultivo de una muestra de orina, que determina la existencia o no de crecimiento bacteriano en dicha muestra, debe permitir el aislamiento y recuento cuantitativo de unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas en relación a los mililitros de muestra. Se considerará positivo o no según el mayor o menor grado de esterilidad de la muestra cultivada que dependerá del método de recolección. En este proyecto de tesis doctoral se han recogido las muestras de orina mediante bolsa colectora por lo que se considera positivo un recuento bacteriano de >100.000 ufc/ mL. El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos aislados en un cultivo.

- Fechas de nacimiento, fecha de reclutamiento y fecha de alta en el estudio.

- Edad (meses): Se calcula la edad del paciente en el momento del reclutamiento como la diferencia entre la fecha de reclutamiento y la fecha de nacimiento.

- Tiempo de permanencia en el estudio (días): Se calcula como la diferencia entre la fecha de alta y la fecha de reclutamiento.
- Tipo de intervención: Define si el paciente recibe tratamiento experimental (arándano americano) o tratamiento estándar (trimetoprim).
- Dosis (mL): Hace referencia a la cantidad de tratamiento administrado.
- Infección urinaria febril: Variable cualitativa indica si existe fiebre en el momento de detectarse infección de tracto urinario por urocultivo con sedimento patológico.
- Recogida de datos somatométricos: La exploración somatométrica se realizó conforme a los estándares habitualmente recomendados y que a continuación se resumen:

*a) Peso.* Se utilizó una báscula Atlántida calibrada antes de cada medida. El individuo se coloca encima de la plataforma de la báscula, sin apoyarse en sitio alguno, desprovisto de ropa, a excepción de la ropa interior. Su valor se expresa en Kg con un decimal.

*b) Talla.* La talla se obtuvo con un antropómetro de Harpenden-Holtain. En pie, de manera que sus tobillos, nalgas y hombros estén en contacto con la pieza vertical del aparato medidor. Los tobillos deben situarse juntos, de manera que los maléolos internos contacten o estén muy próximos. Las manos y los brazos deben estar relajados, con las palmas vueltas hacia adentro. La cabeza debe situarse con el plano de Frankfurt paralela al suelo. Se debe deslizar la tabla horizontal del tallímetro hasta tocar la cabeza del sujeto, aplastar el pelo, realizando entonces la medición. Su valor se recoge en cm con un decimal.

*c) Índice de Masa Corporal de Quetelec (Peso/Talla<sup>2</sup>).* Obtenido mediante el cociente del valor del peso (Kg) y el valor de la talla (m) elevada al cuadrado.

#### 8.1.5. Enmascaramiento de las intervenciones

El acondicionamiento de los medicamentos en investigación se hace individualmente para cada paciente del ensayo clínico. El promotor comunicará semanalmente al Servicio de Farmacia del Hospital Clínico San Cecilio de Granada los números de Registro de los Cuadernillos de recogida de datos distribuidos a los Centros colaboradores, de forma que el Servicio de Farmacia tendrá conocimiento por anticipado de cuales serán las demandas de tratamiento.

Tras detenidos estudios, realizados en gran medida por CHR Hansen Farmaceutica, se obtiene que las propiedades organolépticas del jarabe de arándano americano pueden igualarse tras la adicción al jarabe de trimetoprima de los siguientes colorantes: CC 1000 WS (Carmin) al 1.2% y CA-50.000D-WS al 1% (caramelo); esta proporción de carmín superaba sobradamente los límites permitidos en el RD 2001/95 de 7 de Diciembre. Por lo que finalmente optamos por añadir únicamente 0.1% de carmín (concentración permitida en dicho RD) y que confiere al jarabe un color rojo, que si bien no es exactamente igual que el del extracto de arándano, dado que las intervenciones se administran en botes opacos y cada participante sólo va a recibir una intervención consideramos poco probable que se rompa el enmascaramiento.

*Acondicionamiento primario del jarabe de Trimetoprima (Tediprima®)*

## Material:

- i) Suspensión de Trimetoprima a 16 mg/mL en jarabe de glucosa.
- ii) Agua purificada.
- iii) Colorante CC-1000-WS (E-120); Lab CHR-Hansen).
- iv) Envases de color caoba de plástico, 150 mL.

El jarabe de trimetoprima que contiene 16 mg/mL de trimetoprima se diluye con agua purificada hasta alcanzar una concentración de 8 mg/mL. Se añadirá para enmascarar el color CC-1000-WS; Lab CHR-Hansen) (E-120) a una concentración de 0.1% (no superando las 100 ppm permitidas de carmín).

Se mezcla todo bien en el agitador mecánico (RZR 2041, Heidolph) y posteriormente se reenvasan en botes opacos (150 mL) con la máquina reenvasadora semiautomática (Repeater™ Pum, Baxa).

*Acondicionamiento primario del jarabe de extracto de arándano*

- i) Extracto de arándano americano en jarabe de glucose al 3% suministrado por Laboratorios Pharmatoka (Francia).
- ii) Envases de color caoba de plástico, 150 mL (Guinama).  
Reenvasado en botes de color caoba opacos de 150 mL.

*8.1.6. Periodo de validez de las intervenciones, conservación y registro*

Se efectuarán por parte del responsable del Servicio de Farmacia los registros de los lotes con el suficiente detalle para que pueda reconstruirse adecuadamente la secuencia de operaciones. Estos registros deben contener todas las observaciones pertinentes que incrementen el conocimiento del producto, mejoren las operaciones de fabricación, y justifiquen los procedimientos utilizados y cualquier cambio realizado.

La fecha de validez de cada intervención tras su reenvasado será de 1 mes. Una vez reenvasados ambas intervenciones se mantendrán refrigeradas hasta su distribución.

Los registros de fabricación de lotes se conservarán al menos durante los periodos especificados en la Directiva 2003/94/CE.

Las intervenciones (extracto de arándano y trimetoprima) se suministran para 1 mes y deben conservarse refrigerados para garantizar las máximas condiciones de estabilidad.

Se liberarán mensualmente lotes de ambas intervenciones en función del número de pacientes que se vayan incorporando al estudio. El promotor del ensayo facilitará en la última semana de cada mes un listado de los números de Registro que precisan tratamiento en cada Hospital Asociado al estudio.

El Servicio de Farmacia del Hospital Clínico San Cecilio a través de su Jefe de Servicio será la encargada de la Liberación de los Lotes, dicha evaluación incluye:

- Verificar el registro de los lotes liberados mensualmente.
- Verificar la Fecha de etiquetado y Acondicionamiento primario.
- Se realizará un examen visual de los lotes para que exista homogeneidad tanto en el contenido como en el etiquetado.
- Verificar la Fecha de envío y el destino al que corresponde.
- Verificación de las condiciones de almacenamiento y transporte.

El contenido de cada una de las intervenciones y su número de registro se extraerán del listado de aleatorización elaborado al efecto.

La documentación de los lotes se conservará 2 años después de la finalización del ensayo y en cumplimiento de la Directiva 2003/94/CE, además de muestras control.

### *8.1.7. Análisis de estabilidad de placebo*

#### *Objetivo general*

El objetivo general del presente estudio es determinar la estabilidad química del antibiotico trimetoprima en jarabe preparado por dilución con agua a la mitad, a partir de la especialidad farmacéutica “Tediprima 100 mL suspensión”. Se determinará la estabilidad del antibiotico durante un periodo de cuatro meses almacenado a temperatura ambiente y a 4 °C en frigorífico.

Este objetivo general se está desarrollando a través de los siguientes objetivos particulares:

#### *Objetivos particulares*

1. Puesta a punto y caracterización de un método basado en cromatografía líquida para la determinación del antibiotico trimetoprima en presencia del conservante nipagín (*p*-hidroxibenzoato de metilo), atendiendo a la consecución de una adecuada separación del conservante nipagín, así como a una adecuada sensibilidad y reproducibilidad para este problema concreto.
2. Estudio de la estabilidad química de la trimetoprima almacenada en botellas opacas a temperatura ambiente y a 4 °C en frigorífico durante un periodo de 4 meses.

#### *Plan de trabajo*

El plan de trabajo seguido para la consecución de los objetivos arriba indicados, se desarrolló a partir de dos bloques bien diferenciados, que se indican a continuación:

- A. Desarrollo del procedimiento cromatográfico para la determinación del antibiótico trimetoprima.

A.1. Estudio y evaluación del procedimiento propuesto por el Laboratorio Estedi, S.L. para la determinación de este compuesto mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

A.2. Adaptación de dicho proceso cromatográfico para la determinación de la trimetoprima en presencia del conservante nipagín. Selección de las condiciones cromatográficas y optimización de los parámetros químicos e instrumentales influyentes sobre la separación cromatográfica.

A.3. Caracterización analítica del método cromatográfico (intervalo de linealidad, función de calibrado, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión, etc) y validación del procedimiento analítico propuesto.

B. Estudio de estabilidad del antibiotico trimetoprima almacenada en botellas opacas a temperatura ambiente y a 4 °C en frigorífico durante un periodo de 4 meses.

Este estudio se realizó en los laboratorios acondicionados para la realización de experimentación química e instrumentación que el Grupo de Investigación Espectrometría en Fase Sólida dispone en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, así como en instalaciones de elaboración de mezclas intravenosas propias del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario San Cecilio. Todos los productos químicos usados en este estudio son de grado reactivo y el agua empleada es de tipo ósmosis inversa (Equipo Milli-RO 12 y Milli-Q de Millipore).

#### *Reactivos*

Los estándares de referencia empleados han sido la trimetoprima y el nipagín amablemente cedidos por Laboratorio Estedi S.L. (Barcelona). También se han utilizado acetonitrilo y metanol calidad HPLC (Lab-Scan, Gliwice, Polonia).

Las disoluciones estándar de trimetoprima y nipagín de 250,0 mg/L fueron preparadas en metanol. A partir de estas disoluciones y mediante dilución también con metanol se prepararon las disoluciones intermedias y de trabajo. Se chequeó periódicamente la estabilidad de estas disoluciones, siendo estables durante al menos un mes guardadas en botellas opacas y refrigeradas a 4 °C.

La especialidad farmacéutica empleada en la elaboración de las muestras que se someten al estudio de estabilidad, es *Tediprima 100 mL suspensión* (Laboratorio Estedi, S.L.)

#### *Instrumentación empleada*

Cromatógrafo de líquidos Agilent, serie 1100 equipado con bomba cuaternaria, desgasificador on-line, inyector automático, compartimento de termostatación de la columna y con detector de fila de diodos (DAD). Columna cromatográfica C-18 Agilent de 5 µm de tamaño de partícula y dimensiones 125 x 4,6 mm. Espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard 8453. Balanzas analíticas Mettler AE 163, con rango de pesada

0,0001-160 g y precisión 0,1 mg, y AND GR 200, con rango de pesada 0,001-210 g y precisión de 1 mg. Frigorífico Indesit. Termómetros: Testo 175-t1 v01.02 Logger.

Campana de flujo laminar horizontal clase 100 Telstar BH-10.

Además, se dispone de diferente material de uso común en un laboratorio de química analítica, así como de material de vidrio, normal y calibrado y reactivos químicos diversos.

#### *Preparación de las muestras y almacenamiento*

Para el estudio de estabilidad se preparó un volumen adecuado de jarabe por dilución con agua a la mitad de la especialidad farmacéutica *Tediprima 100 mL suspensión*. Este volumen se almacenó a temperatura ambiente y a 4 °C en frigorífico en botellas ámbar de vidrio.

#### *Estudio de estabilidad*

El estudio de estabilidad se realizó durante cuatro meses analizando el jarabe almacenado a temperatura ambiente y a 4 °C los días: 0, 1, 3, 5, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120. Las condiciones de almacenamiento utilizadas fueron las siguientes: a temperatura ambiente y protegidas de la luz ambiental, y en frigorífico a temperatura de 4° C.

#### *Controles de calidad*

En cuanto al equipo cromatográfico, se ha verificado la deriva del detector, la linealidad del inyector, así como la reproducibilidad del inyector, encontrándose todos los valores dentro de los niveles de tolerancia establecidos previamente.

El control de temperatura de almacenamiento se realiza con el empleo de termómetros Testo 175-t1 v01.02 Logger colocados tanto en la habitación como en el frigorífico donde se conservaron los analitos.

#### *Resultados*

Optimización de las variables cromatográficas: En primer lugar se procedió a la adaptación del método propuesto por Laboratorio Estedi S.L. para la determinación cuantitativa del antibiótico trimetoprima en presencia del conservante nipagín. Para ello se tuvieron que modificar, el volumen de inyección, el intervalo de linealidad de la función de calibrado y el volumen de muestra de jarabe a analizar. También se procedió a ajustar el valor de pH de la fase móvil de manera que permitiera una correcta separación cromatográfica del antibiótico trimetoprima del conservante nipagín. Así pues, las condiciones instrumentales empleadas para la determinación de la trimetoprima fueron:

- Volumen de inyección: 5 µL.
- Velocidad de flujo: 1,0 mL/min.
- Composición fase móvil: Agua/acetonitrilo/trietilamina (175:50:0.25) ajustada a pH 5,45 con ácido acético diluido (1/100 en agua).

- Columna: C-18, 150 x 4,6 mm diámetro interno, 5  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula, comuna analítica ODS (Agilent Thecnologies, USA) .
- Temperatura de la columna: 25 °C.
- Longitud de onda: 250 nm.

#### *Determinación de parámetros característicos del método*

Al objeto de caracterizar los parámetros analíticos del método de análisis empleado en el estudio de estabilidad, se obtuvo la función de calibrado, el intervalo de linealidad, y los límites de detección y cuantificación. Debido la modificación introducida en el método inicialmente propuesto por Laboratorio Estedi S.L. en cuanto al volumen de muestra de jarabe a analizar, se procedió a un nuevo estudio de su repetibilidad (reproducibilidad para un mismo día) y su reproducibilidad (estudiada a 5 días).

#### *Función de calibrado e intervalo de linealidad*

El intervalo lineal de concentraciones es aquel en donde se cumple que la respuesta de la señal analítica con la concentración se ajusta a una función matemática lineal del tipo  $y = a + bx$ . Para determinar este intervalo de concentraciones se emplearon disoluciones patrón de la trimetoprima, preparadas según el procedimiento indicado anteriormente, conteniendo concentraciones crecientes de la misma y replicando cuatro veces cada nivel de concentración ensayado. De esta manera, se pueden aplicar a los datos diversos test estadísticos para corroborar la linealidad de la función de calibrado así obtenida. El primer punto del intervalo de linealidad establecido fue el límite de cuantificación, mientras que el límite superior del intervalo de cuantificación se ajustó a las necesidades del problema. La Tabla 8.3 muestra el valor del intervalo de linealidad estudiado, así como la función de calibrado establecida y los parámetros estadísticos relacionados con ellas.

Tabla 8.3. Función de calibrado.

Parámetro	Trimetoprima
Intervalo de linealidad estudiado (mg/L)	15,0 – 250,0
b (pendiente)	8
$S_b^{(1)}$	0,11
a (ordenada en el origen)	22,3
$S_a^{(2)}$	16,3
$R^2$ (%) <sup>(3)</sup>	99,6
Linealidad (%)	98,6

(1) Desviación estándar de la pendiente

(2) Desviación estándar de la ordenada en el origen

(3) Coeficiente de correlación en porcentaje

De los valores obtenidos en el estudio tanto de los residuos de la función de calibrado así como del test del fallo de ajuste a la linealidad, se pudo afirmar que la respuesta de la señal obtenida con la concentración de la trimetoprima es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado, y que su comportamiento se ajusta a la función que se muestra en la tabla anterior (Tabla 8.3).

#### *Límite de detección*

El límite de detección se obtuvo a partir de los datos del calibrado, y su valor es: 4,1 mg/L.

#### *Límite de cuantificación*

De forma análoga al límite de detección, este se obtuvo también a partir de los datos del calibrado: 8.2 mg/L.

#### *Exactitud y precisión del método*

Se caracterizó el método en cuanto a su exactitud y precisión, dado que se modificó el volumen de jarabe empleado para la extracción. Esto fue por que en el método propuesto por el Laboratorio Estedi S.L. el volumen de jarabe era de 100 mL, el total de un preparado, lo cual permite el lavado y posterior arrastre del jarabe que queda en las paredes del envase. En el problema objeto de estudio, la toma de 100 mL de una muestra de jarabe diluida preparada a partir de un volumen mayor, introducía pérdidas de dicha muestra de jarabe en las paredes del material de laboratorio empleado con tal fin. Este hecho se traducía en bajos resultados en los estudios de recuperación y reproducibilidad, con valores inferiores al 90 % en el primer caso y superiores al 7 % en el segundo caso.

Por otra parte, al tratarse de una suspensión y no poder emplear todo el volumen preparado para su posterior análisis, se optimizó el tiempo de sonicación en baño de ultrasonidos para la homogenización de la suspensión previo a la toma de muestra. Así, el tiempo de sonicación establecido ha de ser como mínimo de 15 minutos, y el volumen de muestra que se analiza de jarabe es de 10 mL. En función de estos 10 mL, se adecuó el procedimiento del tratamiento de la muestra previo a la inyección en el cromatógrafo. Este quedó finalmente como se detalla a continuación: “*Se toma el jarabe y se somete a sonicación durante 15 minutos. A continuación, se toman con pipeta 10 mL de muestra del jarabe diluido y se llevan a un matraz de 25 mL. Se pasan 10 mL de metanol por la pipeta para recoger los restos de jarabe que quedan en las paredes y se transfieren al matraz de 25 mL. Este matraz se enrasa a 25 mL con metanol y se somete a agitación mecánica durante 20 minutos. Se toman 25 mL de esta disolución y se someten a centrifugación durante 10 minutos a 10.000 rpm. Se toma 1 mL del sobrenadante y se llevan a un matraz de 25 mL enrasando con metanol. De esta disolución se toma un volumen que se filtra con filtros de 5 µm de tamaño de poro y se inyectan 5 µL en el cromatógrafo para su análisis*”.

La exactitud y la reproducibilidad se evaluaron mediante el cálculo del porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación obtenido en un mismo día y a lo largo de medidas obtenidas en 5 días sucesivos. La concentración del principio activo trimetoprima ensayada en este estudio fue la misma que se emplea en el estudio de

estabilidad, 0.80 g/100 mL. Los resultados obtenidos en este estudio se exponen en la siguiente tabla (tabla 8.4).

Tabla 8.4. Estudio de exactitud y precisión del método propuesto para la determinación de trimetoprima en la especialidad farmacéutica Tediprima 100 mL Suspensión.

Concentración Trimetoprima (g/100 mL)	Recuperación (%)	Reproducibilidad	
		(C.V. %)	
		Intra-día (n = 16)	Inter-día (n = 5)
0.800	99.97	1.9	3.1

Puede comprobarse por los datos de la anterior tabla, que el método propuesto es exacto y reproducible para la determinación del principio activo trimetoprima en la especialidad farmacéutica Tediprima 100 ML Suspensión, diluida ésta a la mitad (0.8 g/100 mL).

*Estudio de estabilidad durante 120 días (4 meses) del principio activo trimetoprima en la especialidad farmacéutica Tediprima 100 ML suspensión, diluida esta a la mitad (0,8 g/100 mL).*

Una vez comprobada la validez del método propuesto para la determinación del principio activo trimetoprima en la especialidad farmacéutica Tediprima 100 ML Suspensión, diluida ésta a la mitad (0.8 g/100 mL), se procedió a evaluar su estabilidad en la citada especialidad farmacéutica durante un periodo de cuatro meses, conservado a temperatura ambiente sin protección de la luz solar, y en frigorífico a 4.0 °C. Para ello, se preparó suficiente volumen de jarabe diluido, del cual se fueron tomando alícuotas de 10 mL y se procedió a su análisis periódico, partiendo del día cero correspondiente a su preparación y almacenamiento, y posteriormente se analizaron los días 1, 3, 5, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 (cuatro meses). Para el cálculo de la recuperación se empleó la concentración determinada el día cero correspondiente a su preparación. En las tablas 8.5 y 8.6 se recogen los resultados de concentración obtenidos y las correspondientes recuperaciones para la estabilidad del trimetoprim conservado durante unos cuatro meses a temperatura ambiente (tabla 8.5) y en frigorífico a 4,0 °C (tabla 8.6). En las figuras 8.1 y 8.2 se muestran estos resultados gráficamente.

Tabla 8.5. Estabilidad del principio activo trimetoprima conservado durante 120 días a  $t^a$  ambiente. Dilución a la mitad de la especialidad farmacéutica Tediprima 100 mL Suspensión. Datos de concentración y recuperación.

Día	Concentración Trimetoprima	Recuperación
	(g/100 mL)	(%)
0	0,7910	100,0
1	0,7488	94,7
3	0,8280	104,7
5	0,8287	104,8
7	0,7314	92,5
15	0,8168	103,5
30	0,8068	102,0
45	0,7941	100,4
60	0,6997	88,5
75	0,7858	99,3
90	0,7381	93,3
120	0,7792	98,5

Tabla 8.6. Estabilidad del principio activo trimetoprima conservado durante 120 días a 4 °C en frigorífico. Dilución a la mitad de la especialidad farmacéutica Tediprima 100 mL Suspensión. Datos de concentración y recuperación.

Día	Concentración Trimetoprima	Recuperación
	(g/100 mL)	(%)
0	0,7910	100,0
1	0,7760	98,9
3	0,7603	96,1
5	0,7821	98,9
7	0,6865	86,8
15	0,7503	94,9
30	0,7815	98,8
45	0,8284	104,7
60	0,7309	92,4
75	0,7266	91,9
90	0,7382	93,3
105	0,7752	98,0
120	0,8347	105,5

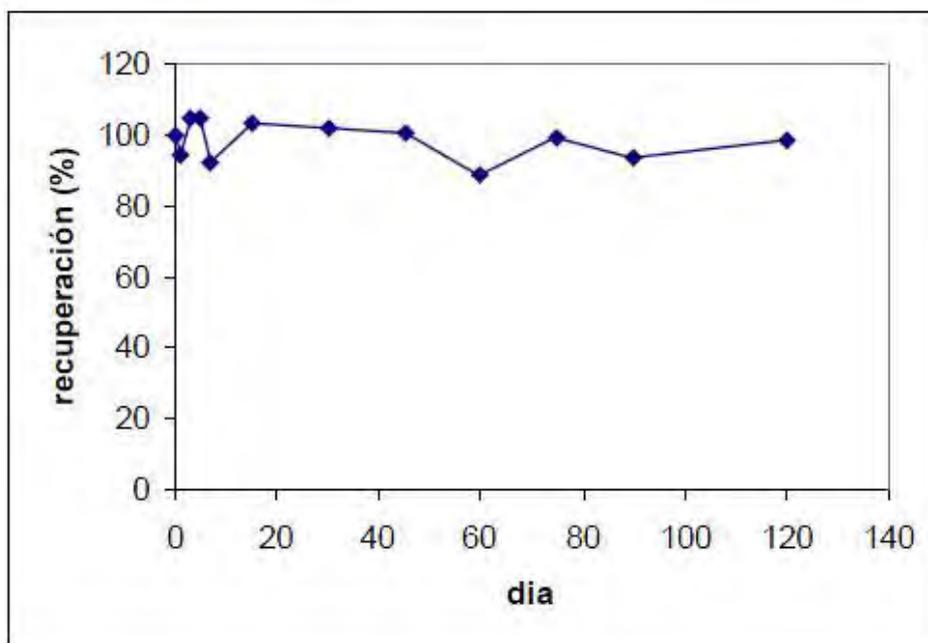


Figura 8.1. Estabilidad del principio activo trimetoprima conservado durante 120 días a  $t^{\circ}$  ambiente. Dilución a la mitad de la especialidad farmacéutica Tediprima 100 mL Suspensión.

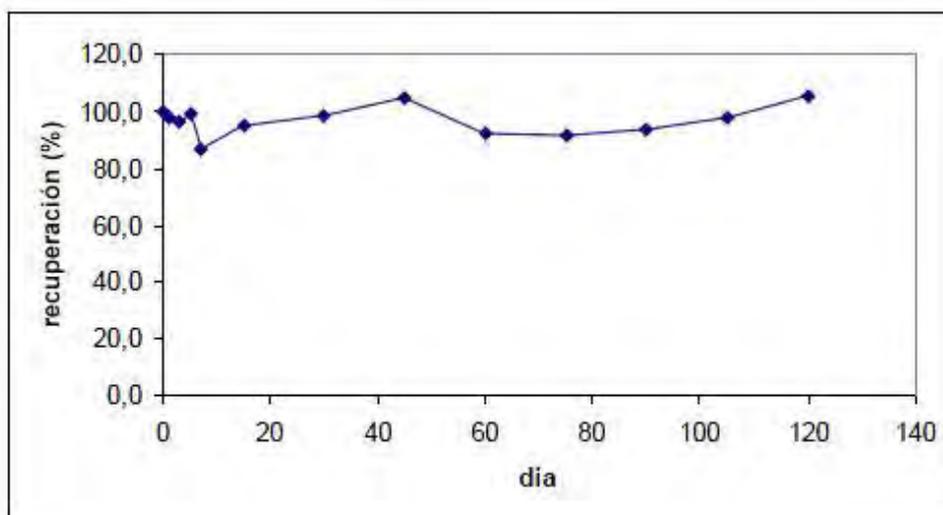


Figura 8.2. Estabilidad del principio activo trimetoprima conservado durante 120 días a  $4,0^{\circ}$  C en frigorífico. Dilución a la mitad de la especialidad farmacéutica Tediprima 100 mL Suspensión.

Del análisis de los datos y gráficos anteriores puede concluirse que el principio activo trimetoprima en la especialidad farmacéutica Tediprima 100 mL Suspensión, diluida ésta a la mitad (0.8 g/100 mL), es estable durante el tiempo estudiado de 120 días (cuatro meses).

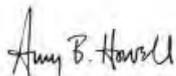
### 8.1.8. Análisis de estabilidad y bioactividad del jarabe de arándano.

Se realizó por un laboratorio externo al Proyecto. Se analiza la bioactividad del extracto utilizado para elaborar el jarabe (Gikacran). Se adjunta informe de bioactividad, *October 8, 2009. Activity Report on GIKACRAN Samples. Testing performed at Rutgers University in Amy Howell's laboratory.*

Las muestras de Glikacran fueron estudiadas con respecto a su actividad anti-adhesiva *in vitro* y en base a su peso. Muestras de 60 mg/mL se suspendieron en PBS, neutralizado con 1 N NaOH, diluidas secuencialmente (cada 2 pocitos), y analizadas como agente anti-adherente bacteriano utilizando un ensayo específico de hemaaglutinación para *E. coli* P fimbriado uropatógeno de acuerdo a lo descrito por Foo y colegas en *Phytochemistry*<sup>35</sup>. Una gota de 30 µL de cada dilución se incubó con 10 µL de suspensión bacteriana en un plato de poliestireno de 24 pozos durante 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Una muestra recién extraída de concentrado de hematíes (A1, Rh+) fue suspendida al 3% en PBS y entonces añadida separadamente en gotas de 10 µL a las suspensiones de las muestras previamente preparadas. Tras volver a incubar a temperatura ambiente dichas mezclas durante 20 minutos en un agitador rotatorio, se procedió a evaluar microscópicamente la habilidad de inhibir la aglutinación de hematíes. La concentración a la cual la hemoaglutinación se vio suprimida al 50% se usó como indicadora de la actividad de anti-adhesión bacteriana. Los ensayos de anti-adhesión se repitieron 3 veces obteniendo un valor medio de los resultados. Los pozos control incluyeron: bacterias+PBS, Hemoconcentrado+ PBS, bacterias + muestra test, hemoconcentrado + muestra test, y bacterias + hemoconcentrado.

Date	Sample ID	Bioactivity ( <i>in vitro</i> ) Threshold (mg/mL)
12/12/2006	4-JKC-2576	0.234
2/23/2006	5-JKC-0157	0.468 - 0.937
5/21/2007	6-JKC-0747	0.468
10/3/2007	7-JKC-1917	0.468
5/27/2008	8-JK-C-3237	0.468
4/16/2008	9-JK-C-0608	0.468
8/8/2008	10-JK-C-2058	0.234
11/10/2008	11-JK-C-2958	0.234
4/2/2009	12-JK-C-0839	0.234
10/8/2009	13-JK-C-2439	0.234

The bioassay results on the GIKACRAN samples indicate that they possess potent bacterial anti-adhesion activity against P-fimbriated uropathogenic strains of *E. coli*. The bioactivity threshold of 0.234-0.937 mg/mL is exceptionally high compared to other arándano americano powders we have tested. Most whole arándano americano powders have a bioactivity threshold of between 3 and 30 mg/mL.



Amy Howell, Ph.D.  
Research Scientist, Rutgers University

### 8.1.9. Dosis y administración

Se administrará una dosis nocturna de 0.2 mL/Kg/día máximo 5 mL por vía oral tanto del control (Trimetoprima) como en el grupo experimental (extracto de arándano rojo). La administración debe ser antes de la cena, de producirse vómito en los 30 min siguientes a su administración se repetirá la dosis íntegra.

### 8.1.10. Etiquetado

Se conservará un inventario detallado de los envíos realizados por los fabricantes de los jarabes de trimetoprima (Tediprima®) y extracto de arándano antes de su reenvasado y etiquetado, consignando fechas de recepción, dirección de envío, lotes y fechas de caducidad de los medicamentos. De acuerdo al Anexo 13 de la Normativa de la AEMYPS referente a etiquetado de medicamentos en investigación las etiquetas recogerán información relativa a:

- a) Nombre, dirección y teléfono del promotor, de la organización de investigación por contrato o del investigador (del principal contacto para informar sobre el producto, el ensayo clínico y forma de actuación ante un desenmascaramiento de urgencia);
- b) Forma farmacéutica, vía de administración, número de unidades y, en el caso de ensayos abiertos, nombre o identificación del medicamento y concentración o potencia;
- c) Número de lote y /o código para identificar el contenido y la operación de acondicionamiento;
- d) Código de referencia del ensayo, que permita identificar al ensayo, el centro de ensayo, investigador y promotor si no figura en otro lugar.
- e) Número de identificación del sujeto del ensayo/número de tratamiento.
- f) Nombre del investigador (si no se incluye en el apartado (a) o (d)).
- g) Instrucciones para el uso (se entregará por el médico que reclute al paciente para el estudio);
- h) “Exclusivamente para uso en ensayo clínico” o una advertencia similar;
- i) Manténgase refrigerado.
- j) Período de validez o fecha límite de uso (1 mes tras fecha de reenvasado).
- k) “Manténgase fuera del alcance de los niños”

Medicamento para uso exclusivo en el ensayo **PI070274**  
 Promotor: Dr. José Uberos – Fondo de Investigaciones Sanitarias. I. Salud  
 Carlos III de Madrid. Grupo CTS-190, Universidad de Granada y Servicio Andaluz de Salud. Teléfono contacto: 958-023996  
**Nº Registro del tratamiento: 180x - xxx**  
**Lote: xxx**  
**Nº identificativo del paciente: 180x - xxx**  
**Uso exclusivo por vía oral a la dosis facilitada por su médico**  
 Manténgase refrigerado una vez abierto. Manténgase fuera del alcance de los niños  
 Fecha de caducidad: \_\_\_\_\_

### 8.1.11. Protocolo de apertura del ciego

En los casos que se requiera por trastorno grave podrá revelarse la medicación administrada al médico que atiende el paciente. Para ello se consultará en el listado de aleatorización adjunto al presente protocolo el número de registro de la medicación y se comprobará que concuerda con el número de lote y el nombre del paciente en la ficha de Farmacia que se almacenará en la Sección de ensayos clínicos del Servicio de Farmacia del Hospital Clínico.

Además, en caso de que no exista personal en el Servicio de Farmacia se facilitará a los investigadores unos Sobres de Aleatorización que irán sellados y cerrados, para que puedan abrirlos en caso de urgencia.

### 8.1.12. Retirada de la medicación

La Retirada de la medicación se gestiona bajo el Protocolo de actuación de alertas farmacéuticas. Se dará en el caso de que exista algún defecto en la calidad y se considere que no se cumplen todas las condiciones para que la medicación sea de óptimo consumo. Por tanto, en un primer momento se hará una trazabilidad de los lotes implicados, y una vez identificados se apartarán en cuarentena de modo de que no exista riesgo de que se puedan mezclar con el resto de medicación.

En caso de verificarse que no se cumplen las condiciones correctas se procederá a la Destrucción de la medicación bajo las mismas condiciones que el resto de medicamentos del Servicio de Farmacia. Se llevará un registro donde conste la fecha de destrucción, la cantidad destruida y la justificación de dicha destrucción.

## 8.2. Método clínico, seguimiento de pacientes

### 8.2.1. Diseño global del estudio

La incidencia acumulada de infección urinaria en los primeros 5 años de vida es del 5%. De estas infecciones urinarias se considera que el 25% asocian algún grado de reflujo y que al menos un 20% van a tener una segunda infección urinaria en el año siguiente. La población de niños de 0-5 años en la provincia de Granada era de 52000 en 2005. Sobre esta población se realizará nuestro estudio. Ello supone que son diagnosticadas todos los años 2600 nuevas infecciones de orina, en las que se detectará algún grado de reflujo vésicoureteral en 650 niños y en 520 se presentará recurrencia de la infección urinaria. Según protocolo de actuación en la infección urinaria recomendado por la AEP en niños con una primera infección de orina confirmada por urocultivo se debe realizar una ecografía renal y de vías urinarias y todos aquellos pacientes con hallazgos patológicos en la misma deben ser remitidos a una consulta de nefrología/urología pediátrica para completar estudio, incluyéndose entre las exploraciones complementarias recomendadas la realización de una cistourografía miccional seriada (CUMS). Presuponemos un reclutamiento de al menos el 50% de los casos diagnosticados en nuestra Área, porcentaje motivado fundamentalmente por la

dispersión de algunos municipios (Alpujarras y Área Norte de la Provincia) y el difícil acceso a los Centros Hospitalarios.

#### *8.2.2. Periodo de preinclusión o lavado, seguimiento, etc*

Una vez incluido el paciente en el estudio, firmado el consentimiento informado y asignada la intervención, se procederá a determinar la recurrencia de infección urinaria mediante un programa de revisiones periódicas cada 2 meses o a demanda del paciente cuando la sintomatología así lo demande. Se le dará al paciente la instrucción de realizar un cultivo de orina ante la presencia de fiebre, síntomas urinarios, vómitos o pérdida de peso; cultivo que deberá realizar antes de iniciar cualquier tratamiento antibiótico. Con este objeto se le facilitarán al paciente las peticiones de analítica pertinentes y las instrucciones para la realización del mismo; así mismo se le facilitará al paciente (padres/tutor) un teléfono de contacto para solicitar instrucciones complementarias si fuesen precisas. En el cuaderno de recogida de datos, se registran los datos relativos al número de la intervención asignada, los datos clínicos y analíticos de cada una de las revisiones programadas del paciente y los resultados periódicos de los cultivos de orina que se irán realizando. La efectividad de una intervención se valora en función del tiempo de permanencia en el estudio sin recurrencia de la infección de orina. Para ello se registra el momento en que se produce la infección de orina que motiva la salida del paciente del estudio. En cumplimiento de los objetivos secundarios planteados en el ensayo se debe registrar el resultado del urocultivo positivo que ha motivado la salida del paciente del estudio y las resistencias del microorganismo aislado a los antibióticos.

#### *8.2.3. Criterios diagnósticos*

Una vez seleccionado un paciente (según los criterios de inclusión del punto anterior) que cumpla los criterios de inclusión anteriormente descritos se cumplimentará el Registro inicial del Cuaderno de recogida de datos y se le comunicará al Coordinador del estudio su inclusión en el ensayo, quien procederá a asignarle un número de Registro. Las siguientes referencias realizadas sobre este paciente, así como sus incidencias relativas a recidivas infecciosas, bajas voluntarias en el estudio o finalización del mismo se harán con este número de identificación asignado. El investigador que incluya al paciente en el ensayo les entregará a los padres del paciente una cartulina con el número de identificación, esta cartulina deberá presentarla en el Servicio de Farmacia hospitalaria para retirar el tratamiento asignado que no deberá llevar etiquetas identificativas de la intervención asignada.

#### *8.2.4. Criterios de retirada*

Cualquier paciente podrá solicitar salir del estudio de forma voluntaria, considerándose en ese caso como casos censurados. La efectividad de una intervención se valora en función del tiempo de permanencia en el estudio sin recurrencia de la infección de orina. Para ello se registra el momento en que se produce la infección de orina que motiva la salida del paciente del estudio. En cumplimiento de los objetivos secundarios planteados en el ensayo se debe registrar el resultado del urocultivo positivo que ha motivado la salida del paciente del estudio y las resistencias del microorganismo aislado a los antibióticos.

### 8.2.5. Duración aproximada del periodo de reclutamiento

La duración del periodo de reclutamiento será de 1 año, con 1 año de seguimiento máximo.

### 8.2.6. Desarrollo del ensayo

La posibilidad de obtener falsos positivos o negativos en los urocultivos de control del paciente, hace que nos planteemos la ocurrencia de un sesgo de información. Existe posibilidad de obtener un urocultivo negativo en pacientes que realmente tienen una infección urinaria si han recibido de forma previa a la recogida de la muestra de orina tratamiento antibiótico. Por ello, se insistirá en la necesidad de recoger un urocultivo ante cualquier proceso febril antes de iniciar cualquier tratamiento antibiótico prescrito. En los casos donde se constate la recogida de la muestra de orina después del inicio del tratamiento antibiótico y que se observe un sedimento de orina muy patológico con leucocituria marcada, bacteriuria y nitritos positivos con clínica sugerente de infección de vías urinarias se considerará finalizado el periodo de seguimiento valorando el proceso como infección de orina sin confirmación bacteriológica.

Además se pueden obtener urocultivos positivos por mala técnica en la recogida de orina y contaminación de la orina. En estos casos se valorará igualmente el sedimento de orina valorándose los urocultivos como contaminados si no se acompañan de la constatación de leucocituria en el sedimento de orina.

El sesgo de información se pretende evitar además con las técnicas de depuración de los datos, el uso de bases de datos informáticas con sistemas de limitación en la entrada de datos erróneos (fechas).

La metodología de selección de los pacientes y la imposibilidad de seleccionar todas las infecciones urinarias reclutables durante el periodo de estudio por razones sobre todo geográficas hace que nos planteemos la posibilidad de ocurrencia de un sesgo de selección. Para intentar controlarlo, durante el periodo de estudio se contactará mensualmente con los pediatras del Área sanitaria recabando información sobre infecciones de orina diagnosticadas y que no se hallan podido incluir en el estudio. Los aspectos que se considerarán serán los relativos a edad, sexo, peso y talla y municipio de residencia que se registrarán en una base de datos de “infecciones de orina no reclutadas”.

El seguimiento de pacientes lo realizará el investigador colaborador que ha realizado el reclutamiento. El investigador principal será el encargado de recibir y ordenar toda la documentación facilitada por los investigadores colaboradores y facilitar esta documentación a un colaborador ajeno al estudio para introducción en la base de datos como paso previo para la fase de análisis.

### 8.2.7. Garantía de confidencialidad

El monitor y los investigadores que colaboren en el estudio tendrán acceso a los datos de los pacientes, disponibles en el cuaderno de recogida de datos. El investigador

principal garantizará la confidencialidad de cualquier información acerca de los sujetos del ensayo.

#### *8.2.8. Responsabilidades de todos los participantes en el ensayo*

Las responsabilidades del promotor, monitor e investigadores, serán las que se desarrollaron en los artículos 35, 36, 37 respectivamente, del Real Decreto 223/2004 por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos.

#### *8.2.9. Condiciones de archivo de datos, su manejo y procesamiento, correcciones...*

El promotor será responsable del archivo de la documentación del ensayo incluyendo: protocolo, procedimientos normalizados de trabajo, informes, manual del investigador, carpeta de recogida de datos e informe final, el cual deberá conservar hasta 15 años después de haberse agotado el plazo de validez del medicamento. Se asegurará la confidencialidad de los datos y documentos contenidos en el archivo y se documentará cualquier cambio que se produzca en la posesión de los datos. Todos los documentos y los datos se pondrán a disposición de las autoridades competentes si estas lo solicitan.

#### *8.2.10. Identificación de muestras para investigación clínica y responsables de su suministro y conservación*

Todas las muestras del fármaco estarán etiquetados tal y como marca el Real Decreto. Biobanco del Hospital Clínico Universitario de Granada será responsable de su conservación, preparación y suministro en caso de que el diseño del ensayo así lo especifique y en función del número de aleatorización del paciente en caso de existir aleatorización.

#### *8.2.11. Condiciones de publicación*

La publicación de los resultados del ensayo se realizará en revistas científicas indexadas, mencionando los CEIC y haciendo constar la fuente de financiación que ha permitido la realización de estudio. En todo momento se mantendrá el anonimato de los sujetos participantes.

#### *8.2.12. Seguridad*

El arándano se ha mostrado seguro en los diversos ensayos clínicos publicados<sup>139, 141</sup>, también entre la población pediátrica<sup>141</sup>, mostrando una tasa de efectos adversos similar a placebo. La reglamentación sobre control y registro de los acontecimientos adversos durante el ensayo clínico se reproduce en el Anexo III.

#### *8.2.13. Seguro de responsabilidad civil*

Las características del seguro de responsabilidad civil se reproducen en el Anexo 5.

### 8.3. Método de laboratorio

#### 8.3.1. Conservación de las cepas y utilización.

Se inocula con un asa de siembra en un tubo con 5 ml de medio Müeller-Hinton y se incuba a 37°C durante 24 horas. Se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos y se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur de vidrio estéril, se resuspende en medio de cultivo Müeller-Hinton con glicerol al 20% y seroalbúmina bovina (v/v) al 5%. Se traslada la suspensión a un vial de polipropileno estéril de 2 mL y se almacena a -30°C.

Para su utilización posterior los viales de polipropileno se depositan unos 15 minutos a temperatura ambiente, con un asa de siembra se inoculan tubos con 4 ml de medio de cultivo Müeller-Hinton y se incuban a 37°C durante 24 horas, posteriormente se siembra en placa de Müeller-Hinton por aislamiento y se incuba a 37°C durante 24 horas.

#### 8.3.2. Caracterización de las cepas

En las cepas de *Escherichia coli* se determinó la utilización de lactosa, para ello se siembran por aislamiento en una placa de Petri con agar McKonkey, se incuba a 37°C durante 24 horas, se determina la utilización de lactosa en función del color de las colonias, colonias de color rojo (lac+) indica utilización de lactosa; las colonias de color amarillo (lac-) indica no utilización de lactosa.

#### 8.3.3. Condiciones de cultivo

Para cada experimento las cepas de *E. coli* fueron inoculadas en tubos conteniendo 4 ml de Müeller-Hinton caldo (Fluka) (MH), se incubaron a 37° C durante 24 horas antes de su procesamiento.

#### 8.3.4. Análisis de la actividad antiadherente de *E. coli* P-fimbriado

Se utilizan 9 cepas de *E. coli* uropatógeno aisladas en pacientes con pielonefritis aguda (*E. coli* 695, 787, 471, 472, 593, 595, 760, 629 y 607) y 4 cepas de *E. coli* procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo: CECT 424 (F<sup>-</sup> thr<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> lacY mtl<sup>-</sup> thi<sup>-</sup> ara gal ton 2 malA xyl. Resistente a fagos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>6</sub>.), CECT 4076 (Serovar. O157:H7. Aislada originariamente de colitis hemorrágica) y CECT 417 (SupE44(am). TRNA mutante), CECT 743 (Serovar. O142 K86B:H6. Aislada de niños con diarrea).

Para potenciar la actividad de las fimbrias tipo 1<sup>176</sup>, las cepas se cultivan en medio TSB caldo a 37°C durante 48 horas, se centrifugan a 2000 xg durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante, posteriormente se resuspenden en PBS (pH 7.4), este proceso de lavado se repite dos veces. Finalmente se ajusta la suspensión de bacterias a 10<sup>9</sup> bacterias/mL (DO de 1.0 a 542 nm). Para potenciar la actividad de las fimbrias tipo P, las cepas se incuban durante 16 horas en CFA agar<sup>177</sup>, se recogen de la superficie del agar tras lavado con 5 mL de PBS, la suspensión se centrifuga a 2000 xg durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante, lavando dos veces, finalmente las bacterias se resuspenden en PBS con manosa al 1% hasta conseguir una concentración de 10<sup>9</sup> bacterias/mL (DO de 1 a 542 nm).

Tabla 8.7. Características de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de sujetos con patología urinaria aguda.

<i>Escherichia coli</i>	Características
629	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN-, PLI-, LAC+, SUC-, RHA-, OXI-
695	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR-, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
787	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN-, PLI-, LAC+, SUC-, RHA+, OXI-
472	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
471	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
792	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL- XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
697	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL-, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
595	DP3-, URE+, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC-, RHA+, OXI-
753	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC-, RHA+, OXI-
795	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
760	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
469	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC-, RHA+, OXI-

Tabla 8.8. Características de las cepas de *Escherichia coli* de la Colección Nacional de Cultivos Tipo (CECT) incluidas en el estudio.

<i>Escherichia coli</i> (CECT)	Características
434	Cepa modificada para ensayos de sensibilidad a cefalosporinas.
515	Serovar. O1: K1(L1):H7. Indol+, acetona+, catalasa+, oxidasa-.
516	Reduce ácido dehidroascórbico.
685	Serovar. O25: H42. Met.: toxina termolábil (LT +), toxina termoestable (ST +).
4076	Serovar. O157:H7. Aislada originariamente de colitis hemorrágica.
418	F lacY1 glnV44(AS) galT22 galk2(Oc) LAM <sup>-</sup> tyrT58(AS) metB1 hsdR514 trpR55.
743	Serovar. O142 K86B:H6. Aislada de niños con diarrea.
100	Mutante resistente a la radiación. UV:R, X-ray:R.
727	Serovar. O111: K58(B4):H-. Cepa enteropatógena.
417	SupE44(am). TRNA mutante.
424	F <sup>-</sup> thr <sup>-</sup> leu <sup>-</sup> lacY <sup>-</sup> mtl <sup>-</sup> thi <sup>-</sup> ara gal ton 2 malA xyl. Resistente a fagos T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> y T <sub>6</sub> .

Todos los componentes químicos fueron reactantes analíticos de HPLC. Se usaron conforme se recibieron. El ácido fórmico y acetonitrilo usados para preparar las fases móviles procedieron respectivamente de Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y LAB-Scan (Gliwice, Sowinsko, Polonia). Los disolventes se filtraron antes de su uso con un aparato de filtración de disolventes 58061 (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). La solución de puesta a punto de la mezcla para optimizar los parámetros de TOF era de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EEUU). Un G560E Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, EEUU), se utilizó como mezclador de vórtice. Agua destilada con una resistencia de 18.2 MΩ fue desionizada usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

### 8.3.5. Hemaglutinación

Se utiliza sangre de voluntarios con grupo A Rh+, se recoge en tubos con 100 µl de citrato al 3.8%, al que se añade 1 mL de sangre. Para las técnicas de hemaglutinación de las cepas manosa sensibles, la sangre se diluye en una proporción 1:4 con PBS. Para la hemaglutinación de las cepas manosa resistentes se diluye en PBS con methyl- α-D-mannopyranoside 0.1mM. Sobre un pocillo de microplaca con fondo de U, se añaden 50 µl de la suspensión de bacterias y 50 µl de sangre fresca diluida. Los resultados de hemaglutinación son visibles tras 45-60 minutos a temperatura ambiente.

### 8.3.6. Preparación del jarabe de arándano, procedimientos.

El jarabe de arándano, preparado como una suspensión de extracto (Gikacran) en jarabe de glucosa fue facilitado por Pharmatoka Lab. (France) el análisis químico inicial encargado por el laboratorio declara un contenido en proantocianidinas por old

Dimethylaminoethylamine Color Reaction (DMAC) mayor del 18% y mayor del 36% por NP-HPLC. La bioactividad antiadherente frente a *E. coli* comunicada para los lotes de jarabe suministrados equivale a 0.234 mg/mL de proantocianidina A (Rutgers University, New Jersey, USA).

Se realizan diluciones seriadas del jarabe de extracto de arándano en PBS (pH 7.4) a 1:10 y 1:100, se ajusta el pH a 7.0 con NaOH. 100 µl de cada dilución del extracto de arándano se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitador rotatorio con 1 mL de la suspensión de bacterias (DO 1 a 542 nm), de lo que resulta una dilución final aproximada del jarabe de extracto de arándano de 1:100 y 1:1000.

### 8.3.7. Determinación de la hidrofobicidad

La determinación de la hidrofobicidad de superficie de *E. coli* la analizamos con dos técnicas analíticas, el test de agregación en sulfato amónico<sup>178</sup> y el test de adsorción con hidrocarburos<sup>179</sup>.

#### 8.3.7.1. Test de agregación con sulfato amónico

Se utiliza la técnica descrita por Lindahl M. et al.<sup>178</sup>. Brevemente, se preparan soluciones de sulfato amónico con osmolaridades desde 0.2M a 4M, con fosfato sódico 0.002 M como diluyente. A 20 µl de la suspensión de bacterias se añade igual volumen de la solución de sulfato amónico. Se observa la presencia de agregación tras 30 segundos de rotación manual suave a temperatura ambiente sobre portaobjetos. Se anota la concentración más baja de sulfato amónico que produce agregación visible. La agregación con soluciones 4M se interpreta como hidrofobicidad del 0% y la agregación con soluciones 0.2M se interpreta como 95% de hidrofobicidad.

#### 8.3.7.2. Adherencia a hexadecano

La hidrofobicidad de superficie se determinó según técnica descrita por Rosenberg<sup>179</sup>. El cultivo de *E. coli* se realiza en tubos con 3 mL medio CFA agar o TSB caldo, según las especificaciones anteriores para aumentar la expresión de fimbrias tipo P o tipo 1.

#### Preparación de las cepas:

1. Se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante
2. Se lava con 3 mL de PBS, se centrifuga y se desecha el sobrenadante, se repite dos veces.
3. Se resuspende cada cepa en 6 mL de PBS. Se distribuye 2 mL en cada tubo (para 3 determinaciones)

#### Preparación del extracto:

Solución A: 100 mg de extracto en 10 mL de PBS (10 mg/mL). Tomamos 1 mL y completamos hasta 10 mL (1 mg/mL)

Solución B: 100 mg de extracto en 10 mL de PBS (10 mg/mL). Tomamos 1 mL y completamos hasta 19 mL (0.5 mg/mL). 2 mL de la Solución A y añadimos 2 mL de PBS.

Solución C: 100 mg de extracto en 10 mL de PBS (10 mg/mL). Tomamos 0.1 mL y completamos hasta 9.9 mL (0.1 mg/mL)

*Medida:*

1. Preparación de la solución problema: A 2 mL de suspensión de bacterias se añade 200 µl de la dilución A o B. Preparación de la solución control: A 1 mL de suspensión de bacterias se añade 100 µl de PBS
2. Sometemos a agitación fuerte durante 2 minutos.
3. Posteriormente se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante.
4. Se resuspende en 0.8 mL de tampón-PUM (pH 7.1) y añadimos 1.6 mL de sulfato amónico 0.2 M.
5. Midiendo con espectrofotómetro a 540 nm. Anotamos absorbancia del control ( $Abs_1$ ),
6. Añadimos a 2 mL de la suspensión de bacterias 400 µl de p-xileno (Sigma).
7. Sometemos a agitación fuerte durante 2 minutos de forma que se homogeneíen la suspensión y el hidrocarburo.
9. Esperamos 30 minutos a que la fase acuosa se separe completamente del hidrocarburo.
10. Con una pipeta Pasteur de vidrio aspiramos la fase acuosa y se mide la absorbancia ( $Abs_2$ ) en un espectrofotómetro a 540 nm y 37°C. La hidrofobicidad se calcula de acuerdo a la fórmula  $(1 - Abs_2 / Abs_1) \times 100 = \%$  de hidrofobicidad.

Calculo de % de hidrofobicidad  $1 - (absorbancia\ problema / absorbancia\ control) +$   
% hidrofobicidad de la cepa

### 8.3.7.3. Preparación de Búferes.

**PBS (Solución 10X)** Para su uso diluir 1:10.

Fosfato monosódico (1 H <sub>2</sub> O):	2.56 g.
Fosfato disódico	11.93 g.
Cloruro sódico	87.66 g.
Azida sódica	1 g.
Agua destilada	Hasta 1 litro.

**Tampón-PUM**

Fosfato monopotásico (PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K)	7.26 g.
Fosfato bipotásico (PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> 3H <sub>2</sub> O)	22.20 g.

Urea	1.80 g
Sulfato magnésico (SO <sub>4</sub> Mg 7 H <sub>2</sub> O)	0.2 g
Agua destilada	Hasta 1 litro.
Ajustar el pH a 7.1	

**Solución de sulfato amónico** a concentraciones de 0 a 4 M, utilizando como diluyente solución de fosfato sódico 0.002 M.

### 8.3.8. Adherencia a filtros de nitrocelulosa

Se realiza el procedimiento descrito por Lachica y Zink<sup>180</sup>. De forma resumida, una suspensión de bacterias en buffer PUM con sulfato amónico 0.2M (1:2, v:v) se ajusta a 10<sup>5</sup> bacterias/mL (DO 0.6 a 540 nm); se determina la absorbancia inicial (Abs<sub>1</sub>), se hacen pasar 3 mL de esta suspensión de bacterias a través de un filtro de nitrocelulosa de 8 µm de poro (Millipore). Posteriormente se determina la absorbancia del filtrado (Abs<sub>2</sub>) y los resultados se expresan como porcentaje de adherencia al filtro de nitrocelulosa.

### 8.3.9. Inhibición de la formación de biofilm<sup>181</sup>

#### Material

1. Tubos eppendorf 2 mL
2. Medio TSB
3. Cristal violeta al 2%.
4. Ácido acético al 33% (v/v).
5. Suero fisiológico estéril.
6. Espectrofotómetro, long. Onda 570 nm.

#### Método.

Se incuban las cepas a 37°C, durante 24 h., en tubos de vidrio con 2.5 mL de TSB caldo.

1. Se depositan en tubos eppendorf de 2 mL un volumen de 0.5 mL de cada cultivo anterior y 50 µl de extracto de cranberry y o las diluciones de sus fracciones:
2. Se utiliza como control negativo un tubo eppendorf con igual cantidad de TSB sin inóculo y como control positivo 0.5 mL de la suspensión de bacterias en el mismo tubo.

Tras 24 horas de incubación el contenido de cada tubo se aspira cuidadosamente con una pipeta y se lavan los tubos tres veces con 250 µl de PBS con agitación suave para remover las bacterias no adherentes. Los tubos se secan al aire y se añaden 200 µl de metanol al 99% como fijador. Se deja actuar durante 15 minutos, tras este periodo se desecha el sobrante y se dejan secar los tubos al aire. Se añade como colorante 0.2 mL de cristal violeta al 2% de Hucker, que se deja actuar durante 5 minutos, se desecha el sobrante sumergiendo los tubos en una cubeta con agua destilada. Posteriormente se

solubilizan las bacterias de cada tubo en 1 mL de ácido acético al 33%. Se mide la densidad óptica de la suspensión de cada tubo (OD) a 570 nm. Ajustamos el cero con ácido acético al 33%. Utilizamos como control negativo (ODc) la solución de TSB incubada sin inóculo. Los resultados se expresan de la siguiente forma:

$OD \leq ODc$ : Bacterias no adherentes.

$ODc \leq OD \leq 2 \times ODc$ : Bacterias ligeramente adherentes.

$2 \times ODc \leq OD \leq 4 \times ODc$ : Bacterias moderadamente adherentes.

$4 \times ODc \leq OD$ : Bacterias muy adherentes.

### 8.3.10. Determinación de los contenidos de fenólico total, proantocianidina y antocianina

Se disolvieron 100  $\mu$ L de sirope de arándano americano en 4 mL de metanol, agitándolo por vórtice durante 2 minutos y filtrándolo con un filtro de jeringa de politetrafluoroetileno (0.2  $\mu$ m de tamaño de poro). Se inyectó directamente en un sistema HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). El contenido fenólico total de arándano americano se determinó por triplicado mediante ensayo colorimétrico usando reagente Folin-Ciocalteu<sup>182</sup>. El contenido de proantocianidina (taninos condensados) se determinó de acuerdo con el método de vanillin/HCl<sup>183</sup>. Brevemente, se introdujeron 0.1-0.5 mL del extracto en los tubos de ensayo y se cubrió con papel aluminio. Se añadieron 3 mL de vanillin 4% w/v (porcentaje peso/volumen) en metanol se agito el tubo concienzudamente. Inmediatamente, se añadieron 1.5 mL de HCl concentrado en el tubo y se agitó de nuevo. La absorbancia se leyó a 500 nm después de dejar la muestra reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron en forma de equivalentes de catequina. La interferencia de fondo del extracto fue corregida preparando el ensayo sin vanillin. El contenido total de antocianina se determinó de acuerdo con el ensayo<sup>184</sup>. Brevemente, una porción de muestra de peso adecuado (2 a 5 g) se mezcló con la solución extractora (95% etanol: 1.5 N HCl – 85:15 v/v) y se dejó reposar en ausencia de luz durante una noche a una temperatura de 4° C. Las muestras se filtraron a un matraz volumétrico y se cubrieron con papel aluminio. Los residuos se lavaron exhaustivamente con solución extractora para eliminar por completo los pigmentos. La solución filtrada se llevó a un volumen de 100 mL con solución extractora y la absorbancia se leyó a 535 nm después de dejar reposar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se realizaron análisis de cromatografía líquida con un sistema LC Agilent 1200 series de rápida resolución (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) equipado con bomba binaria, inyector automático y un detector de red de diodos (DAD). La separación se llevó a cabo con una columna analítica Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (150mm x 4.6mm, 1.8  $\mu$ m tamaño de partícula). El gradiente de elución se realizó con dos fases móviles consistentes en agua (10% ácido fórmico) (fase A) y acetonitrilo (fase B) a un flujo constante de 0.5 mL/min usando siguiente gradiente: 0-13 minutos, gradiente lineal de 0% B a 20% B; 13-20 minutos, gradiente lineal de 20% B a 30% B; 20-25 minutos gradiente lineal de 30% B a 80% B; y 25-30 minutos gradiente lineal de 80% B a 0%B, y 30-35 minutos, isocrático de 0% B. El volumen de la inyección fue 10 $\mu$ L.

Se realizó una espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS) usando un espectrómetro de masas con aceleración ortogonal de tiempo de vuelo del tipo

microTOF<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). El sistema estaba equipado con una interfaz de ionización por electrospray. Los parámetros para el análisis fueron establecidos usando modos de ion positivo con espectros adquiridos en un rango de masas de 50-1000 m/z. Los otros valores óptimos de los parámetros ESI-MS fueron: voltaje capilar, 4500V; temperatura de gas seco 200°C; flujo de gas seco 7.0 l/min, presión del nebulizador 1.5 bar; y ratio de espectros 1 Hz. El flujo introducido en el detector de espectrometría de masas del HPLC se dividió usando un separador de flujo (1:2) para obtener resultados reproducibles y alcanzar una ionización por electrospray estable. El calibrante utilizado fue un formiato de sodio conteniendo 5mM de hidróxido de sodio y 0.2% ácido fórmico en agua:isopropanol (1:1 v/v), que se inyectó al comienzo de cada ensayo con una bomba de jeringa Cole Palmer 74900-00-05 (Vernon Hills, Illinois, EEUU), directamente conectada a la interfaz. Todos los espectros se calibraron antes de la identificación del compuesto. Todas las operaciones se controlaron mediante el software DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics), que proporciona una lista de posibles fórmulas elementales usando un editor GenerateMolecularFormula<sup>TM</sup>.

#### 8.4. Investigación documental

El objetivo fundamental de este capítulo se centra en la búsqueda de las fuentes de documentación, de las referencias bibliográficas correspondientes al tema de trabajo.

El sistema utilizado pasa por la elaboración de las palabras clave del proyecto "*Urinary tract infection*", "*Escherichia coli*", "*Hidrophobicity*", "*Adhesion*", "*Cranberry*", "*Poliphenols*". Los pasos seguidos en la investigación experimental fueron los siguientes:

- Determinación genérica del área a investigar: Se llevó a cabo una primera consulta a las enciclopedias, diccionarios, tratados, manuales y textos en la parte referente a las materias que en un principio motivaron el tema de la presente Tesis Doctoral.
- Inicio de la formación bibliográfica: El proceso de consulta se va completando con la toma de notas y referencias que finalmente constituirán la bibliografía de la tesis.
- Considerar la actualidad e interés del tema objeto de la investigación. Para lo que se seleccionaron el material documental, las líneas de investigación y los autores que más investigan y publican sobre los temas de interés.
- Superado el punto anterior, y en la nueva línea, se establecieron unos objetivos concretos como hipótesis de trabajo.
- Consulta de las fuentes documentales en relación a los objetivos concretos elegidos. Determinando las fuentes primarias en la literatura organizada (monografías y tratados) y no organizada (revistas, etc.), en las que encontramos la información necesaria, para lo que fue necesario revisar los siguientes repertorios médicos: "MEDLINE", "INDEX MEDICUS", "CURRENT CONTENT", "EXCERPTA MEDICA", "INDICE MEDICO ESPAÑOL".

- Consulta de los catálogos y ficheros de los Centros de Documentación existentes en Granada. Utilizando para ello la lista de palabras clave formada previamente, según se ha explicado.

El grupo de Vancouver, ha pasado a convertirse en el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas. Son más de 150, las revistas que han acordado que los trabajos se remitan según las normas y estilo de "Vancouver", que textualmente en el capítulo de referencias bibliográficas dice: "Las referencias se han de enumerar siguiendo el orden en que son mencionadas por primera vez en el texto. Señalar las citas en el texto, las tablas y los pies de las figuras, por medio de numeración árabe, entre paréntesis. Las referencias que son citadas sólo en las tablas o en los pies de las figuras, se numeran de acuerdo con el orden correspondiente al referido en el texto por primera vez a la tabla o las figuras. Utilizar el modo de citar en que se basa la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos empleada en el Index Medicus. Los títulos de las revistas han de abreviarse según el estilo empleado en el Index Medicus para lo que se consultó en el "LIST OF JOURNAL INDEXED" que aparece cada año en el número de Enero del Index Medicus."

## 8.5. Método estadístico

### 8.5.1. Estadística descriptiva

- *Descripción de caracteres cuantitativos.*

El uso de la metodología estadística en la investigación de cualquiera de las facetas de las ciencias de la salud se ha revelado imprescindible para desarrollar una investigación de calidad y acorde con las exigencias de los tiempos presentes; por ello se ha incorporado al presente trabajo una metodología estadística descriptiva seguida de la consiguiente inferencia estadística.

Por su propia definición, la estadística se considera ligada a los métodos científicos en la toma, organización, recopilación, presentación y análisis de los datos, tanto para la deducción de conclusiones, como para tomar decisiones razonables de acuerdo con tales análisis. La parte de estos resultados que pretende sencillamente describir y analizar una serie de datos sin sacar conclusiones o hacer inferencias sobre la población diana se llama "estadística descriptiva", considerada como aspecto básico para desarrollar posteriormente inferencias sobre los valores de las variables pertenecientes a la muestra y extrapolarlas a la población.

Las observaciones cuantitativas las podemos dividir en medidas discretas y continuas. Las medidas discretas son aquellas que pueden tomar sólo algunos valores dentro de un intervalo. Las medidas continuas son aquellas que pueden tomar cualquier valor dentro de un intervalo. Las variables categóricas de escala ordinal describen categorías ordenadas.

- *Medidas de tendencia central.*

En ocasiones es importante ofrecer con un solo número, información sobre el nivel general de una serie de mediciones, que nos pueda servir para comparar dos o más distribuciones de una variable entre sí, este valor puede denominarse como medida de

tendencia central, media o promedio. Un promedio es un valor que es típico o representativo de un conjunto de datos. Como tales valores tienden a situarse en el centro del conjunto de datos ordenados según su magnitud, los promedios se conocen también como "Medidas de Centralización". Se pueden definir varios tipos de estas medidas; las consideradas en este trabajo fueron la media aritmética muestral y la mediana. Si las observaciones se disponen en orden creciente o decreciente la mediana ocupa el valor central. Si "n" es par no existe en rigor una observación central, en este caso, la mediana se define por convención como la media de las dos observaciones centrales. La mediana presenta algunas desventajas en relación con la media:

- No tiene en cuenta la magnitud exacta de la mayoría de las observaciones, por lo que supone una pérdida de información.
- Si se unen dos grupos de observaciones, la mediana del grupo resultante, no puede expresarse a partir de las medianas de los grupos componentes. Situación que sí es válida para la media.
- La mediana es mucho menos manejable que la media para el tratamiento matemático y se utiliza en tratamientos no paramétricos fundamentalmente.

Sin embargo, la mediana es el estadístico de elección cuando consideramos distribuciones muy asimétricas o cuando consideramos variables de tipo ordinal.

Media aritmética: Se trata de una medida de centralización de tamaño. La media aritmética, de un conjunto de números:  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , que se presentan con frecuencias absolutas  $f_1, f_2, \dots, f_n$  respectivamente es:

$$\bar{x} = \frac{\sum f_i x_i}{\sum f_i} = \frac{f_1 x_1 + f_2 x_2 + \dots + f_n x_n}{f_1 + f_2 + \dots + f_n} = \frac{f_i x_i}{N}$$

Mediana: Es una medida de centralización de posición. En un conjunto de datos ordenados de menor a mayor, la mediana es aquel valor que ocupa una posición media en la distribución estadística. Si el número de datos es impar la mediana viene dada por el valor medio de la distribución, si el número de datos es par, la mediana viene dada por la media aritmética de los valores medios.

$$M = L_i + \left( \frac{\frac{N}{2} - (\sum f)_i}{f_{mediana}} \right),$$

donde  $L_i$  es el límite inferior real de la clase mediana,  $N$  es el número total de datos,  $(\sum f)_i$  es la suma de las frecuencias absolutas de todas las clases anteriores a la clase mediana,  $f_{mediana}$  es la frecuencia absoluta de la clase mediana.

Otra medida de tendencia central es la moda, que se define como el valor de la variable en que la curva de frecuencias alcanza el máximo. No suele utilizarse para los

cálculos estadísticos fundamentalmente porque las fluctuaciones de las frecuencias pequeñas tienden a originar falsas modas y a causa de la ambigüedad de su definición.

- *Medidas de dispersión.*

A veces, no basta con conocer los valores centrales, siendo preciso determinar en qué medida los datos numéricos están agrupados o no alrededor de la media. Al grado en que los datos numéricos tienden a extenderse alrededor de un valor medio se le denomina "Variancia o Dispersión de los datos". En este proyecto de tesis doctoral se emplearon las siguientes medidas de dispersión o variación:

- Rango. Definido como la diferencia entre el mayor y el menor representante de una distribución.
- Desviación típica (S). De todas las medidas de dispersión, es el estadígrafo que más se utiliza en la práctica; siendo necesaria su comprensión para la definición de otros muchos estadígrafos. Se define la desviación típica como la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media. En nuestro proyecto se ha utilizado la desviación típica muestral. Si a la media se suma o resta la desviación estándar obtenemos un intervalo de muestra que comprende aproximadamente el 68% de las observaciones; si a la media se suma y resta el doble de la desviación estándar se obtiene un intervalo que incluye el 95% de los casos; si se suma y resta el triple de la desviación estándar obtenemos un intervalo que incluye el 99.7% de los casos. Es decir:

$$s = \sqrt{\frac{\sum f_i (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

- Varianza (S<sup>2</sup>). Otro estadígrafo de gran importancia en el desarrollo de esta experiencia es la varianza, que se define como el cuadrado de la desviación típica. Es decir:

$$s^2 = \frac{\sum f_i (x_i - \bar{x})^2}{N}$$

- Error estándar de la media. El error típico de la media es un estadígrafo que viene expresado por el cociente entre la desviación típica y la raíz cuadrada del número de individuos que componen la muestra. En términos conceptuales, el error típico de la media, es un estadígrafo que indica la fiabilidad del mismo. Cuando el error típico es pequeño respecto de las unidades de medida, la media presenta una variación menor respecto al auténtico valor de la media poblacional, por tanto podemos tener más confianza en los resultados obtenidos.
- Coeficiente de variación. Es un índice de dispersión relativa del que no dependen las unidades de medida. Se calcula dividiendo la desviación estándar entre la media muestral. Es decir:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

- Percentil 10 y 90. Los percentiles son medidas de posición que se obtienen a partir de los sujetos ordenados para la variable cuya distribución se desea describir. En nuestro ensayo hemos utilizado los percentiles 10 y 90 calculados por el método de Haverage. Expresan los valores extremos de la distribución que nos enmarcan un 80% de valores con tendencia central.
- Amplitud intercuartil (IQR). Es una medida de dispersión de valor igual a la longitud que contiene el 50% central de los individuos de la dispersión.
- Asimetría-Curtosis. En términos corrientes, este concepto hace referencia a un desplazamiento de la curva de distribución en un sentido positivo o negativo (abscisas). Mientras que la curtosis va a definir el perfil de la curva en relación a un eje de ordenadas. En el caso de la asimetría un valor mayor que 0 indica una cola de la distribución prolongada por la derecha, simetría total si el valor es 0 y cola marcada por la izquierda cuando el valor es negativo. En lo referente al coeficiente de apuntamiento (curtosis), los valores mayores que 0 indican distribuciones muy apuntadas (leptocúrticas), si el valor es 0 la distribución es mesocúrtica, y cuando el valor es negativo la distribución es platicúrtica. Al hablar de curtosis nos referimos al grado de "apuntamiento" de una distribución. Generalmente, se compara el mayor o menor apuntamiento de una distribución con la curtosis de la distribución normal. Por lo que viene expresado como:

$$\gamma_2 = \frac{m_4}{s^4} - 3$$

De esta forma el coeficiente de curtosis es nulo para una distribución normal. Si es negativo se trata de una distribución menos apuntada que la normal y recibe el nombre de planicúrtica. Si es positivo se trata de una distribución más apuntada que la normal y recibe el nombre de leptocúrtica. A las distribuciones con coeficientes de curtosis nulo se les denomina mesocúrticas.

- *Test de Kolmogorov.*

Aunque en general y según el teorema central del límite podemos considerar como distribuciones normales todas las relativas a variables biológicas cuando el número de muestreo sea superior a 30, utilizamos el test de Kolmogorov para conocer la normalidad de una distribución. El valor de K-S es positivo con un valor máximo de 1; un valor de K-S bajo indica alejamiento de la distribución normal. En general, se puede esperar normalidad cuando los valores de K-S son mayores de 0.9 (se rechaza el criterio de normalidad con K-S pequeña equivalente a una  $p < 0.00005$ ).

### 8.5.2. Inferencia estadística

La principal utilidad de la estadística considerada como herramienta de ayuda en las ciencias biosanitarias consiste en extraer conclusiones a partir de unas hipótesis previas realizadas sobre una muestra representativa y accesible de la población. En general, las respuestas que se buscan se desea aplicarlas sobre toda la población y ésta no es accesible, por lo que hay que trabajar con una muestra representativa de la misma. A los elementos constituyentes de esa muestra serán a los que se aplicarán los test estadísticos que permitirán obtener respuestas y conclusiones extrapolables a la

población general. Debido a que se trabaja con una muestra, las conclusiones que se extraigan y que se proyectarán sobre la población estarán afectadas por una cierta “imprecisión” y siempre, aunque sea con una baja probabilidad, se correrá un cierto riesgo de alcanzar una conclusión errónea.

La estadística inferencial se propone probar o rechazar una hipótesis formulada previamente. Esta hipótesis, en general, se formula en el sentido de que “no hay diferencia”, es la denominada hipótesis nula ( $H_0$ ). Los tests estadísticos se realizan con el fin de aceptar o rechazar esta  $H_0$  (si se rechaza  $H_0$ , lo que se hace es aceptar la hipótesis alternativa,  $H_1$ : “si hay diferencia”).

Los test estadísticos pueden clasificarse en paramétricos y no paramétricos. Si se realizan test estadísticos paramétricos, que en principio son los más aconsejables, habrá que comprobar el cumplimiento, principalmente, de dos hipótesis además de la de muestreo aleatorio: gaussianidad de cada una de las variables cuantitativas implicadas, y homocedasticidad o igualdad de las varianzas entre aquellos conjuntos de datos pertenecientes a la misma variable medidos en grupos diferentes.

La normalidad se analiza mediante el test de Kolmogorov-Smirnov o bien con los coeficientes de sesgo y apuntamiento. En este caso,  $H_0$  es: “la distribución estudiada no se aparta de la gaussiana de forma significativa”.

Los test estadísticos evalúan el error tipo I (o error  $\alpha$ ) que se comete al rechazar  $H_0$  cuando ésta es cierta (esto es, decir que hay diferencias cuando no las hay). Es el valor habitualmente designado como  $p$  (y que en SPSS se especifica bajo el epígrafe: Sig.). Habitualmente se considera que, para poder decir que se rechaza  $H_0$ ,  $p$  ha de ser inferior a 0,05; esto significa que el mayor riesgo a equivocarse que se está dispuesto a asumir diciendo que hay diferencia (en este caso respecto de la gaussiana) cuando realmente no la hay, es del 5 %.

Se denomina error tipo II (o error  $\beta$ ) al error que se comete al aceptar  $H_0$  cuando es falsa (esto es, que habiendo diferencias no son detectadas). La homocedasticidad puede estudiarse en cada test paramétrico que se solicite por medio del test de Levene ( $H_0$ : todas las varianzas que se comparan son similares). Si al hacer el test de Levene el valor de  $p$ , o sea el de Sig en SPSS, es  $< 0,05$  se rechazará la  $H_0$ , de que no había diferencia entre las varianzas, y se aceptará la hipótesis alternativa de que hay diferencia entre las varianzas estudiadas.

A continuación, se describen los distintos métodos estadísticos que hemos usado en el presente trabajo de tesis doctoral.

- *Análisis de varianza (ANOVA) de un factor*

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Esta prueba es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independientes. Se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal. Supuestas  $k$  poblaciones independientes, las hipótesis del contraste son las siguientes:

1.  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ : *Las medias poblacionales son iguales.*

2.  $H_1$ : Al menos dos medias poblacionales son distintas.

Para realizar el contraste ANOVA, se requieren  $k$  muestras independientes de la variable de interés y una variable de agrupación denominada *Factor* que clasifica las observaciones de la variable en las distintas muestras. Suponiendo que la hipótesis nula es cierta, el estadístico utilizado en el análisis de varianza sigue una distribución *F de Fisher-Snedecor* con  $k-1$  y  $n-k$  grados de libertad, siendo  $k$  el número de muestras y  $n$  el número total de observaciones que participan en el estudio.

El estadístico F del ANOVA de un factor se basa en el cumplimiento de 2 supuestos fundamentales: normalidad y homocedasticidad.

Utilizamos los contrastes llamados comparaciones múltiples post-hoc o a posteriori para saber qué media difiere de otra. Esas comparaciones permiten controlar la tasa de error al efectuar varios contrastes utilizando las mismas medias. El cuadro de post hoc muestra las distintas pruebas post hoc para hacer comparaciones múltiples por parejas o pruebas de rango. Si la conclusión del contraste es rechazar la igualdad de medias, se puede plantear qué grupos dos a dos son los que tienen medias significativamente distintas. Una forma de hacerlo sería plantear contrastes de igualdad de medias para dos muestras independientes con la prueba *T de Student*. Otra forma es utilizar una de las pruebas Post hoc que ofrece el análisis de la varianza. En particular, la prueba de *Scheffé* realiza todos los contrastes de igualdad de medias dos a dos y constituye dos distintos grupos homogéneos a partir de los resultados de los contrastes por parejas. Algunos autores destacan la prueba de *Scheffé* como la más conservadora y utilizada, a pesar de que en muchas áreas se está imponiendo la de *Bonferroni*. La tabla que contiene el estadístico de Levene nos permite contrastar la hipótesis de igualdad de varianzas poblacionales. Si el nivel crítico (sig.) es menor o igual que 0,05, debemos rechazar la hipótesis de igualdad de varianzas. Si es mayor, aceptamos la hipótesis de igualdad de varianzas.

El siguiente paso nos lleva a la tabla de ANOVA, que nos ofrece el estadístico F con su nivel de significación. Si el nivel de significación (sig.) intraclass es menor o igual que 0,05, rechazamos la hipótesis de igualdad de medias, si es mayor, aceptamos la igualdad de medias, es decir, no existen diferencias significativas entre los grupos (figura 7.18).

Desde la tabla de comparaciones post-hoc vemos posibles combinaciones dos a dos entre los niveles de la variable factor (Variable 2), las diferencias entre las categorías de la variable 1 en cada grupo, el error típico de diferencias, y el nivel crítico asociado a cada diferencia (significación).

Los grupos cuyas medias difieren de forma significativa (a nivel de 0,05), son los que presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. Cuando la F de la tabla de análisis de la varianza es no significativa, la conclusión es que el factor no influye en la variable dependiente, es decir, los distintos niveles del factor se comportan de igual forma en lo que a la variable dependiente se refiere. Pero si tal F es significativa, sólo se puede concluir que, por lo menos, dos niveles del factor producen distintos efectos en la dependiente, lo cual quiere decir, que habrá que estudiar entre qué niveles se dan esas diferencias significativas.

- *Tablas de contingencia con prueba de Chi-cuadrado*

La tabla ji- cuadrada ( $\chi^2$ ) se utiliza principalmente:

- Para probar si una serie de datos observada, concuerda con el modelo (serie esperada) de la información.
- Para probar las diferencias entre las proporciones de varios grupos (tabla de contingencia).

Para todos los casos:

$H_0$ : No hay diferencia o no hay dependencia entre variables

$H_1$ : Hay diferencia o si hay dependencia entre variables

Pasos para realizar la tabla de contingencias  $\chi^2$ :

1) Plantear las hipótesis:

$$H_0 = p_1 = p_2 = p_3 \dots = p_k$$

$H_1$ : al menos dos proporciones son diferentes.

- 2) Construir una tabla que contenga los valores observados.
- 3) Sumar los totales de los renglones y columnas de los valores observados.
- 4) Debajo de cada valor observado poner el valor esperado utilizando la fórmula:

$$E_{ij} = \frac{(\text{total de } i - \text{ésimo renglón} \times \text{total de } j - \text{ésima columna})}{n}$$

5) Calcular el valor del estadístico de prueba  $\chi^2$  usando la fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \text{ donde:}$$

$O_{ij}$  = Valor observado de la celda  $i,j$ .

$E_{ij}$  = Valor esperado de la celda  $i,j$

6) Determinar los grados de libertad mediante:

$$gl = (r - 1)(c - 1) \text{ donde:}$$

$r$  = número de renglones

$c$  = número de columnas

- 7) Calcular el valor crítico en la tabla  $\chi^2$
- 8) Criterio de decisión: si el valor crítico es  $<$  valor del estadístico de prueba, rechazamos  $H_0$

- *Test de Wilcoxon*

La realización de un test de Barlett para la comparación de varias varianzas, la existencia de varianzas distintas y el escaso número de casos incluido en alguno de los grupos, obligan a la realización de test no paramétricos, que al no depender de la distribución de la variable, no precisan la condición previa de normalidad de las poblaciones.

El test de Wilcoxon permite comparar un conjunto de muestras dependientes desde la visión de los análisis no paramétricos que utilizan series ordenadas de valores de menor a mayor. Se inicia el test con una ordenación de menor a mayor de todos los valores observados en las  $k$  muestras y su correspondiente asignación de rangos. El siguiente paso consiste en obtener la diferencia entre cada valor y su correspondiente mediana; posteriormente se suman los rangos positivos ( $T_+$ ) y los rangos negativos ( $T_-$ ). La suma de los rangos positivos y negativos es un valor constante:

$$T_+ + T_- = \frac{n(n+1)}{2}$$

Para obtener los valores estandarizados de  $T_+$  y  $T_-$ , restamos la media y dividimos por la desviación estándar:

$$\sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}$$

Los valores de  $p$  en la cola por la derecha (R) para la diferencia de rango

$$Z_{+R} = \frac{T_+ - 0.5 - n(n+1)/4}{\sqrt{n(n+1)(2n+1)/24}};$$

$$Z_{-R} = \frac{T_- - 0.5 - n(n+1)/4}{\sqrt{n(n+1)(2n+1)/24}};$$

positivos y negativos sería:

- *Test de Friedman*

El test de Friedman es un test no paramétrico utilizado para comparar tres o más grupos relacionados. Se trata en realidad de una generalización del test de los signos de Wilcoxon. Como en los otros análisis no paramétricos el primer paso a seguir consiste en asignar un número de orden a cada valor, siempre de menor a mayor; cada grupo o columna ( $k$ ) es reenumerado separadamente y posteriormente se procede al cálculo de la

suma de rangos de cada grupo (Rct). Si la suma de los rangos de cada grupo es muy diferente, el valor de p será muy pequeño y en consecuencia encontraremos diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Se calcula la suma de cuadrados de las columnas (grupos). Los casos se disponen en filas (n).

$$W = \sum Rct^2 \times \frac{12}{(n^2 \times k \times (k^2 - 1))} - \frac{3(k+1)}{k-1}$$

$$Q = n(k-1)W$$

Los grados de libertad son k-1. Generalmente para consultar el nivel de significación se utiliza la aproximación  $\chi^2$  con k-1 grados de libertad, siempre que el número de columnas sea superior a 4 o el número de filas mayor de 15.

- *Coefficiente de correlación de Spearman*

Este test se utiliza para contrastar la dependencia de dos variables cuantitativas x e y, cuando se tienen sospechas de que las variables dadas siguen una distribución no normal. Como el resto de los test no paramétricos se basa en la asignación de rangos a los valores de las variables. Las hipótesis a contrastar son:

$H_0 \approx$  los valores que toma una variable aleatoria x son independientes de los que toma otra variable aleatoria y.

$H_1 \approx$  los valores altos de y suelen ir acompañados de valores altos (o bajos) de x.

Dada una muestra de n parejas de valores ( $x_i$ ;  $y_i$ ), el proceso a seguir para estimar la fuerza de asociación no paramétrica entre x e y consiste en ordenar la muestra de los  $x_i$  de menor a mayor y asignarles rangos  $R_i$  del modo tradicional; hacer lo mismo con la muestra de los  $y_i$ ; anotar las n parejas de rangos obtenidos ( $R_i$ ;  $R'_i$ ) y calcular para ellas el coeficiente de correlación usual que se llamará ahora  $r_s$ :

$$r_s = \frac{\sum (R_i - \bar{R}_i) \times (R'_i - \bar{R}'_i)}{\sqrt{\sum (R_i - \bar{R}_i)^2 \sum (R'_i - \bar{R}'_i)^2}}$$

- *Regresión no lineal. Regresión logística*

No siempre está justificado el intentar sustituir una nube de puntos obtenida al estudiar la relación existente entre dos variables por una recta que represente el fenómeno biológico que se analiza, ya que multitud de fenómenos no se ajustan a ecuaciones lineales rectilíneas y siguen, preferentemente, otro tipo de curvas de ecuaciones más o menos complejas.

El estudio de la regresión no lineal presenta dos partes diferenciadas: la primera, la selección de la forma general de curva teórica que se pretende ajustar a los resultados del experimento, y la segunda, la aplicación, una vez seleccionada, del procedimiento de

los mínimos cuadrados para determinar los coeficientes de la curva. La primera parte consiste en elegir, de entre las ecuaciones generales de curvas habituales que estudia la geometría analítica aquella que, por su forma cualitativa, piense el investigador que presenta una semejanza o tendencia más parecida con la nube experimental de puntos obtenida en el ensayo real. La observación detenida de esta nube o diagrama de dispersión permitirá decidir la forma de qué tipo de curva sigue su tendencia o desarrollo.

La regresión logística viene definida por la existencia de una variable dependiente con dos categorías y una o más variables independientes que pueden ser tanto categóricas como cuantitativas.

En ocasiones el modelo de regresión logística precisa incluir como variable dependiente más de dos categorías ( $c$ ); en este caso se definen  $c-1$  logit o ecuaciones simultáneas, cada uno de ellos comparando una determinada categoría con la definida como de referencia, que en el caso particular de la regresión logística multinomial debe ser la categoría de valor más bajo.

$$\text{Logit}(Y = s) = \ln \left( \frac{\Pr(Y = s)}{1 - \Pr(Y = 0)} \right) = \beta_0 + \beta_1 x$$

Es importante tener claro que el modelo más simple de esta regresión, donde la variable independiente es categórica binaria, equivale a una tabla de contingencia ( $\chi^2$ ). Sin embargo, el modelo se va a ir complicando conforme añadamos categorías a la variable independiente o introduzcamos un predictor (variable independiente) cuantitativo.

La regresión logística ordinal supone asumir que las categorías de la variable dependiente tienen un orden dado, lo que supone una información que desestimaríamos si la considerásemos solo como una variable cuantitativa (regresión lineal) o categórica no binaria (multinomial). Este tipo de regresión no supone definir logits respecto a una categoría de referencia, sino que se trabaja con una categoría no representada y codificada con el valor mayor. Para que la categoría de referencia sea la más baja debe recodificarse.

Se han desarrollado varios modelos de regresión ordinal que difieren entre sí en la manera en que definen los logits de respuesta, a saber:

- Modelo de odds proporcionales o modelo de odds acumulativas.
- Modelo de razones de continuidad.
- Modelo de categorías adyacentes.

De ellos, el más usado es el modelo de odds proporcionales. En él, la  $\Pr(Y \leq s)$  se denomina probabilidad acumulativa de la respuesta  $s$ ; lo que permite definir la odds acumulativa de la respuesta  $s$ :

$$\left( \frac{\Pr(Y \leq s)}{1 - \Pr(Y \leq s)} \right)$$

$$\text{Logit}(Y \leq s) = \ln \left( \frac{\Pr(Y \leq s)}{1 - \Pr(Y \leq s)} \right) = \alpha_s + \beta_1$$

A la hora de interpretar los parámetros de un modelo de odds proporcionales hay que tener presente la particular definición de probabilidad realizada, que contrapone probabilidades inferiores o iguales a un valor de respuesta *versus* las superiores al mismo. El valor  $e^{\beta}$ , siendo  $\beta$  el coeficiente de estimación obtenido, es la razón de odds acumulativas entre una y otra categoría de la variable independiente. La significación global del modelo se obtiene mediante la prueba de razón de verosimilitud global, mientras que la significación individual de los parámetros del modelo se obtiene mediante la prueba de Wald o mediante la prueba de razón de verosimilitud parcial.

- *Análisis de regresión logística multinomial*

La opción Regresión logística multinomial resulta útil en aquellas situaciones en las que se desee poder clasificar a los sujetos según los valores de un conjunto de variables predictoras. Este tipo de regresión es similar a la regresión logística, pero más general, ya que la variable dependiente no está restringida a dos categorías.

Estadísticos. Historial de interacciones, coeficientes de los parámetros, covarianza asintótica, matrices de correlación, pruebas de la razón de verosimilitud para los efectos del modelo y los parciales,  $-2 \log$  de la verosimilitud, Chi-cuadrado de la bondad de ajuste de Pearson y de la desviación,  $R^2$  de Cox y Snell, de Nagelkerke y de McFadden.

Clasificación: frecuencias observadas respecto a las frecuencias pronosticadas, por cada categoría de respuesta. Tablas de contingencia: frecuencias observadas y pronosticadas (con los residuos) y proporciones por patrón en las covariables y por categoría de respuesta.

Método: Se ajusta un modelo logístico multinomial para el modelo factorial completo o para un modelo especificado por el usuario. La estimación de los parámetros se realiza a través de un algoritmo interactivo de máxima verosimilitud.

Datos: La variable dependiente debe ser categórica. Las variables independientes pueden ser factores o covariables. En general, los factores deben ser variables categóricas y las covariables deben ser variables continuas.

Supuestos: Se asume que la razón de ventajas de cualquier par de categorías es independiente de las demás categorías de respuesta. De igual manera, dado un patrón en las covariables, se asume que las respuestas son variables multinomiales independientes.

Obtención de una regresión logística multinomial:

Elegir en los menús: Analizar, Regresión, Logística multinomial.

Por defecto, el procedimiento de regresión logística multinomial genera un modelo con los principales efectos que producen las covariables y los factores, pero se puede especificar un modelo personalizado o solicitar la selección de un modelo por pasos. A continuación, se debe especificar un modelo. Un modelo de efectos principales contiene los efectos principales de las covariables y los factores, pero no contiene efectos de interacción. Un modelo factorial completo contiene todos los efectos principales y todas las interacciones factor por factor pero no contiene interacciones de covariable. Se puede crear un modelo personalizado para especificar subconjuntos de interacciones entre los factores, interacciones entre las covariables, o solicitar una selección por pasos de los términos del modelo.

- *Análisis de supervivencia:*

Es un método no paramétrico (no asume ninguna función de probabilidad) y por máxima verosimilitud, es decir se basa en maximizar la función de verosimilitud de la muestra. Una muestra aleatoria de tamaño  $n$ , extraída de una población, estará formada por  $k$  ( $k \leq n$ ) tiempos  $t_1 < t_2 < \dots < t_k$  en los que se observan eventos. En cada tiempo  $t_i$  existen  $n_i$  "individuos en riesgo" (elementos de la muestra para los que el evento puede ocurrir, o que  $T \geq t_i$ ) y se observan  $d_i$  eventos. Además, en el intervalo  $[t_i, t_{i+1})$  se producen  $m_i$  pérdidas.

Se puede demostrar que la función de verosimilitud para toda la muestra es:

$$L = \prod_{i=1}^k h_i^{d_i} (1 - h_i)^{n_i - d_i}.$$

Para construir esta función se ha asumido que la información contenida en las pérdidas es que, para cada una de ellas, el evento ocurre en un tiempo mayor que el tiempo en que se observa la pérdida. Maximizando esta función se encuentra que el estimador de la función de riesgo es

$$\hat{h}_i = \frac{d_i}{n_i} \quad i = 1, 2, \dots, k$$

y para la función de supervivencia, el denominado estimador *producto límite* o de *Kaplan-Meier*:

$$\hat{S}(t_i) = \prod_{j | t_j \leq t_i} \left(1 - \frac{d_j}{n_j}\right)$$

## **9. RESULTS**



## RESULTS

## 9.1. Cranberry syrup characterisation

The cranberry syrup was characterised at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada <sup>79</sup>, and provided as a dispersion of 2.8% cranberry extract (Gyakacran®) in glucose syrup. The composition of the cranberry syrup, with respect to its different polyphenol fractions, has been published previously <sup>79</sup>. The composition of the cranberry syrup used in our study is shown in Table 9.1.

Table 9.1 – Phenolic compounds in cranberry syrup, expressed in µg/mL of syrup.

Class/phenolic compounds	µg/mL cranberry syrup
<i>Phenolic acid derivatives</i>	
Coumaroylglucose/p-Coumaric acid 4-O-glucoside	113.39 ± 4.11
1-O-Sinapoyl-β-D-glucose/4-O-β-D-Glucosyl-sinapate	21.44 ± 0.73
Caffeoyl glucose	39.27 ± 1.24
Chlorogenic acid	38.70 ± 1.07
p-Coumaroyl-glucose	80.35 ± 2.31
Canthoside A	3.23 ± 0.08
2-Hydroxybenzoic acid	98.79 ± 2.95
Gallic acid 3-O-gallate	116.72 ± 3.46
<i>Flavonols</i>	
Myricetin 3-O-galactoside/glucoside	251.74 ± 9.74
Dihydro Ferulic Acid 4-O-β-D-Glucuronide	47.92 ± 2.42
Myricetin 3-O-arabinoside	453.26 ± 17.65
Caviunin glucoside	594.61 ± 26.87
Quercetin 3-O-galactoside/glucoside	782.27 ± 38.59
Quercetin 3-O-xylopiranoside	136.27 ± 4.74
Quercetin 3-O-arabinopyranoside	132.78 ± 4.34
Quercetin 3-O-arabinofuranoside	241.06 ± 8.63
Quercetin 3-O-rhamnoside	261.02 ± 8.46
Myricetin	229.57 ± 7.59
Methoxyquercetin 3-O-galactoside	nq
Kaempferol 3-O-β-D-(6"-p-hydroxybenzoyl)-galactopyranoside	61.40 ± 2.78
Quercetin	606.54 ± 25.63
Syringetin	49.45 ± 1.67
<i>Proanthocyanidins</i>	
Procyanidin B-type	405.68 ± 14.78
(+)-Catechin	748.63 ± 30.86
Procyanidin A2 isomer 1	728.05 ± 29.78
Procyanidin B-type	431.28 ± 18.21
Procyanidin A2 isomer 2	713.98 ± 25.77
Procyanidin A2 isomer 3	1288.74 ± 99.42
Prodelphinidin B4	419.97 ± 14.74
<i>Isoflavonoids</i>	
Biochanin A-7-O-glucoside	nq
<i>Coumarins</i>	
7-Hydroxycoumarin	493.83 ± 17.54
Coumarin	349.80 ± 12.43
Scopoletin	899.99 ± 39.64
<i>Anthocyanin</i>	
Petunidin	19.17 ± 5.81
Total	10,858.91 ± 389.62
nq, not quantified.	

Three different isomers of A-type procyanidin were identified in cranberry syrup, two B-type procyanidin isomers and (+)-catechin was identified. Dihydroferulic acid 4-O- $\beta$ -d-glucuronide, caviunin glucoside, biochanin A-7-O-glucoside, prodelfphinidin B4 and kaempferol 3-O- $\beta$ -d-(6''-p-hydroxybenzoyl)-galactopyranoside were identified. According to the existing literature, this is the first time that these compounds have been reported in the cranberry<sup>79</sup>.

In addition, several phenolic acids, flavanols, flavanols and hydroxycoumarins were identified in positive ionization mode. Thus, the phenolic acids identified were: coumaroyl-hexose, 2-hydroxybenzoic acid and digallic. Several flavanols were also detected and identified: myricetin 3-O-hexose, myricetin 3-O-arabinoside, quercetin 3-O-hexose, quercetin 3-O-xylopiranoside, quercetin 3-O-arabinopiranoside, quercetin 3-O-arabinofuranoside, quercetin 3-O-rhamnoside, methoxyquercetin 3-O-galactoside, myricetin and quercetin. Furthermore, syringetin, a flavonoid that could not be detected in negative ionization mode, was also identified. All the quercetin and myricetin-sugar conjugates showed a fragment ion at  $m/z$  303 and 319 respectively, corresponding to the aglycone of quercetin and myricetin. Finally, several coumarins were tentatively identified only in positive ionization mode, assigned to 7-hydroxycoumarin, and coumarin. Another coumarin and showing fragments, was identified as scopoletin, according to Chen et al.<sup>185</sup>. According to the existing literature, this is the first time that 7-hydroxycoumarin and coumarin have been identified in the cranberry.

The total polyphenol content was  $15.26 \pm 0.08$  mg/mL of cranberry syrup. The total proanthocyanidins expressed as catechin equivalents was  $9.9 \pm 0.1$  mg/mL of cranberry syrup, as described by the equation  $y = 0.0098x - 0.0153$  ( $r^2 = 0.991$ ). The anthocyanin content found in cranberry syrup was  $1.35 \pm 0.04$  mg/mL.

## 9.2. In vitro anti-adhesive properties of cranberry extract

The first step in the colonisation of the epithelium by *E. coli* is determined by its capacity to adhere to the host cells. Initially, this capacity is determined by the micro-organism's electric Surface charge and surface hydrophobicity, and subsequently by other factors such as the formation of diverse types of fimbriae and of specific adhesins. Other authors have shown that fimbriae Types 1, P and S are not essential factors in the adhesion and subsequent colonisation of the urogenital epithelium by *E. coli*. These adhesions may, in general, be considered features of the virulence of extra-intestinal *E. coli*, but they are not essential for *E. coli* to become uropathogenic, all of which accounts for the current research interest in the extent to which cranberry extract may affect the non-specific adherence properties of *E. coli*. In fact, no differences were observed in the surface hydrophobicity of *E. coli* following its growth in TSB culture medium to enhance the expression of Type 1 fimbriae ( $Z = 0.35$ ; pNS). Nevertheless, the incubation of the bacterial suspension with cranberry syrup at final concentrations of either 1:1000 or 1:100 resulted in significant reductions in surface hydrophobicity, depending upon the concentration of cranberry, both after growth in TSB medium and on CFA agar.

Incubation of *E. coli* with cranberry syrup resulted in a reduction in its surface hydrophobicity and did not depend upon the quantities of Type 1 or Type P fimbriae expressed. In terms of surface hydrophobicity, however, the incubation of *E. coli* with 1:1000 dilutions of cranberry extract (which do not affect the haemagglutination

mediated by Type P fimbriae) did produce significant reductions in surface hydrophobicity, thus showing that extremely low levels of this extract are capable of modifying the non-specific adherence properties of *E. coli*.

The A-linkage in cranberry procyanidins may represent an important structural feature for anti-adhesive activity in bacteria. It has been demonstrated that Type A cranberry procyanidins hinder the adhesion of P-fimbriated uropathogenic *E. coli* to uroepithelial cells in vitro<sup>38</sup> and it has also been found that trimeric proanthocyanidins and Type A dimeric procyanidins are responsible for the anti-adhesive effect of cranberry. The composition of the cranberry syrup used in our study, which was rich in Type A procyanidins, may be responsible for the reductions in surface hydrophobicity.

Table 9.2 shows that the addition of methyl- $\alpha$ -Dmannopyranoside 0.1 mM to blood group A, Rh+ does not inhibit the haemagglutination of any of the 13 strains of *E. coli* utilised in this study (mannoseresistant strains). The incubation of strains of *E. coli* with cranberry syrup extract at a final concentration of 1:1000 did not inhibit haemagglutination, while incubation with the cranberry at a final concentration of 1:100 inhibited it, in every case, for strains grown either in TSB or CFA culture medium.

No differences were observed in the surface hydrophobicity of *E. coli* following its growth in TSB culture medium ( $Z = 0.35$ ; pNS). However, incubation of the bacterial suspension with cranberry syrup at a final concentration of 1:1000 or 1:100 produced significant reductions in surface hydrophobicity, depending on the concentration of cranberry, after growth in either TSB or CFA medium (Fig. 9.1).

Table 9.2. Results of the haemagglutination test (A Rh+) for mannose resistant *E. coli*. Cranberry 1:100 inhibits haemagglutination in both culture media.

<i>E. coli</i> strain	Haemagglutination TSB culture medium			Haemagglutination CFA culture medium		
	Control	Cranberry 1:1000	Cranberry 1:100	Control	Cranberry 1:1000	Cranberry 1:100
471	+	+	-	+	+	-
787	+	+	-	+	+	-
593	+	+	-	+	+	-
472	+	+	-	+	+	-
595	+	+	-	+	+	-
760	+	+	-	+	+	-
695	+	+	-	+	+	-
743	+	+	-	+	+	-
424	+	+	-	+	+	-
607	+	+	-	+	+	-
417	+	+	-	+	+	-
4076	+	+	-	+	+	-
629	+	+	-	+	+	-

The percentage of adherence to nitrocellulose was not significantly modified after growth on CFA agar or in TSB culture medium ( $Z = 0.73$ ; p=NS). In both culture media, the percentage of adherence to nitrocellulose of *E. coli*, after incubation for 20 min with cranberry syrup, remained unchanged. Kendall's test of concordance revealed the existence of concordance between the surface hydrophobicity values of *E. coli* and the percentage of adherence to nitrocellulose following growth in TSB culture medium ( $T = 0.50$ ;  $P = 0.02$ ), and an absence of such concordance following growth on CFA agar ( $T = 0.09$ ;  $P = NS$ ).

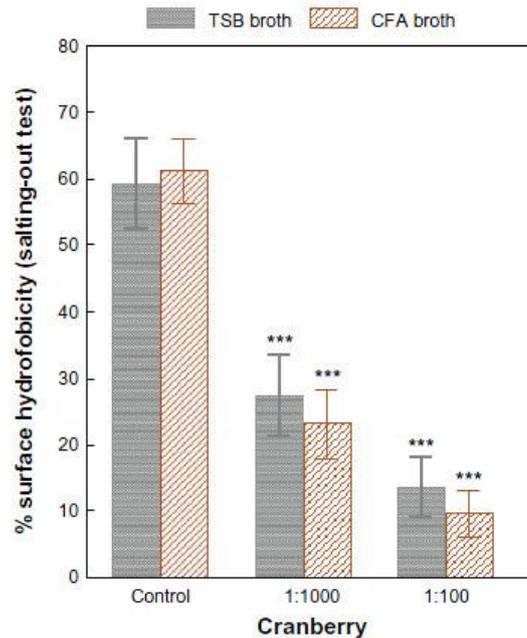


Figure 9.1. Mean values and standard error of the mean of surface hydrophobicity for *E. coli* after incubation in CFA and TSB broth. There is a statistically significant decrease in surface hydrophobicity after incubation with cranberry syrup at final dilutions of 1:1000 and 1:100. Note: \*\*\* $P < 0.001$ .

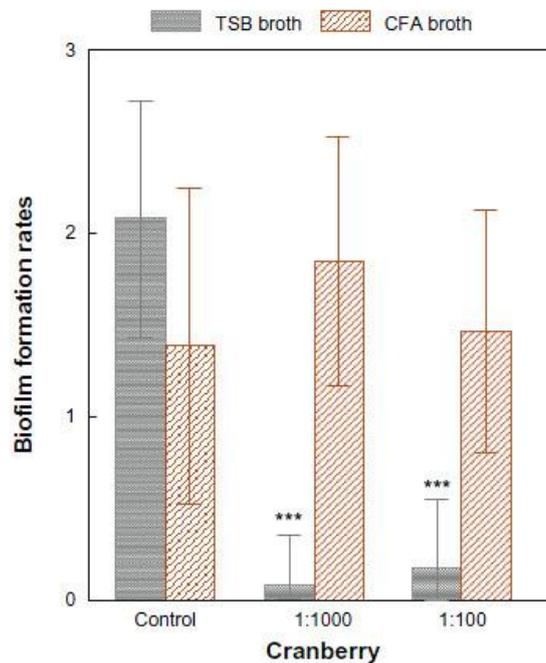


Figure 9.2. Mean values and standard error of the mean of biofilm formation rates for *E. coli* after incubation in CFA and TSB broth. Growth in TSB produces a statistically significant decrease in adherence after incubation with cranberry syrup at final dilutions of 1:1000 and 1:100. Note: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

After culture in CFA broth, biofilm formation was unchanged by incubation with cranberry syrup at a final concentration of 1:1000 or 1:100 ( $W = 0.138$ ,  $P = \text{NS}$ ). However, in TSB medium, biofilm formation was inhibited after incubation with

cranberry syrup ( $W = 0.93$ ,  $P < 0.001$ ), and the formation of biofilm in the absence of cranberry syrup was significantly higher after culture in TSB ( $Z = 2.31$ ,  $P = 0.02$ ), as shown in Figure 9.2.

### 9.3. Efficacy and safety of cranberry extract in the prophylaxis of pediatric recurrent urinary tract infection.

Figure 7.1 shows the CONSORT flow diagram. A total of 198 patients were eligible to be included in the study. Gastrointestinal intolerance was observed in 5 of the cases assigned to trimethoprim and in 2 of those assigned to cranberry syrup treatment. An equal number of losses to follow-up were experienced in both branches of the study ( $n=3$ ); furthermore, in one case in each treatment branch, cutaneous rash was observed following the administration. Urinary tract infection was observed in 47 patients, 17 were males and 30 females. 30 patients (14 with cranberry and 16 with trimethoprim) completed the follow-up on a voluntary basis by observing their parents that the child was asymptomatic and unsupervised decision that did not need to continue prophylaxis (withdrawal, figure 7.1). 40 patients were younger than 6 months. Of these, 24 infants completed the follow-up time (1 year) without urinary tract infection and any adverse reaction, of which 8 received cranberry, without any adverse event. Two patients who received cranberry were younger than 2 months.

Table 9.3. Number (%) of patients with urinary tract infection in each treatment group. It expresses the average time in days (SD) without infection in each treatment group.

	<b>Cranberry (n=75)</b>	<b>Trimethoprim (n=117)</b>
<i>Age, months (mean, SD)</i>	28.3 (30.7)	30.7 (33.9)
<i>Gender, girls (n)</i>	43	69
<b><i>Recurrent urinary tract infections</i></b>		
- UTI, n° (%)	8 (8.4)	18 (18.9)
- Days without infection, mean (SD)	229 (128)	207 (129)
<b><i>Vesicoureteral reflux</i></b>		
- UTI, n° (%)	5 (12.8)	4 (10.3)
- Days without infection, mean (SD)	240 (139)	281 (119)
<b><i>Dilatation of renal pelvis or hydronephrosis</i></b>		
- UTI, n° (%)	5 (9.8)	5 (9.8)
- Days without infection, mean (SD)	192 (120)	207 (128)
<b><i>Ureteral duplication and other anatomical defects</i></b>		
- UTI, n° (%)	1 (33.3)	1 (33.3)
- Days without infection, mean (SD)	29 (13)	159 (137)

Due to the existence of problems during the process of randomization in medical practice 75 patients were assigned to receive cranberry syrup and 117 to receive trimethoprim. However, it was possible to preserve the blind of the interventions. Table 9.1 shows the number (%) of patients with urinary tract infection in each treatment group. It expresses the average time in days (SD) without infection in each treatment group.

### 9.3.1. Recurrent urinary tract infections

We recruited 95 patients diagnosed with recurrent UTI. Out of them, a total of 26 patients had an UTI during the follow-up period (27.4%, CI 95% 18.4%-36.3%). In terms of gender, 6 patients (6.3%) were male and 20 (21.1%) females. 18 of the patients receiving trimethoprim presented an UTI (18.9% of the total, CI 95% 11%-26.3%) whether only 8 patients in the cranberry intervention group developed an UTI episode (8.4% of the total, CI 95% 2.8%-13.9%).

For the whole sample, we found that  $Z_L=2.04 > Z\alpha$  and  $Z_U=-1.65 > -Z\alpha$ , so we can accept the hypothesis that treatment with cranberry is not inferior to treatment with trimethoprim. In infants less than 1 year of age, our results were  $Z_L=0.69 < Z\alpha$  and  $Z_U=-1.9 > -Z\alpha$ , so we had to accept that treatment with cranberry at the administered doses was inferior than trimethoprim in this age group. Figure 9.3 shows the Kaplan-Meier curves for patients diagnosed with a new episode of recurrent UTI.

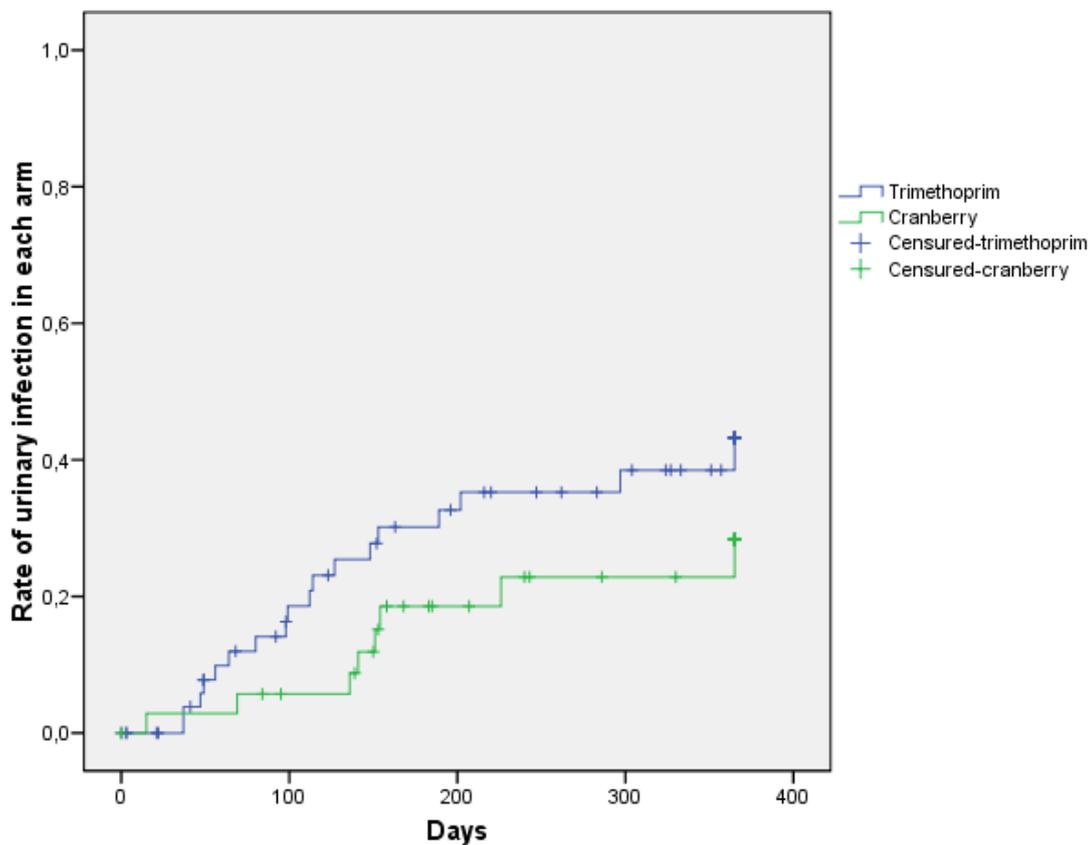


Figure 9.3. Kaplan-Meier curves for patients diagnosed with a new episode of recurrent urinary infection.

For patients recruited with recurrent UTI, the average time to develop an infection after taking trimethoprim was 271 days (95% CI 233-309). The average time in patients taking cranberry was 312 days (95% CI 275-350). Log-Rank (Mantel-Cox) 2.14;  $p = 0.14$ .

### 9.3.2. Vesicoureteral reflux

A total of 39 patients were recruited with VUR grades I to IV. 19 males and 20 females. 9 of these patients with VUR, presented an episode of UTI during the follow up period. UTI was observed in 4 patients who receive trimethoprim (10.3% of the total, 95% CI 7.6% -19.8%) and 5 patients receiving cranberry (12.8% of the total, 95% CI 2.3% -23.2%). The small sample size in patients with VUR does not allow us to observe significant differences between groups. The average time prior to infection after taking trimethoprim was 318 days (95% CI, 274-362) and 281 days in those taking cranberry (95% CI, 317-344). Log-Rank (Mantel-Cox) 0.5;  $p = 0.4$ .

### 9.3.3. Dilatation of renal pelvis or hydronephrosis

A total of 51 patients with hydronephrosis were recruited. Out of which 34 received trimethoprim and 17 had cranberry prophylaxis. Of these, 10 patients (19.6%) developed urinary tract infection during the follow-up period, 5 (9.8%) in each intervention arm. Of all infections observed in this group, 7 (13.7%) occurred in men and 3 (5.9%) in females. The average time before a urinary tract infection after taking trimethoprim prophylaxis was 315 days (95% CI, 275-354). The average time to infection of patients taking cranberry was 270 days (95% CI, 204-337). Logrank (Mantel-Cox) 1.33;  $p = 0.24$ . No significant differences were found between interventions.

### 9.3.4. Ureteral duplication and other anatomical defects

In terms of anatomical defects, 7 patients were recruited. Only 2 of them had urinary tract infection during follow-up.

Table 9.4. Bacterial isolates in the urine of patients who completed follow-up urine infection

	Trimethoprim prophylaxis		Cranberry prophylaxis	
	Amoxicilin resistance	Cotrimoxazole resistance	Amoxicil in resistance	Cotrimoxazole resistance
<i>E. coli</i>	12	8	10	5
<i>Proteus</i>	3	1	2	1
<i>Klebsiella</i>	1	0	3	0
<i>Staphilococcus</i>	1	0	0	-
<i>Enterococo</i>	1	0	0	-
<i>Enterobacter</i>	1	1	0	-

### 9.3.5. Bacterial isolates in the urine of patients who completed follow-up with urinary infection

In our study, a total of 66% of UTI recurrence were caused by *E. coli*, with no significant differences being found between the two treatment branches. Table 9.2 shows the bacterial isolates in the urine of patients who presented a urine infection during the follow-up period. There were no differences founds between interventions in

terms of resistances to amoxicilic/cotrimoxazol percentages. ( $\chi^2=2.7$ ; pNS y  $\chi^2=0.3$ ; pNS).

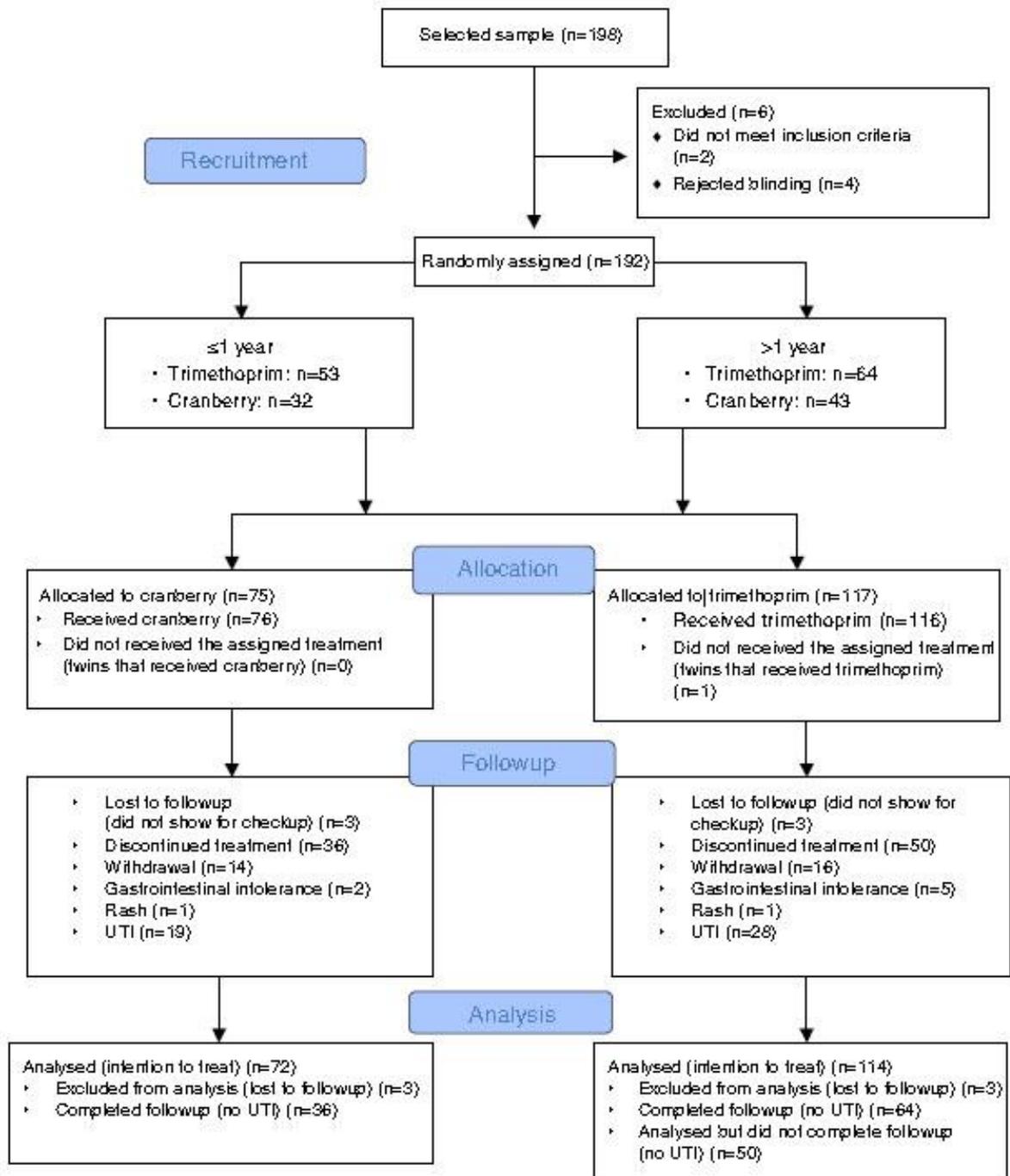


Figure 9.4. Flow diagram in younger and older than 1 year of age.

### 9.3.6. Efficacy and safety of prophylaxis with cranberry in different ages groups

We studied 85 infants younger than 1 year, of which 53 received prophylaxis with trimethoprim and 32 prophylaxis with cranberry syrup. The study also included 107 children older than 1 year, 64 of which received trimethoprim prophylaxis and 43 cranberry prophylaxis.

In patients younger than 1 year, the cumulative rate of UTI associated with trimethoprim prophylaxis was 19% (95% CI, 4–35) in boys and 43% (95% CI, 18–68) in girls. In patients younger than 1 year, the cumulative rate of UTI associated with cranberry prophylaxis was 46% (95% CI, 23–70) in boys and 17% (95% CI, 0–38) in girls. For both sexes overall, the cumulative rate of UTI in infants that received trimethoprim was 28% (95% CI, 13–42) while this rate was 35% (95% CI, 17–52) in infants that received cranberry.

The overall cumulative rate of UTI in children older than 1 year was 35% (95% CI, 21–50) in those that received trimethoprim and 26% (95% CI, 12–41) in those that received cranberry. By sex, the cumulative rate of UTI in males that received trimethoprim was 33% (95% CI, 1.8–65) compared to 8% (95% CI, 0–26) in males that received cranberry.

The CONSORT diagram (Figure 9.4) summarises the adverse events detected in children younger and older than 1 year of age during the follow-up period. There was a remarkably low incidence of adverse reactions, and we did not detect any adverse events in infants younger than 1 year of age. Within the group of patients younger than 1 year of age, 75 in total, we noticed that 13 of them had vesicoureteral reflux (VUR), four of them grade 2 or lower, and five grade 3 or higher, of which two and four, respectively, were treated with cranberry. We did not observe a difference in the recurrence of UTI among groups. On the other hand, in the group of patients older than 1 year of age, 27 had RVU, having 11 of them VUR grade 2 or less, and 16 grade 3 or more of which 3 and 8, respectively, were treated with cranberry. We did not observe any differences in UTI recurrence between the groups.

## 9.4. Phenolic acids excretion in urine and its relationship with recurrence of urinary tract infection

The following subjects were recruited to the study: 85 children under 1 year of age, 53 of whom were treated with trimethoprim and 32 with cranberry syrup; 107 children over 1 year of age, 64 of whom were treated with trimethoprim and 43 with cranberry syrup.

Among the children under 1 year of age, the rate of UTI associated with trimethoprim treatment was 19% (95% CI 4–35) in the boys and 43% (95% CI 18–68) in the girls. In the children under 1 year of age, the rate of UTI associated with cranberry syrup treatment was 46% (95% CI 23–70) in the boys and 17% (95% CI 0–38) in the girls. Irrespective of sex, the rate of UTI in the patients receiving trimethoprim was 28% (95% CI 13–42) and 35% (95% CI 17–52) in those receiving cranberry syrup.

Overall, the children over 1 year of age had a rate of UTI of 35% (95% CI 21–50) among those receiving trimethoprim and of 26% (95% CI 12–41) among those receiving cranberry syrup. By gender, the boys who received trimethoprim had an infection rate of 33% (95% CI 1.8–65) compared with 8% (95% CI 0–26) for those receiving cranberry syrup.

The CONSORT diagram (Figure 9.4) shows the adverse events detected in the children (both groups: those aged under 1 year and those aged over 1 year) during the follow-up period. There were notably few adverse reactions, and none at all among the children aged under 1 year.

The recurrent episodes of UTI were caused by *E. coli* in 60% of the cases, with no significant differences between the two treatment groups. 33.3% of the patients receiving trimethoprim presented urine cultures that were positive for multi-resistant bacteria, versus 22.9% of those receiving cranberry syrup. For the sample as a whole,  $ZL = 2.04 > Z\alpha$  and  $ZU = -1.65 > -Z\alpha$ ; therefore, we conclude that cranberry syrup treatment is similar to trimethoprim treatment. In infants aged under 1 year, we obtained  $ZL = 0.69 < Z\alpha$  and  $ZU = -1.9 > -Z\alpha$ ; accordingly, we find that in these infants, the cranberry syrup treatment, at the dose administered, is inferior to trimethoprim.

#### 9.4.1. Analysis of the pattern of excretion of phenolic acids in different ages and their relationship with the recurrence of urinary tract infection

Table 9.5 shows the urinary excretion of phenolic acids in patients younger and older than 1 year in the trimethoprim and the cranberry groups, with no significant differences found in the excretion of phenolic acids between strata.

Table 9.5. Urinary excretion of phenolic acids in patients receiving nightly prophylaxis with cranberry or trimethoprim.

(μmol/g creatinine)	≤1 year		>1 year	
	Cranberry	Trimethoprim	Cranberry	Trimethoprim
Protocatechuic (9h)	3.4 (1.8–5.0)	6.1 (4.0–8.2)	3.8 (2.5–5.0)	2.7 (2.0–3.4)
Protocatechuic (21h)	4.4 (1.4–7.4)	6.6 (4.5–8.7)	4.7 (2.6–6.8)	9.4 (3.1–15.5)
Syringic (9h)	0.3 (0–0.7)	0.6 (0.2–0.9)	1.8 (0.6–3.1)	0.6 (0.4–0.8)
Syringic (21h)	2.5 (0–6.3)	1.0 (0.4–1.6)	0.7 (0.3–1.1)	2.5 (0.2–4.9)
Caffeic (9h)	1.8 (0–4.0)	1.1 (0–2.5)	1.0 (0.4–2.4)	0.4 (0.1–0.7)
Caffeic (21h)	1.1 (0–2.6)	0.5 (0.7–1.2)	0.3 (0.1–0.4)	1.0 (0–2.0)
Ferulic (9h)	21.9 (9.3–34.4)	12.6 (7.5–17.7)	9.3 (5.2–13.4)	4.3 (1.3–5.3)
Ferulic (21h)	15.3 (0–31.3)	13.2 (9.3–17.2)	8.1 (5.1–11.1)	13.3 (6.0–20.6)
Sinapic (9h)	–	–	1.2 (0–3.3)	0.1 (0–0.14)
Sinapic (21h)	0.22 (0–0.65)	–	0.2 (0–0.4)	0.4 (0–1.1)
<i>p</i> -Coumaric (9h)	1.8 (0.5–3.0)	0.4 (0.2–0.5)	1.6 (0–3.7)	0.7 (0.2–1.2)
<i>p</i> -Coumaric (21h)	1.5 (0–3.4)	0.4 (0–0.9)	0.6 (0.1–1.1)	0.7 (0–1.7)

Table 9.6. Urinary excretion of phenolic acids of dietary origin by age strata.

( $\mu\text{Mol/g creatinin}$ )	Under 1 year			1–3 years			Over 3 years			Total		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD
Protocatechuic acid	37	5.2	4.8	27	3.1	2.0	29	3.2	3.0	93	4.0	3.7
Syringic acid	37	0.5	0.8	27	1.0	1.9	29	1.2	2.3	93	0.8	1.7
Caffeic acid	37	1.3	3.6	27	0.5	1.1	29	0.8	1.3	93	0.9	2.5
<i>p</i> -coumaric acid	37	0.8	1.5	27	1.4	4.8	29	0.7	1.3	93	1.0	2.8
Ferulic acid	37	15.6	16.9	27	6.6	9.4	29	6.0	4.3	93	10.0	12.3
Sinapinic acid	37	0.0	0.0	27	0.0	0.0	29	11.0	4.7	93	0.3	2.6
Total dietary phenolic acids	37	23.4	20.8	27	12.5	18.0	29	12.9	10.8	93	17.0	18.0

#### 9.4.2. Analysis of urinary excretion of dietary phenolic acids

It was noted that 12 hours after receiving the cranberry syrup, these patients eliminated slightly greater urinary concentrations of total phenolic acids than did the patients who received trimethoprim (22.2  $\mu\text{Mol/g creatinine}$  (SD 23.4), vs. 13.9  $\mu\text{Mol/g creatinine}$  (SD 13.2);  $t = 2.18$ ,  $P = 0.03$ , respectively). We compared the quantity of cranberry syrup consumed with the urinary excretion of ferulic acid, and found no statistically significant association ( $b = -3.3$ ;  $t = 1.8$ ;  $P = 0.08$ ). The urinary excretion of ferulic acid and of total phenolic acids was higher among the infants aged under 1 year, with no significant differences in this respect being observed between those given cranberry syrup or trimethoprim. In addition, the patients who developed urinary infection during the follow-up period had higher urinary levels of ferulic acid than did those who completed the follow-up period without any infection ( $t = 2.39$ ;  $P = 0.01$ ) (Fig. 9.5).

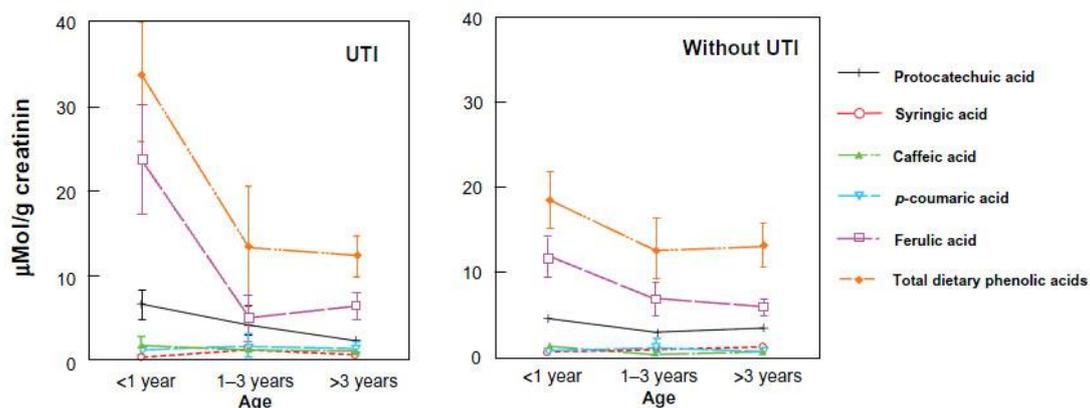


Figure 9.5. Urinary excretion of dietary phenolic acids in patients who subsequently developed UTI and in patients who did not. **Note:** Mean values (SEM) are shown.

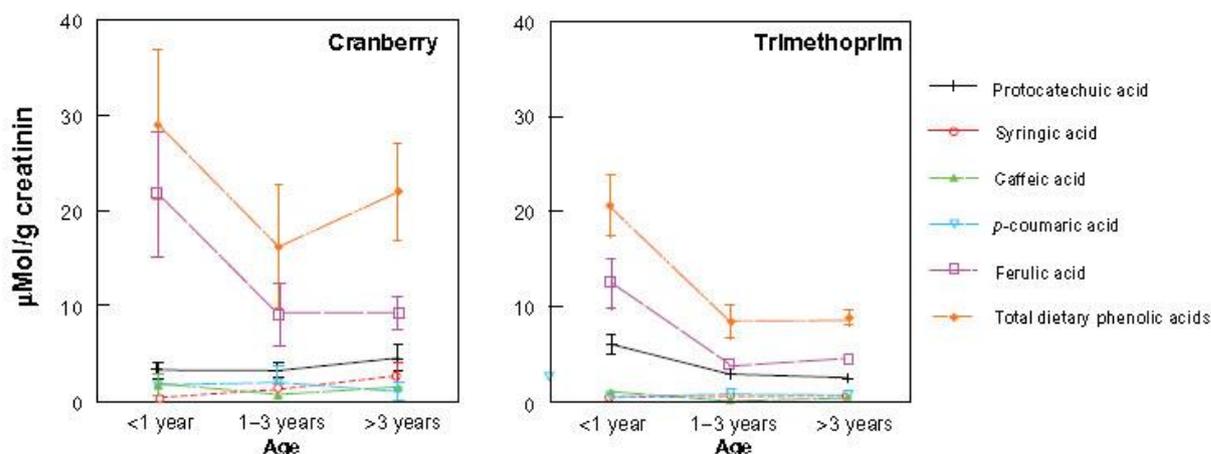


Figure 9.6. Urinary excretion of dietary phenolic acids following the intake of cranberry syrup or trimethoprim as a treatment for recurrent urinary infection. Note: Mean values (SEM) are shown.

In general, increased urinary osmolarity was associated with a lower excretion of ferulic acid, with creatinine decreasing by  $0.016 \mu\text{Mol/g}$  for each increase of  $1 \text{ mOsm/L}$  in urinary osmolarity ( $b = 0.016$ ;  $P < 0.001$ ).

After performing Cox's regression analysis on the ferulic acid and adjusting for urinary osmolarity, we observed that increased urinary excretion of ferulic acid was associated with a greater risk of UTI developing in infants aged under 1 year (RR 1.06; CI 95% 1.024–1.1;  $P = 0.001$ ). As the prevalence of UTI was greater among the infants aged under 1 year, we adjusted the Cox's regression for urinary osmolarity and age, thus obtaining a relative risk for UTI of 1.04 (CI 95% 1.02–1.08). In the children aged 1–3 years and over three years, the relative risk of UTI associated with increased ferulic acid was 0.97 (CI 95% 0.79–1.27;  $P = 0.96$ ) and 1.01 (CI 95% 0.86–1.19;  $P = 0.88$ ), respectively.

#### 9.4.3. Analysis of urinary excretion of metabolic phenolic acids

The urinary excretion of total phenolic acids of metabolic origin among the patients given cranberry syrup was  $681.5 \mu\text{Mol/g creatinin}$  (SD 573.2), versus  $664.6 \mu\text{Mol/g creatinin}$  (SD 656.4) for those given trimethoprim. In the children aged under 1 year, the urinary excretion of homovanillic acid was significantly greater among those given cranberry syrup ( $t = 2.49$ ;  $P = 0.01$ ); this difference was not observed in the other age groups.

Table 9.7. Urinary excretion of phenolic acids of metabolic origin by age strata.

(µMol/g creatinin)	Under 1 year			1–3 years			Over 3 years			Total		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD
3-coumaric acid	37	0.0	0.0	27	0.0	0.0	28	0.0	0.0	92	0.0	0.0
Isoferulic acid	37	5.0	7.7	27	1.4	1.7	28	2.9	3.8	92	3.3	5.6
Dihydroferulic acid	36	5.0	6.7	27	6.2	12.4	28	3.5	3.9	91	4.9	8.2
3,4-di-dihydroxy phenylpropionic acid	37	4.2	6.6	27	2.1	2.2	28	2.1	2.5	92	2.9	4.6
<i>m</i> -hydroxyphenyl propionic acid	37	1.8	4.3	27	5.1	18.4	28	2.3	3.3	92	2.9	10.5
<i>p</i> -hydroxyphenyl propionic acid	37	0.1	0.2	27	3.7	14.5	28	0.0	0.1	92	1.1	7.9
Homovanillic acid	37	116.4	39.1	27	75.7	36.8	28	50.3	22.7	92	84.4	44.1
3,4-di-hydroxyphenyl acetic acid	37	32.4	20.9	27	22.1	17.5	28	16.6	8.0	92	24.6	18.0
3-hydroxyphenyl acetic acid	37	16.1	21.3	27	48.6	55.2	28	27.3	34.2	92	29.02	39.7
4-hydroxyphenyl acetic acid	37	488.7	393	27	253.8	324	28	154.3	57.0	92	318.0	337
Vanillic acid	37	252.3	529	27	145.6	176	28	80.5	111	92	168.7	359
3-hydroxybenzoic acid	37	0.5	1.9	27	1.9	6.5	28	0.4	1.5	92	0.9	3.8
4-hydroxybenzoic acid	37	40.9	30.7	27	37.9	55.7	28	19.8	11.9	92	33.6	37.2
Total metabolic phenolic acids	37	963.1	730	27	593.6	594	28	359.7	181	92	671.0	622

Only among the children aged over 3 years did we observe levels of 4-hydroxybenzoic acid that were significantly greater among the children who developed a urinary infection. Cox's regression analysis did not reveal any change in the risk of UTI associated with a greater excretion of phenolic acids of metabolic origin.

### 9.5. Phenolic acids in urine and antiadherent properties

Levels of phenolic acid in urine were determined in urine samples from 57 randomly-chosen patients from the ISRCTN16968287 clinical assay, at the Institute of Public Health and Clinical Nutrition, Kuopio, Finland. Of these 57 patients, 32 received trimethoprim and 25 patients received cranberry syrup. The following phenolic acids, with diverse benzoic, acetic, propionic and cinnamic acid derivatives, were analysed; *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, syringic, gallic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, *m*-hydroxyphenylacetic, homovanillic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, *m*-hydroxyphenylpropionic, dihydroferulic, dihydroisoferulic, caffeic, ferulic, sinapinic, isoferulic, *p*-coumaric and *m*-coumaric. These compounds cover a wide range of metabolites and dietary phenolic acids; they constitute a fragmentation product of procyanidins<sup>186, 187</sup> and were measured to evaluate fragmentation into other phenolic metabolites.

### 9.5.1. Urinary excretion of phenolic acids, with respect to biofilm formation and surface hydrophobicity of *E. coli*

Table 9.8 shows the concentrations of phenolic acids recorded for the first morning urine samples from patients receiving trimethoprim or cranberry syrup treatment (a single evening dose) for UTI. There were significant differences in the urinary levels of ferulic acid and of *m*-hydroxybenzoic acid. Simple linear regression analysis revealed a significant association between surface hydrophobicity and *m*-hydroxybenzoic acid, and multiple regression analysis enabled us to derive a predictive model with  $R^2 = 0.45$  ( $F = 8.3$ ;  $p < 0.001$ ) that included *m*-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid and homovanillic acid ( $y = 0.74 - 0.05 \times m\text{-hydroxybenzoic acid} - 0.03 \times 3,4\text{-dihydroxyphenylpropionic acid} + 0.003 \times \text{homovanillic acid}$ ). According to the simple linear regression analysis, the inhibition of biofilm formation by *E. coli* is associated with the concentration of isoferulic acid in urine. Multiple regression analysis produced a predictive model that incorporated isoferulic acid and ferulic acid with  $R^2 = 0.26$  ( $F = 5.49$ ;  $p < 0.01$ ) ( $y = 0.65 + 0.05 \times \text{isoferulic acid} - 0.01 \times \text{ferulic acid}$ ).

Table 9.8. Phenolic acid content (mean (SD)) in the first morning urination of patients receiving nocturnal trimethoprim or cranberry treatment. Duplicate measurements. We observed levels of ferulic, isoferulic and *m*-hydroxybenzoic acids in patients taking cranberry.

( $\mu\text{Mol/g creatinine}$ )	Cranberry	Trimethoprim
Protocatechuic acid	3.6 (2.9)	4.1 (4.1)
Syringic acid	1.3 (2.6)	0.5 (0.7)
Caffeic acid	1.2 (2.6)	0.6 (2.4)
Ferulic acid	13.5(16.1)*	7.8 (9.8)
Sinapinic acid	0.7 (4.2)	0.02 (0.2)
<i>p</i> -Coumaric acid	1.6 (4.4)	0.5 (1.2)
Isoferulic acid	4.3 (5.4)**	2.6 (4.0)
Dihydroferulic acid	4.9 (9.6)	4.7 (7.4)
3,4-dihydroxyphenylpropionic acid	2.3 (3.4)	3.3 (5.2)
<i>m</i> -Hydroxyphenylpropionic acid	4.4 (16.2)	1.9 (4.0)
<i>p</i> -Hydroxyphenylpropionic acid	0.9 (5.1)	1.2 (9.3)
Homovanillic acid	94.9 (50)	77.8 (38)
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	23.7 (16.8)	25.0 (18)
<i>m</i> -Hydroxyphenylacetyl acid	36.5 (50)	24.4 (31)
<i>p</i> -Hydroxyphenylacetic acid	334 (355)	308 (328)
Vanillic acid	141 (154)	185 (440)
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	4.47 (3.1)*	1.98 (4.0)
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	34 (24)	33 (43)
Total phenolic acid	696 (598)	685 (668)

\*  $P < 0.05$ .  
\*\*  $P < 0.01$ .

Table 9.9 shows the percentages of hydrophobicity and percentages of adherence of each of the *E. coli* strains used in this studio. Table 9.10 shows the matutine excretion of phenolic acids after a previous intake of cranberry syrup or thrimetroprim at a prophylactic dose for recurrent UTI the night before. Percentages of hydrophobicity and adherence of *E.coli* subsets were modified in some occasions after the ncubation with

patient's urine. These modifications were observed to be related to the content of phenolic acids in each urine sample. (Table 9.10).

Our data corroborate the relation between the increased presence of hydroxybenzoic acid in urine and a decrease in the Surface hydrophobicity of *E. coli*. In addition, our results show that the presence of isoferulic acid in urine is associated with decreased biofilm formation by *E. coli*.

Table 9.9. Mean adherence (biofilm formation) and hydrophobicity of the strains of *E. coli* studied.

<i>E. coli</i> strains	$\Delta$ adh	% Hydrophobicity
4076	1.74	90
471	0.97	95
787	1.38	95
695	1.30	80
417	1.05	95
629	1.13	85
Total	1.26 (DS 0.27)	90 (DS 6.3)

Table 9.10. Linear regression analysis – B coefficient and the standard error (SE) – of the variability of surface hydrophobicity and the inhibition of biofilm formation by *E. coli* in the urine samples and the corresponding phenolic acid content. In patients receiving cranberry the increment of urine levels of caffeic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic and *m*-hydroxybenzoic acids were associated with decrease in surface hydrophobicity of *E. coli*.

	$\Delta$ Hydrophobicity			$\Delta$ Biofilm inhibition		
	Cranberry	Trimethoprim	Total	Cranberry	Trimethoprim	Total
Protocatechuic acid	0.004 (0.13)	-0.012 (0.02)	-0.09 (0.01)	-0.016 (0.013)	-0.011 (0.024)	-0.01 (0.01)
Syringic acid	0.009 (0.15)	0.01 (0.12)	0.002 (0.002)	0.005 (0.015)	-0.06 (0.106)	-0.004 (0.02)
Caffeic acid	-0.07* (0.02)	0.019 (0.01)	0.009 (0.01)	0.023 (0.033)	-0.003 (0.02)	0.0001 (0.01)
Ferulic acid	0.001 (0.003)	0.002 (0.009)	0.003 (0.004)	0.003 (0.003)	-0.001 (0.01)	0.001 (0.004)
Sinapinic acid	0.002 (0.008)	0.000 (0.000)	0.007 (0.01)	0.003 (0.007)	0.000 (0.000)	0.001 (0.01)
<i>p</i> -Coumaric acid	-0.07 (0.04)	0.106 (0.116)	0.01 (0.06)	0.042 (0.05)	0.21 (0.11)	0.09 (0.05)
Isoferulic acid	-0.01 (0.01)	0.044* (0.02)	0.01 (0.01)	0.012 (0.01)	0.05* (0.02)	0.02* (0.01)
Dihydroferulic acid	0.000 (0.000)	-0.007 (0.011)	-0.01 (0.007)	-0.002 (0.01)	-0.005 (0.008)	-0.003 (0.006)
3,4-dihydroxy-phenylpropionic acid	-0.03* (0.01)	-0.01 (0.01)	-0.01 (0.008)	0.005 (0.018)	-0.007 (0.012)	-0.003 (0.008)
<i>m</i> -Hydroxy-phenylpropionic acid	0.001 (0.01)	-0.006 (0.01)	-0.007 (0.01)	-0.006 (0.012)	0.014 (0.014)	0.01 (0.009)
<i>p</i> -Hydroxy-phenylpropionic acid	0.04 (0.11)	0.000 (0.000)	0.11 (0.18)	0.118 (0.109)	0.000 (0.000)	0.08 (0.17)
Homovanillic acid	0.002 (0.002)	0.001 (0.002)	0.001 (0.001)	-0.002 (0.002)	0.002 (0.002)	0.001 (0.001)
3,4-Dihydroxy-phenylacetic acid	0.005 (0.007)	0.001 (0.003)	-0.001 (0.003)	-0.012 (0.006)	0.0001 (0.003)	0.0001 (0.003)
<i>m</i> -Hydroxy-phenylacetic acid	0.001 (0.001)	-0.001 (0.003)	0.0001 (0.001)	0.0001 (0.002)	0.004 (0.003)	0.002 (0.002)
<i>p</i> -Hydroxyphenyl-acetic acid	0.0001 (0.0001)	0.001 (0.001)	0.0001 (0.001)	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.0001)
Vanillic acid	0.0001 (0.0001)	0.001 (0.001)	0.0001 (0.0001)	-0.001 (0.0001)	0.001 (0.001)	0.0001 (0.0001)
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	-0.043* (0.02)	-0.045* (0.02)	-0.05** (0.01)	-0.08 (0.01)	-0.018 (0.023)	-0.01 (0.18)
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.004 (0.003)	-0.002 (0.002)	-0.002 (0.002)	0.0001 (0.003)	-0.001 (0.002)	0.0001 (0.002)
Total phenolic acid	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.001)	0.001 (0.001)	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.0001)	0.0001 (0.0001)

\* P < 0.05.  
\*\* P < 0.01.



## **10. DISCUSSION**



---

## DISCUSSION

---

### 10.1. In vitro anti-adhesive properties of cranberry extract

Our study shows that cranberry syrup can modify the surface hydrophobicity and the biofilm formation of *E. coli* on polystyrene (microtitre plates), the latter effect being dependent on the characteristics of the culture medium. The greater expression of P fimbriae, as a response to the culture medium, was not found to be related with the greater formation of biofilm.

The first step in the colonisation of the epithelium by *E. coli* is determined by its capacity to adhere to the host cells; this capacity is determined, initially, by the micro-organism's electric surface charge and its surface hydrophobicity, and subsequently by other factors, such as the formation of diverse types of fimbriae, and of specific adhesins<sup>188-190</sup>. Miyazaki et al.<sup>17</sup>, showed that fimbriae types 1, P and S are not essential factors in the adhesion and later colonisation of the urogenital epithelium by *E. coli*. These adhesins may, in general, be considered features of the virulence of extra-intestinal *E. coli*, but they are not essential for *E. coli* to become uropathogenic, which accounts for current research interest into the extent to which cranberry extract may affect the nonspecific adherence properties of *E. coli*. Cross-talk among *pilus operons* within a bacterial cell, probably triggered by environmental cues, can result in a switch in expression from one pilus type to another, a process known as phase variation. The variable increases the probability of adherence and invasion of the uroepithelium<sup>191</sup>.

Cranberries contain different amounts of fructose, PACs, flavonoids and anthocyanins. PACs isolated from cranberry fruit consist of predominantly epicatechin units with at least one A-type linkage. The A-linkage in cranberry PACs may represent an important structural feature for bacterial anti-adherence activity. The type A cranberry PACs prevent adherence of P-fimbriated uropathogenic *E. coli* to uroepithelial cells in vitro<sup>192</sup>. The cultivation of *E. coli* in CFA broth favours the expression of P fimbriae<sup>177</sup>. We observed that the incubation of *E. coli* in CFA broth with cranberry syrup does not alter the formation of biofilm, from which we infer that the increased expression of P fimbriae is not related to the formation of biofilm.

The latter finding differs from that observed after culture in TSB broth, implying that biofilm formation can be inhibited by cranberry syrup, depending on the characteristics of the culture medium, while the expression of P fimbriae is not an important element in the formation of biofilm. Hancock et al.<sup>193</sup> showed that the expression of P fimbriae significantly decreases biofilm formation under different growth conditions.

The incubation of *E. coli* with cranberry syrup extract produces a reduction in the surface hydrophobicity, dependent on the concentration of the extract but non-dependent on the different culture media (Figure 9.1). This effect may be different from the inhibition of P fimbriae of cranberry PACs, since according to our findings and those of Hancock et al.<sup>193</sup>, P fimbriae have little influence on the formation of biofilm. Further studies are currently being conducted, involving a partitioning of the components of the cranberry syrup and a study of the effects thus produced. With respect to surface hydrophobicity, the incubation of *E. coli* with a 1:1000 dilution of cranberry extract, which does not affect the haemagglutination mediated by Type P fimbriae, does produce significant reductions in the surface hydrophobicity, thus showing that extremely low levels of this extract are capable of modifying the non-specific adherence properties of *E. coli*. According to our own results, the adherence of *E. coli* to nitrocellulose is not related to the predominant expression of Type P or Type 1 fimbriae, and incubation with cranberry syrup extract does not affect adherence rates.

We conclude that, depending on the culture medium, cranberry can modify the non-specific adherence properties of *E. coli* and alter its ability to form biofilm.

## **10.2. Efficacy and safety profile of cranberry in infants and children with recurrent urinary tract infection**

Our study confirms that the use of cranberry is safe in infants and children. The efficacy of cranberry is not inferior to that of trimethoprim for the prophylaxis of recurrent UTI in children, although its efficacy in infants less than 1 year of age can be considered inferior to that of trimethoprim at the doses we administered.

Under the principles of the Declaration of Helsinki, a clinical trial with placebo cannot be carried out in our circumstances<sup>194</sup> and therefore, for ethical reasons, the present study was designed as a test of equivalence or non-inferiority. Clinical practice guidelines recommend the use of trimethoprim prophylaxis in children with VUR grade III and IV. In addition, some trials such as Craig et al.<sup>195</sup>, have observed benefits from antibiotic prophylaxis in pediatric recurrent UTI.

Two studies assessed the effectiveness of cranberry in children with neurogenic bladder managed by clean intermittent catheterisation<sup>144, 145</sup>. The first study had a single-blind cross-over design and included 40 children, and the second was a double-blind placebo-controlled study and included 15 children. Both studies concluded that cranberry concentrate was no more effective than placebo in controlling UTI in patients with neurogenic bladder. However, neither study characterised the polyphenolic content of the cranberry preparations used. McMurdo et al.<sup>196</sup>, conducted a randomised double-blind trial with cranberry or trimethoprim in women at risk of recurrent UTI. The authors observed that the risk of UTI recurrence was 60% higher in patients receiving cranberry, although the finding was not statistically significant.

The clinical trial carried out by Uberos et al.<sup>197</sup>, demonstrated the noninferiority of cranberry against trimethoprim in a sample of children younger than 14 years; this study did not stratify the sample by age and did not take into account the relationship between cranberry intake and urinary excretion of phenolic acids. In the last systematic review published by Jepson<sup>10</sup>, with a total of 10 studies included (1049 patients); concluded that cranberry, compared to placebo or control treatment, significantly

decreased the incidence of UTI over a 12 months period (RR, 0.65; 95% CI, 0.46---0.90). Cranberry was more effective in reducing the incidence of UTI in women with recurrent UTIs than in men, older women or patients requiring catheterisation.

Previous studies<sup>87</sup>, have demonstrated the beneficial effect of cranberry in the prevention of UTI in women, with a lower absolute risk of UTI relative to placebo. In a placebo-controlled clinical trial in children older than 3 years, Ferrara et al.<sup>139</sup>, demonstrated that cranberry prevents the recurrence of symptomatic UTIs. Our study is the first randomised controlled double-blind trial that demonstrates the safety of cranberry in infants and children.

Foo et al.<sup>34</sup>, identified trimeric proanthocyanidins and type A dimeric procyanidins as the factors responsible for the anti-adherent effect of cranberry. The composition of cranberry syrup used in our study could be of interest for future comparison of our results with those reported in other studies, given the great variability in the concentrations of proanthocyanidin observed in different cranberry extracts<sup>35, 198</sup>.

Howell et al.<sup>68</sup>, found evidence that the anti-adhesion activity of cranberry is greater when the amount of proanthocyanidins administered in the cranberry preparation is higher than 18 mg. Since no data were available on the use of cranberry in infants, for our study we decided to extrapolate from the adult dosage and administer 0.2 mL of the syrup per kilogram of body weight. Our results show that cranberry is not inferior to trimethoprim when the dose of proanthocyanidins is above 18 mg, which is the dose that would be administered per kilogram of body weight in a one-year old infant.

Salo et al.<sup>140</sup>, published a double-blind trial comparing cranberry juice with placebo in children with recurrent UTI, and observed that the intervention did not reduce the number of urinary infections. Unlike our cranberry syrup, which was characterized<sup>79</sup>, the cranberry juice used in the above study had a nonstandardised concentration of polyphenols. We believe it is essential to characterize the extracts used and to normalize the contents of the active polyphenolic fractions of each extract in this type of study.

It was drawn to our attention after the trial that 75 patients received prophylaxis with cranberry and 117 with trimethoprim. This difference in the sizes of the treatment arms was due to an unfortunate problem with the randomization of patients, due to the misfiling of randomization folders in some medical practices. We believe these errors, which occurred toward the end of the study, may represent a bias in the randomization, but not a loss of masking, since the researchers did not know which treatment corresponded to each file. In any case, we observed no difference in the infection survival times in patients receiving cranberry with respect to those receiving trimethoprim, despite the lower number of patients in the cranberry treatment branch.

The prophylaxis of UTI has been associated with increased bacterial resistance to antibiotics<sup>199</sup> (Table 9.4). In our sample, we did not observe a significant increase in this respect between the two branches of the trial. Our results show the noninferiority of cranberry syrup versus trimethoprim in the prophylaxis of recurrent urinary tract infections. Cranberry syrup is a safe treatment for the pediatric population and may constitute a valid alternative approach, especially in view of increasing resistance to antibiotics.

Finally and as previously mentioned, it was noted that the anti-adhesion activity of cranberry is dose dependent, and the best results were obtained in patients more than 1 year of age in whom the administration of more than 18 mg of proanthocyanidins was guaranteed. Therefore, we believe that it is necessary to conduct other studies assessing the efficacy of different dosages of cranberry in infants less than 1 year of age.

### 10.3. Analysis of urinary excretion of phenolic acids

The excretion of ferulic and homovanillic acids was greater among the infants aged less than 1 year than in the other age groups. These infants presented a greater frequency of UTI, which was significantly related to the greater excretion of ferulic acid. The increased excretion of homovanillic acid during treatment with cranberry syrup could be of interest with respect to designing studies such as the determination of catecholamines and their metabolites in children with possible neuroblastomas or pheochromocytomas. This aspect has been discussed by Combet et al.<sup>200</sup>. Other authors<sup>201</sup>, have observed that a diet of cereals supplemented with berries can cause an increase in the urinary excretion of homovanillic acid. Ferulic acid is the phenolic acid most abundantly excreted in the urine when a cereal diet is consumed<sup>173</sup>. Nevertheless, the strong association observed between the excretion of ferulic acid and the risk of urinary infection requires further investigation. Ferulic acid has presented in vitro activity as an inhibitor of interleukin<sup>74, 202</sup> with a pro-inflammatory and neutrophil activating effect. In consequence, various forms of traditional medicine have used the rhizome of *Cimicifuga sp.*, which contains high concentrations of ferulic and isoferulic acid, as a remedy for various inflammatory processes<sup>203</sup>. It seems reasonable to believe that persistent high concentrations of ferulic acid in the urine could favour the development of urinary infections, by inhibiting the host's pro-inflammatory mechanisms. Cranberry syrup has been found useful for treating UTI in adults<sup>10, 196</sup> and children<sup>139</sup>. Various studies have related the bioactivity of cranberry with its content of proanthocyanidins<sup>34, 204</sup>. Lavigne et al.<sup>205</sup> observed that the anti-adherent effect of cranberry is dosedependent, and therefore the concentration of proanthocyanidins in urine determines the anti-adherent effect and, thus, clinical efficacy. In our study, due to the lack of references to comparable studies of a paediatric population, we considered the cranberry dose recommended for adults and adjusted it accordingly to body mass. The determination of proanthocyanidins in urine presents results that are at the limits of sensitivity for the measuring equipment used. At the same time, the concentrations of phenolic acids in urine are equivalent for most fractions in patients given either cranberry or trimethoprim. Subsequently, we believe that the doses of cranberry syrup used in this study might be insufficient for the lowest-weight infants. This age group, with urinary excretion featuring high levels of ferulic acid, should be given a fixed amount of cranberry syrup in order to ensure a minimum concentration of proanthocyanidins in the urine. The cranberry syrup used in this study was characterised and found to contain variable concentrations of flavonoids, flavonols, proanthocyanidins and low concentrations of ferulic acid<sup>79</sup>. Therefore, we believe the high levels of ferulic acid detected in infants younger than 1 year were probably due to their higher dietary intake of cereals. Some of these compounds, particularly the glycoside flavonoids, may be absorbed in the small intestine and eliminated in the urine<sup>206</sup>. Actually, it is accepted that, while various hydroxycinnamic acids are subject to cellular metabolic metabolism, most of the polyphenolic compounds are broken down by intestinal microflora in the colon. Up to 44% of the protocatechuic acid is derived from the anthocyanins consumed, especially the cyanidin-3-glucoside<sup>207</sup>. Dietary

flavonols and especially quercetin could be metabolised, mainly into phloroglucinol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid<sup>208</sup>. The procyanidins in the diet are metabolised by the intestinal microflora, fundamentally into 3,4-di-dihydroxyphenylpropionic, protocatechuic, 4-hydroxybenzoic and 3,4-dihydroxyphenylacetic acids, which are eliminated in the urine<sup>170</sup>. In our study, the patients who were given cranberry syrup presented a urinary excretion of 3,4-di-dihydroxyphenylpropionic, protocatechuic and 3,4-dihydroxyphenylacetic acids similar to that of the patients which were given trimethoprim. It is noteworthy that the children older than 3 years who developed UTI presented higher urinary concentrations of 4-hydroxybenzoic acid, which could indicate a greater metabolism by the intestinal microflora of the proanthocyanidins supplemented with the syrup. According to the results obtained, the excretion of ferulic acid is higher in infants younger than 1 year. This is assumed to be related to the predominance of cereals in the diet and not to the ingestion of cranberry or trimethoprim. However, as we did not conduct a nutritional survey and due to problems in the randomization process, we cannot be categorical in this respect. This increased excretion of ferulic acid was associated with an increased risk of urinary infection.

#### 10.4. Phenolic acids excretion in urine and its relationship with antiadherent properties and recurrence of urinary tract infection

In 1984, Sobota et al.<sup>73</sup>, observed that cranberry interferes with the adhesion of P-fimbriated *E. coli* to the epithelium, and showed that this could be one of the main mechanisms accounting for the non-adherent effect of cranberry. Two mechanisms may be involved in this process: a) the fructose present in many fruit juices, including cranberry, may also inhibit the adhesion of *E. coli* mediated by type 1 fimbriae<sup>108</sup>; b) the adherence mediated by P fimbriae has been associated with the lectin-specific  $\alpha$ -Gal(1-4) $\beta$ -Gal present in the urothelium, which is not inhibited by the addition of fructose<sup>74, 209</sup>. Foo et al.<sup>34</sup>, identified trimeric proanthocyanidins and type A dimeric procyanidins as responsible for the antiadherent effect of cranberry. These polyphenolic flavonols are not present in other extracts rich in polyphenols, such as green tea or chocolate.

The cranberry syrup used in our test contained 22% type A proanthocyanidins, an aspect of interest in the comparison of our results with those reported elsewhere, given the considerable variability in the concentrations of proanthocyanidin measured in different berry extracts<sup>35, 198</sup>. The systematic review by Jepson et al.<sup>10</sup>, with ten studies, and a total of 1049 patients, concluded that cranberry compared to placebo/control significantly reduced the incidence of UTI during 12 month follow-up (RR 0.65; 95% CI 0.46–0.90). Cranberry more effectively reduced the incidence of recurrent UTI in women than in men and older women, and in patients requiring catheterisation. The antiadherent effect of PACs on bacterial adherence has been demonstrated *in vitro* by various authors<sup>17, 74, 197</sup>. However, *in vivo*, PACs are rapidly metabolised in the liver and intestine and the metabolites are eliminated in the urine<sup>210, 211</sup>. In a clinical trial of adults, doses 3 times higher than those used in this study were administered, and the level of PACs in the urine could not be quantified<sup>83</sup>. In total, 32 metabolites were tentatively identified, including methylated and glucuronide conjugated forms. Among these, free phenolic acid derivatives (coumaroyl hexose, dihydroxybenzoic acid, caffeoyl glucose and dihydroferulic acid 4-O- $\beta$ -D-glucuronide), flavonols (methoxyquercetin 3-Ogalactoside, myricetin and quercetin) and one coumarin (scopoletin) were detected in the human urine. The highest concentration of these metabolites in urine is reached at 4

hours after the consumption of cranberry. Further studies are currently in progress, seeking to extend our knowledge of the bioavailability of cranberry-derived polyphenols and to obtain new insights into active metabolites<sup>83</sup>.

Sublethal doses of antibiotics, including trimethoprim, seem to effectively reduce the surface hydrophobicity of *E. coli* (*in vitro*). This effect has been observed by various authors<sup>212, 213</sup>, and seems to be related to the alteration of cell wall protein synthesis by the antibiotic. Cranberry has antioxidant properties which could modify the *E. coli* adhesion to the uroepithelium. As described in a previous study,<sup>213</sup> the incubation of *E. coli* with or without melatonin did not produce significant differences in surface hydrophobicity. A tendency was observed towards a reduction of the latter in the presence of melatonin (a potent free radicals scavenger). This reduction was greater when *E. coli* was incubated with another antioxidant, vitamin E. It is therefore concluded that in *E. coli*, the antioxidant effect of vitamin E is reflected as a significant reduction in surface hydrophobicity. It is noteworthy that *E. coli* did not respond in the same way to melatonin, which in most situations is a powerful antioxidant<sup>214, 215</sup>.

Phenolic acids are considered to be products of the fragmentation of the procyanidins, flavonols and catechins present in the diet or in cranberry treatment<sup>170, 186</sup>. We recorded levels of ferulic acid and of *p*-coumaric acid that were slightly higher, or at the limit of statistical significance, in the group receiving cranberry. No significant differences were observed in the other phenolic acids studied.

Hydroxybenzoic acid (gallic acid) and hydroxycinnamic acid (ferulic acid) have shown antibacterial properties on *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*<sup>137</sup>. Our data corroborate the relation between the increased presence of hydroxybenzoic acid in urine and a decrease in the surface hydrophobicity of *E. coli* (Table 9.10). Other authors<sup>216</sup>, have shown that extracts of *Vaccinium myrtillus* with a high total content of phenolic compounds, especially hydroxycinnamic acid, hydroxybenzoic acid and flavonols, enhance the biocidal potential of vancomycin and linezolid against staphylococci.

Isoferulic acid is a methylated metabolite of chlorogenic acid (CGA). Phenolic compounds such as CGAs are abundantly present in certain foods. CGAs are formed by the esterification of hydroxycinnamic acids, such as caffeic, ferulic and coumaric. Other metabolites of microbial origin, namely, *m*-coumaric acid and derivatives of phenylpropionic, benzoic and hippuric acids, represented the major phenolic compounds in both urine and plasma<sup>170</sup>. In accordance with the findings of Borges et al.<sup>217</sup>, our results show that the presence of isoferulic acid in urine is associated with decreased biofilm formation by *E. coli*.

As previously mentioned, the phenolic compounds in the cranberry seem to have a very rapid metabolism *in vivo*, being subsequently eliminated in urine. We believe that some metabolites of cranberry, such as hydroxybenzoic acid or hydroxycinnamic acid, may also be responsible for the antibacterial effects described *in vivo*.

Phenolic acids are considered products of the cleavage of procyanidins, flavonols and catechins from dietary sources or cranberries<sup>170, 186</sup>. We found slightly higher levels of *p*-coumaric acid and ferulic acid at 9 h, at the limit of statistical significance, in the group of infants treated with cranberry. We found no differences in

the rest of the dietary phenolic acids analysed. In our study, we determined the phenolic acids that are considered to originate from dietary sources, that is, those whose urinary excretion is strongly influenced by diet. The urinary excretion of other phenolic metabolites that were not determined in this study may be affected not only by dietary factors, but also by the metabolism of endogenous molecules such as catecholamines<sup>200, 201</sup>. We analysed the concentration of cyanidins eliminated by the patients during their followup periods and found values below the detection limits<sup>83</sup>. The phenolic metabolites in urine found to have the strongest association with cranberry intake are caffeic acid, dihydroferulic acid, p-coumaric acid, dihydroxybenzoic acid and 4-O-b-d-glucuronic acid<sup>83</sup>.



## **11. CONCLUSIONS**



---

## CONCLUSIONS

---

1. Our study confirms that the use of cranberry is safe in infants and children. The efficacy of cranberry is not inferior to that of trimethoprim for the prophylaxis of recurrent UTI in children, although its efficacy in infants younger than 1 year of age can be considered inferior to that of trimethoprim at the doses we administered.
2. Our study shows that cranberry syrup can modify the surface hydrophobicity and the biofilm formation of *E. coli* on polystyrene (microtitre plates), the latter effect being dependent on the characteristics of the culture medium.
3. According to our own results, the inhibition of haemagglutination by P-fimbriated *E.coli* depends on Cranberry concentrations when studied *in vitro*. This effect is not related to culture media or type P fimbriae expression.
4. In our study, the phenolic metabolites in urine found to have the strongest association with cranberry intake are caffeic acid, dihydroferulic acid, p-coumaric acid and dihydroxybenzoic acid.
5. In view of the rapid metabolism *in vivo* of the phenolic compounds in the cranberry, which are subsequently eliminated in the urine, we believe that some metabolites of cranberry, such as hydroxybenzoic acid or hydroxycinnamic acid, may also be responsible for the antibacterial effects described *in vivo*.
6. The excretion of ferulic and homovanillic acids was greater among the infants younger than 1 year than in the other age groups. These infants presented a

greater frequency of UTI, which was significantly related to the greater excretion of ferulic acid.

7. We observed greater levels of ferulic, isoferulic and *m*-hydroxybenzoic acids in patients taking cranberry. Isoferulic acid is a methylated metabolite of chlorogenic acid, formed by the esterification of hydroxycinnamic acids, such as caffeic, ferulic and coumaric. In accordance with our results, the presence of isoferulic acid in urine is associated with decreased biofilm formation by *E. coli*.
8. In patients receiving cranberry, the increment of urine levels of caffeic, 3,4-dihydroxy-phenylpropionic and *m*-hydroxybenzoic acids is associated with decrease in surface hydrophobicity of *E. coli*, which could indicate a greater metabolism by the intestinal microflora of the proanthocyanidins supplemented with cranberry.
9. We believe that the doses of cranberry syrup used in this study might be insufficient for the lowest-weight infants. This age group, with urinary excretion featuring high levels of ferulic acid, should be given a fixed amount of cranberry syrup in order to ensure a minimum concentration of proanthocyanidins in the urine.
10. Our study shows a non-significant trend to reduce resistances to amoxicillin and trimethoprim and sulfamethoxazole in positive urine cultures of children taking Cranberry. Further studies should be performed to assess this valuable added action.

## **12. ANEXOS**



---

## ANEXO 1

---

### Normativa y Registro de ensayos clínicos

#### Autorización del ensayo clínico por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMYPs)

Es de aplicación la siguiente normativa legal:

- LEY 29/2006, de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. (BOE 178, de 27 de julio).
- REAL DECRETO 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.
- REAL DECRETO 824/2010, de 25 de junio, por el que se regulan los laboratorios farmacéuticos, los fabricantes de principios activos de uso farmacéutico y el comercio exterior de medicamentos y medicamentos en investigación. (BOE núm. 165, de 8 de julio de 2010). (Modificado por la Disposición final primera del Real Decreto 782/2013, de 11 de octubre, sobre distribución de medicamentos de uso humano).
- ORDEN SCO/362/2008, de 4 de febrero. Modifica la ORDEN SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano (BOE 41, de 16 de febrero).
- ORDEN SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano (BOE 38, de 13 de febrero).

La norma básica que regula los ensayos clínicos en España es la La Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. <http://www.agemed.es/actividad/legislacion/espana/general.htm>. En ella, el título III es específico sobre ensayos clínicos con medicamentos. Las tasas se establecen en el título X, y el capítulo II fija las infracciones y sanciones. La normativa comunitaria se traspone mediante el Real Decreto 223/2004, <http://www.agemed.es/actividad/legislacion/espana/ensayos.htm> de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, y la ORDEN SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano. <http://www.agemed.es/actividad/legislacion/espana/ensayos.htm> Algunos de los artículos del Real Decreto 223/2004, remiten a las “Instrucciones para la realización de

ensayos clínicos” o a las directrices de la Comisión Europea, que incluyen las guías detalladas sobre el formato de solicitud y documentación referente a las solicitudes de autorización de ensayos clínicos por las autoridades competentes y de dictamen sobre ensayos clínicos con medicamentos dirigidas a un comité ético, y la guía detallada sobre la recogida, verificación y presentación de las notificaciones de reacciones adversas ocurridas en ensayos clínicos con medicamentos de uso humano. Todas las Directivas y guías de desarrollo europeas en materia de ensayos clínicos están incluidas en el volumen 10: <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>

El promotor es la persona física o jurídica responsable de la realización del ensayo clínico en España tal como establece el Real Decreto 223/2004. Por tanto, a los efectos de la solicitud de autorización de ensayo clínico ante la AEMPS el promotor debe ser único, y es imprescindible que conste el promotor indicado en el protocolo en todos los documentos referentes al ensayo clínico. El promotor puede ser uno de los investigadores del ensayo.

Toda solicitud de autorización de ensayo clínico presentada a la AEMPS así como toda solicitud de dictamen sobre un ensayo clínico presentada a un CEIC debe estar firmada por el promotor o por una persona o entidad autorizada por el mismo que constará en el apartado “solicitante” del formulario de solicitud. Cuando la solicitud no sea firmada por el promotor, se deberá presentar un documento en el que el promotor autorice a la persona o entidad correspondiente a firmar en su nombre. Quien conste en el apartado “solicitante” del formulario de solicitud será a todos los efectos el interlocutor con la AEMPS o los CEICs y será quien reciba los documentos oficiales relacionados con el ensayo. La persona de contacto que se indique en el apartado solicitante será la que se contacte en relación con posibles cuestiones a aclarar sobre el ensayo.

Cada ensayo clínico se deberá identificar mediante dos códigos invariables que figurarán en toda la documentación del ensayo: el código de protocolo del promotor y el número EudraCT.

- Código de protocolo del promotor: Código asignado por el promotor al ensayo. Será alfanumérico con una extensión mínima de 5 y máxima de 35 caracteres, en el que no se tendrán en cuenta las mayúsculas. Podrá incluir cualquier carácter del alfabeto internacional, excepto espacios en blanco. No incluirá la fecha o número de versión.
- Número EudraCT: Con el fin de proporcionar una identificación única para los ensayos clínicos en los que participe al menos un centro ubicado en la Comunidad europea, cada ensayo deberá identificarse por un número único – el número EudraCT-, que deberá constar en todas las solicitudes de ensayo clínico que se presenten en algún Estado Miembro y se utilizará como elemento para identificar el ensayo en la documentación correspondiente (ej. en las notificaciones de reacciones adversas graves e inesperadas). El número EudraCT se otorgará de forma centralizada en <http://eudract.emea.europa.eu/> siguiendo los pasos indicados en el apartado 22 de este documento.

Para el ensayo clínico que nos ocupa el número de Eudract 2007-004397-62

## Registro Internacional de ensayos clínicos

A finales del siglo pasado se crearon diversos registros públicos para ensayos clínicos. Destacan algunas iniciativas: en Estados Unidos se creó un registro financiado con dineros públicos ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)); en Europa se estableció un metarregistro ([www.controlled-trials.com](http://www.controlled-trials.com)) con el respaldo del Consejo de Investigación Médica (MRC) y del Programa de Investigación y Desarrollo del Sistema Nacional de Salud (NHS) del Reino Unido, y la Colaboración Cochrane también asumió un papel pionero con su Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL). En julio de 2004 los Institutos de Investigación Sanitaria de Canadá (Canadian Institutes of Health Research, CIHR) pidieron que todos sus estudios se registraran en [www.controlledtrials.com](http://www.controlledtrials.com) y convocaron una reunión en Ottawa donde se originó la llamada Declaración de Ottawa, cuya primera parte, traducida al castellano, se ha incluido como primicia en este número de la Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health (RPSP/PAJPH) 44. La Declaración, de carácter internacional, pide el registro temprano y detallado de todos los ensayos clínicos, de las enmiendas de sus protocolos, y de todos sus resultados. Dicha Declaración fue instrumental, a su vez, para el desarrollo de la Plataforma Internacional de Registro de Ensayos Clínicos (ICTRP), que la Organización Mundial de la Salud (OMS) gestó con el aval de la Asamblea Mundial de la Salud y que se describirá en mayor detalle en párrafos subsiguientes. La Plataforma también ha sido respaldada por una declaración del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (ICMJE) y por la Federación Internacional de la Industria del Medicamento (IFPMA, por International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Associations).

Las revistas biomédicas y sus directores están en una posición idónea para fomentar la transparencia y las prácticas éticas en el campo de la investigación. Estimuladas por la Plataforma de la OMS, muchas revistas médicas han impuesto el registro como requisito para la publicación de estudios. El registro obligatorio se aplica a ensayos clínicos con seres humanos, con o sin grupo testigo o aleatorización, sin importar el tipo de intervención realizada o la fase en que se encuentre el ensayo. Por "intervención" se entiende cualquier medicamento, tratamiento quirúrgico o psiquiátrico, dispositivo o prótesis, técnica de modificación conductual, asesamiento u otra medida con que se busca un resultado sanitario en particular. Por lo pronto no es preciso registrar estudios epidemiológicos o ecológicos que evalúan retrospectivamente o prospectivamente los efectos sanitarios de exposiciones naturales, sin una intervención deliberada.

ISRCTN16968287 - The usefulness of Cranberry Syrup versus antibiotic prophylaxis with trimethoprim in infantile Recurrent Urinary Tract Infection

Welcome [Home](#) [Feedback](#) [Support](#) [Log on / Register](#) 10 March 2011

**ISRCTN REGISTER**

- Trial registration
- Unique identification scheme
- International databases

[home](#) | [my details](#) | [ISRCTN Register](#) | [mRCT](#) | [links](#) | [information](#) | [press](#)

[Find trials](#) [\[Print-friendly version\]](#) [Publish your protocol](#)

[ISRCTN Register](#) [Publish your protocol](#)

[Tips on searching](#) [Publish your protocol](#)

**Registration** [Publish your protocol](#)

[New application](#) [Publish your protocol](#)

[Updating record](#) [Publish your protocol](#)

**Information** [Publish your protocol](#)

[Introduction](#) [Publish your protocol](#)

[governing board](#) [Publish your protocol](#)

[ISRCTN FAQs](#) [Publish your protocol](#)

[data set](#) [Publish your protocol](#)

[letter of agreement](#) [Publish your protocol](#)

[request information](#) [Publish your protocol](#)

[guidance notes](#) [Publish your protocol](#)

**The usefulness of Cranberry Syrup versus antibiotic prophylaxis with trimethoprim in infantile Recurrent Urinary Tract Infection**

**ISRCTN** ISRCTN16968287

**ClinicalTrials.gov identifier**

**Public title** The usefulness of Cranberry Syrup versus antibiotic prophylaxis with trimethoprim in infantile Recurrent Urinary Tract Infection

**Scientific title** Randomised, double-blind analysis of the usefulness of Cranberry Syrup versus antibiotic prophylaxis with trimethoprim in infantile Recurrent Urinary Tract Infection

**Acronym** CSRTUI

**Serial number at source** PI070274

**Study hypothesis** Given the state of uncertainty about the usefulness of antibiotic prophylaxis in children with vesicoureteral reflux we propose the following hypothesis:  
1. How effective is the cranberry syrup in preventing recurrent urinary tract infections in children?  
2. What organisms are mainly responsible for recurrent urinary tract infections in patients receiving prophylaxis with cranberry syrup?

**Ethics approval** Ethical Committe Clinical San Cecilio Hospital-dalucia (Spain) approved on 4th January 2008

**Study design** Randomised double-blind trial

**Countries of recruitment** Spain

**Disease/condition/study domain** Recurrent urinary tract infection

**Participants - inclusion criteria** 1. Children 0 to 5 years consulting for any of the points 2, 3 and 4 of this paragraph, on any visits to specialists of the Hospital Virgen de las Nieves, Clínico San Cecilio de Granada and Baza County Hospitals and Motril  
2. More than a urinary tract infection confirmed by urine culture (> 100,000 colonies / ml) and sediment with more than 20 leukocytes per field, in a urine sample collected on the prowl or urine collection bag after urethral meatus asepsis with chlorhexidine  
3. Existence of any degree vesicoureteral reflux confirmed by cystography or dilatation of the renal pelvis or urinary tract confirmed by ultrasound  
4. Existence of any anatomical abnormality of the urinary tract that current protocols of action to justify continued antibiotic prophylaxis

**Participants - exclusion** 1. Coexistence of other infectious diseases

[Follow us on twitter](#)

[http://www.controlled-trials.com/ISRCTN16968287/\[10/03/2011 22:46:02\]](http://www.controlled-trials.com/ISRCTN16968287/[10/03/2011 22:46:02])

ISRCTN16968287 - The usefulness of Cranberry Syrup versus antibiotic prophylaxis with trimethoprim in infantile Recurrent Urinary Tract Infection

<b>criteria</b>	2. Coexistence of metabolic diseases 3. Renal failure 4. Hepatic impairment 5. Existence of allergy or intolerance to any component of cranberry or trimethoprim 6. I want to show the legal responsibility not to participate in the study
<b>Anticipated start date</b>	01/01/2009
<b>Anticipated end date</b>	31/12/2010
<b>Status of trial</b>	Completed
<b>Patient information material</b>	Not available in web format, please use the contact details below to request a patient information sheet
<b>Target number of participants</b>	210
<b>Interventions</b>	Experimental group receive an evening dose of 3 ml of cranberry syrup which ensures a fixed concentration of 36 mg of proanthocyanidins. The administration is done before dinner. If vomiting occurs within 30 minutes after administration, the dose is repeated in full.  Standard treatment group receive a standard treatment with trimethoprim at 0.2 ml / kg and masked with red cochineal. Management should be before dinner. If vomiting occur within 30 minutes after administration, the dose is repeated in full.
<b>Primary outcome measure(s)</b>	Recurrence of urinary tract infection
<b>Secondary outcome measure(s)</b>	Secondary resistance to antibiotics
<b>Sources of funding</b>	Carlos III Institute of Health (Instituto de Salud Carlos III) (Spain)- Health Research Fund (Fondo de Investigaciones Sanitarias)
<b>Trial website</b>	
<b>Publications</b>	
<b>Contact name</b>	<b>Prof JOSE UBEROS</b>
Address	Servicio de Pediatría Hospital Clínico San cecilio Avda Dr. Oloriz 16
City/town	Granada
Zip/Postcode	18012
Country	Spain
<b>Sponsor</b>	Carlos III Institute of Health (Instituto de Salud Carlos III) (Spain)
Address	Subdirección General Evaluación y Fomento de la Investigación. Instituto de Salud Carlos III. C/ Sinesio Delgado, 6 28029 Madrid
City/town	Madrid
Zip/Postcode	28029
Country	Spain

<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN16968287/>[10/03/2011 22:46:02]

<b>Date applied</b>	24/02/2011
<b>Last edited</b>	10/03/2011
<b>Date ISRCTN assigned</b>	10/03/2011

© 2011 ISRCTN unless otherwise stated.

Published by  BioMed Central



---

**ANEXO 2****Memoria técnica del Servicio de Farmacia***Personal*

El servicio de farmacia cuenta con 7 farmacéuticos formados específicamente en tareas a realizar en un servicio por la especialidad de Farmacia Hospitalaria. Además en el servicio se encuentran 5 farmacéuticos residentes y 2 becarios farmacéuticos. En el estudio trabajarán el Farmacéutico responsable del área de ensayos clínicos, el jefe de servicio y la farmacéutica becaria de ensayos clínicos. Además el personal de limpieza se encargará de la limpieza general y los auxiliares de farmacia del material de laboratorio.

*Locales y Equipos*

Los locales son adecuados para la elaboración y almacenamiento de la medicación del ensayo clínico. El desarrollo del estudio se llevará a cabo en el laboratorio de farmacotecnia, que es una sala dotada de material, equipos y armarios para la elaboración de medicamentos. Se emplearán los siguientes equipos: balanza de precisión, agitador y dispensador.

La limpieza de la sala, los equipos y los utensilios se lleva por el personal de farmacia. El material del laboratorio emplea agua de calidad farmacéutica. Cuenta además con una sala independiente de ensayos clínicos, donde se almacena la documentación y la medicación. Existe un control adecuado de temperatura de la sala y de la nevera de la sala. Se lleva registro informático de la temperatura de sala y nevera. El ordenador tiene entrada controlado por usuario y contraseña y se hacen copias de seguridad.

*Tabla de aleatorización*

Se propone realizar aleatorización total de las intervenciones. En función de la población atendida por cada uno de los Centros hospitalarios de la provincia se asignan 2/3 de los reclutamientos a los hospitales de tercer nivel (Hospital Clínico San Cecilio (código 1801) y Hospital Virgen de las Nieves (código 1802)) y 1/3 a los hospitales comarcales (Hospital de Baza (código 1803) y H. de Motril (código 1804)). Se utiliza la macro para SPSS editada por JM. Domenech, A. Bonillo & R. Granero (!RNDPB V2005.03.07 (c) que aleatoriza bloques permutados de 5 sujetos. El número de sujetos correspondientes y las Tablas de aleatorización se muestran a continuación, estarán en posesión exclusiva del Servicio de Farmacia hospitalaria.

*Sistema de quejas y reclamaciones*

Se van a analizar conjuntamente las conclusiones de toda la investigación realizada sobre una reclamación relacionada con la calidad del producto. Esta responsabilidad corresponde al Dr. José Uberos y a los responsables del ensayo clínico, que deberán evaluar cualquier efecto potencial sobre el ensayo, el desarrollo del producto y los sujetos del ensayo. Para dicha tarea se facilitará una Hoja de Quejas y Reclamaciones que será archivada junto al resto de documentación del ensayo.

---

**ANEXO 3**

---

**Declaración de acontecimientos adversos***Información mínima**Acontecimientos adversos (AA)*

La información sobre todos los AA, tanto si son comunicados voluntariamente por el paciente, descubiertos por el investigador, como resultado de un cuestionario general, o detectados en exámenes físicos, en tests de laboratorio o en otros tests, se recogerá y se registrará en el cuaderno de recogida de datos, y se controlarán adecuadamente. Un AA es cualquier signo, síntoma o estado clínico indeseable que tenga lugar después del inicio de la medicación del estudio (o terapia), incluso aunque se considere que no está relacionado con el tratamiento del estudio (o terapia). La medicación del estudio (o terapia) incluye el fármaco (o terapia) en estudio y cualquier fármaco de referencia o placebo (o terapia) administrado durante cualquier fase del ensayo.

Las enfermedades/condiciones médicas que estuvieran presentes antes de iniciar la medicación en estudio, solo se considerarán AA si empeoran después de iniciado el tratamiento del estudio (cualquier procedimiento especificado en el protocolo). Los AA (pero no los acontecimientos adversos graves) que ocurran antes de iniciar la medicación en estudio, pero después de firmar el consentimiento informado, se registrarán en el cuaderno de recogida de datos. Los valores de laboratorio o resultados de tests anormales solo se considerarán AA si causan signos o síntomas clínicos, se consideran clínicamente significativos o requieren tratamiento, y se registrarán en el cuaderno de recogida de datos utilizando los signos, síntomas o diagnósticos asociados con ellos.

En la medida de lo posible, cada AA también se describirá en función de:

- 1.- Su duración (fecha de inicio y de finalización)
- 2.- Su grado de gravedad (leve, moderado, grave, muy grave)
- 3.- Su relación con la medicación en estudio (sospechada/no sospechada)
- 4.- La(s) acción(es) tomadas y, si es relevante, el resultado

*Instrucciones para completar los cuadernos de recogida de datos en el apartado de AA*

Cada AA ha de ser registrado en el cuaderno de recogida de datos proporcionado. Para más detalles, remitase al cuaderno de recogida de datos.

### *Acontecimientos adversos graves (AAG)*

La información sobre todos los AAG se recogerá y se registrará en el formulario de AAG. Un AAG se define como un signo, síntoma o condición médica indeseable que:

- 1.- Es mortal o amenaza la vida del paciente.
- 2.- Requiere o prolonga la hospitalización.
- 3.- Causa incapacidad/discapacidad permanente o significativa.
- 4.- Causa anomalía congénita o un defecto de nacimiento.
- 5.- Es clínicamente significativo, puede poner en peligro al paciente y puede requerir intervención quirúrgica o médica para evitar una de las consecuencias listadas anteriormente.

Los acontecimientos que no se considerarán que son AAG son las hospitalizaciones para:

- Tratamiento o monitorización de rutina de la indicación estudiada, no asociada con ningún deterioro de la enfermedad.
- Tratamiento electivo o planificado previamente, para una condición preexistente que no está relacionada con la indicación en estudio y que no empeoró.
- Ingreso en un hospital o en otro centro de asistencia sanitaria, no asociado con ningún deterioro de la condición.
- Tratamiento en una urgencia, en base ambulatoria, para un acontecimiento que no cumple ninguna de las definiciones de grave, descritas anteriormente, y no causa el ingreso en el hospital.

Deberán notificarse todas las reacciones adversas graves e inesperadas (RAGI) asociadas a medicamentos en investigación que hayan ocurrido en el ensayo tanto en España como en otros países tanto si el medicamento en investigación está autorizado en la UE como si no lo está. Además, cuando el medicamento en investigación que se utiliza en el ensayo no esté autorizado en ningún país de la UE el promotor deberá notificar también aquellas RAGI de las que tenga conocimiento que ocurran fuera del ensayo (i.e. en otros ensayos clínicos realizados con el medicamento en investigación, notificación espontánea si el medicamento está autorizado en un tercer país, uso compasivo, etc.). El plazo máximo de notificación es de 15 días naturales desde que el promotor tiene conocimiento de la sospecha de RAGI y de 7 días, si la RAGI ha ocasionado la muerte o puesto en peligro la vida del sujeto.

### *Procedimientos para la notificación rápida de AAG*

Cada AAG debe ser notificado por el investigador al CIEC y AEMPS si se considera que está relacionado con la medicación en estudio puede requerirse urgentemente más información al investigador para la notificación a las autoridades sanitarias.

Los AA clasificados como graves deben cumplir las exigencias legales. Al producirse un AAG, según la definición anterior, el investigador, además de efectuar el apropiado registro en la página correspondiente del CRD, deberá notificarlo inmediatamente a las autoridades sanitarias y al CIEC todos los efectos adversos que

sean a la vez graves, inesperados y posiblemente relacionados con los tratamientos en estudio. Asimismo el promotor deberá comunicar cualquier AAG posiblemente relacionado con los tratamientos en estudio, a los respectivos propietarios de la autorización de comercialización de los fármacos utilizados en el ensayo.

Se aceptará la notificación en español o en inglés y se podrá utilizar el formulario CIOMS I. Las notificaciones habrán de enviarse en soporte digital (<http://www.agemed.es/aplicaciones/home.htm>), o cuando esto no sea viable en papel, por correo postal o bien ser entregadas personalmente en la Unidad de Registro y Tasas de la AEMPS (**Parque Empresarial Las Mercedes Edificio 8, C/ Campezo 1 – 28022 Madrid**) dirigidas a:

- a) Cuando se trate de sospechas de reacciones adversas que ocurran con medicamentos no autorizados en España o con medicamentos autorizados en España que se utilicen en indicaciones no autorizadas, la notificación se dirigirá al Área de Ensayos clínicos de la Subdirección General de Medicamentos de Uso Humano. Las notificaciones se acompañarán de la carta de acompañamiento indicada en el anexo A4 o A5 según corresponda.
- b) Cuando se trate de sospechas de reacciones adversas que ocurran con medicamentos autorizados en España que se utilicen en las indicaciones autorizadas, la unidad de destino será la División de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia de la Subdirección General de Medicamentos de Uso Humano. Las notificaciones se acompañarán de la carta de acompañamiento A4.



---

**ANEXO 4**

---

**Declaración de Helsinki de la asociación médica mundial: Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos**

Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975. 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983. 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989. 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996. 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000. Nota de Clarificación, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002. Nota de Clarificación, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004. 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008. 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013

***Introducción***

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables. La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo debe ser aplicado con consideración de todos los otros párrafos pertinentes.

2. Conforme al mandato de la AMM, la Declaración está destinada principalmente a los médicos. La AMM insta a otros involucrados en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.

***Principios generales***

3. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".

4. El deber del médico es promover y velar por la salud, bienestar y derechos de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos.

6. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos).

Incluso, las mejores intervenciones probadas deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

7. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales.

8. Aunque el objetivo principal de la investigación médica es generar nuevos conocimientos, este objetivo nunca debe tener primacía sobre los derechos y los intereses de la persona que participa en la investigación.

9. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

11. La investigación médica debe realizarse de manera que reduzca al mínimo el posible daño al medio ambiente.

12. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la educación, formación y calificaciones científicas y éticas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificada apropiadamente.

13. Los grupos que están subrepresentados en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.

14. El médico que combina la investigación médica con la atención médica debe involucrar a sus pacientes en la investigación sólo en la medida en que esto acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.

15. Se debe asegurar compensación y tratamiento apropiados para las personas que son dañadas durante su participación en la investigación.

### ***Riesgos, Costos y Beneficios***

16. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos. La investigación médica en seres

humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo y los costos para la persona que participa en la investigación.

17. Toda investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y los grupos que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o grupos afectados por la enfermedad que se investiga. Se deben implementar medidas para reducir al mínimo los riesgos. Los riesgos deben ser monitoreados, evaluados y documentados continuamente por el investigador.

18. Los médicos no deben involucrarse en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Cuando los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados definitivos, los médicos deben evaluar si continúan, modifican o suspenden inmediatamente el estudio.

### ***Grupos y personas vulnerables***

19. Algunos grupos y personas sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y pueden tener más posibilidades de sufrir abusos o daño adicional. Todos los grupos y personas vulnerables deben recibir protección específica.

20. La investigación médica en un grupo vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades o prioridades de salud de este grupo y la investigación no puede realizarse en un grupo no vulnerable. Además, este grupo podrá beneficiarse de los conocimientos, prácticas o intervenciones derivadas de la investigación.

### ***Requisitos científicos y protocolos de investigación***

21. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

22. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos deben describirse claramente y ser justificados en un protocolo de investigación. El protocolo debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y la información sobre las estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. En los ensayos clínicos, el protocolo también debe describir los arreglos apropiados para las estipulaciones después del ensayo.

### *Comités de ética de investigación*

23. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación al comité de ética de investigación pertinente antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser transparente en su funcionamiento, debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida y debe estar debidamente calificado. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ninguna enmienda en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité. Después que termine el estudio, los investigadores deben presentar un informe final al comité con un resumen de los resultados y conclusiones del estudio.

### *Privacidad y confidencialidad*

24. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal.

### *Consentimiento informado*

25. La participación de personas capaces de dar su consentimiento informado en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona capaz de dar su consentimiento informado debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.

26. En la investigación médica en seres humanos capaces de dar su consentimiento informado, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento, estipulaciones post estudio y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente. Todas las personas que participan en la investigación médica deben tener la opción de ser informadas sobre los resultados generales del estudio.

27. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el

consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.

28. Cuando el individuo potencial sea incapaz de dar su consentimiento informado, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud del grupo representado por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas capaces de dar su consentimiento informado y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.

29. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incapaz de dar su consentimiento informado es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.

30. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria del grupo investigado. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

31. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe afectar de manera adversa la relación médico-paciente.

32. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, como la investigación sobre material o datos contenidos en biobancos o depósitos similares, el médico debe pedir el consentimiento informado para la recolección, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones excepcionales en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

### ***Uso del placebo***

33. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con las mejores intervenciones probadas, excepto en las siguientes circunstancias: Cuando no existe una intervención probada, el uso de un placebo, o ninguna intervención, es aceptable; o cuando por razones metodológicas científicamente sólidas y convincentes, sea necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención el uso de cualquier intervención menos eficaz que la mejor probada, el uso de un placebo o ninguna intervención. Los pacientes

que reciben cualquier intervención menos eficaz que la mejor probada, el placebo o ninguna intervención, no correrán riesgos adicionales de daño grave o irreversible como consecuencia de no recibir la mejor intervención probada. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

### ***Estipulaciones post ensayo***

34. Antes del ensayo clínico, los auspiciadores, investigadores y los gobiernos de los países anfitriones deben prever el acceso post ensayo a todos los participantes que todavía necesitan una intervención que ha sido identificada como beneficiosa en el ensayo. Esta información también se debe proporcionar a los participantes durante el proceso del consentimiento informado.

### ***Inscripción y publicación de la investigación y difusión de resultados***

35. Todo estudio de investigación con seres humanos debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.

36. Los investigadores, autores, auspiciadores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación y difusión de los resultados de su investigación. Los investigadores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Todas las partes deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

### ***Intervenciones no probadas en la práctica clínica***

37. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas no existen u otras intervenciones conocidas han resultado ineficaces, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Tales intervenciones deben ser investigadas posteriormente a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.

## ANEXO 5: Seguro de responsabilidad civil

Avda. General Perón, 40 - 28020 Madrid España  
T 902365242 - F 91 4097647



Nº PÓLIZA: ( )

Distinguido Cliente:

Adjunto le acompañamos la documentación contractual de la Póliza de Seguros que tuvo la deferencia de contratar con **Mapfre Empresas**, agradeciéndole la confianza que deposita en nuestra Entidad.

Le rogamos verifique los datos que figuran en las Condiciones Particulares.

Si precisa alguna información complementaria o contratar nuevas coberturas, no dude en dirigirse a su Mediador de Seguros habitual, a la Oficina Mapfre más próxima o, si lo prefiere, a nuestro servicio 24 horas de Atención al Cliente 902365242, donde gustosamente le atenderemos.

Atentamente,

Dirección Regional

**IMPORTANTE:** Es imprescindible que nos remita debidamente firmada, en todas sus hojas, la copia del contrato que indica "Devolver firmado". Para su comodidad le proporcionamos un sobre con franqueo gratuito.

Avda. Benavente Perón, 40 - 28020 Madrid España  
T 902 365 242 - F 91 709 74 47

 **MAPFRE EMPRESAS**



0221809707700772950003

**CONDICIONES PARTICULARES  
DEL SEGURO DE  
RESPONSABILIDAD CIVIL  
PROFESIONAL**

Póliza nº: , cuya vigencia se acuerda desde el 20/07/2007 hasta el 19/07/2008 con duración: temporal-anual.

Mediante la firma del presente contrato el TOMADOR DEL SEGURO:

\* Reconoce expresamente que, con anterioridad a la celebración de este contrato, la aseguradora le ha facilitado la información referente a la legislación aplicable al mismo y las diferentes instancias de reclamación.

\* Acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del Asegurado, que se resaltan en letra negrita en las Condiciones Especiales anexas, las cuales reconoce recibir en este acto, así como las Condiciones Generales del contrato (ME-097/01-06.) del Seguro de Responsabilidad civil profesional.

\* Autoriza la utilización de sus datos incluidos en el presente documento, al efecto de remitirle información sobre productos y servicios ofrecidos por las distintas entidades del SISTEMA MAPFRE, a través de su Servicio de Atención al Cliente (C/ Bárbara de Braganza, 14 28004 Madrid). EL TOMADOR DEL SEGURO se reserva el derecho de conocer, rectificar e incluso cancelar los datos que obren en poder de dicho Servicio en cualquier momento.

En cumplimiento de lo ordenado por el art.60.1 de la Ley 30/1995 de 8 de Noviembre, de Ordenación y Supervisión de los Seguros Privados, se hace constar que el Asegurador tiene su domicilio en España, siendo el órgano de control de la actividad la Dirección General de Seguros y Fondos de Pensiones del Ministerio de Economía.

Edo.: El Tomador del Seguro.

En Malaga, a 20 de julio de 2007.

Edo.: MAPFRE EMPRESAS, Cia. Seguros S.A.

  
DIRECTOR GENERAL

CLAVES DE LA ENTIDAD: / 0000000// / /

1

El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

1 000000000 // 000000000

Avda. General Perón, 40 - 28020 Madrid España  
T 902365242 - F 912097447



DOMICILIO SOCIAL: Avda. General Perón, 40  
28020 MADRID  
Tlfno.: 902365242 Fax:915815318

CONDICIONES PARTICULARES  
SEGURO DE  
RESPONSABILIDAD CIVIL PROFESIONAL

TOMADOR DEL SEGURO

Tomador: NIF : 999999  
Domicilio:

Carácter con el que actúa: Tomador y Asegurado

DATOS DE LA PÓLIZA N° 000

Vigencia : Efecto: 0 horas del 20-07-2007 Vencimiento: 24 horas del 19-07-2008  
Duración: temporal-anual

Importe total del seguro (incluidos impuestos legales sin aplicar recargo por fraccionamiento de pago): 27.638 euros.

Esta póliza carece de validez si no va acompañada del recibo de pago de la prima, en Euros, nº 00000001 que se emite por separado.

Plan de pagos de la póliza N.: 0970770077295 N. SPTO.: 000

Datos de los recibos

Facturar a: 1 NIF: 999999

Fecha cobro	Prima neta	Impuestos Legales	Consortio	Prima Total
20/07/07	26.000	1.638	0	27.638

Fdo.: El Tomador del Seguro.

En Malaga, a 20 de julio de 2007.  
Fdo.: MAPFRE EMPRESAS, Cia. Seguros S.A.

  
DIRECTOR GENERAL

El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

Avda. General Perón, 40 - 28020 Madrid España  
 F 912 348 242 - F 912 712 74 67

 MAPFRE EMPRESAS

POLIZA N°:	N. SPTO.: 000	EFEECTO: 20/07/2007
TOMADOR DEL SEGURO:		

I. DATOS DEL RIESGO

Riesgo: Único

DESCRIPCIÓN DEL RIESGO

ANÁLISIS ALEATORIZADO Y DOBLE CIEGO SOBRE LA UTILIDAD DEL EXTRACTO DE ARANDANO ROJO VS PROFILAXIS ANTIBIOTICA CON AMOXICILINA EN LA INFECCION URINARIA RECURRENTE INFANTIL.

II. SUMAS ASEGURADAS Y COBERTURAS (cifras expresadas en euros).

- MÁXIMO DE INDEMNIZACIÓN POR SINIESTRO: 2.500.000

MÁXIMO DE INDEMNIZACIÓN POR SINIESTRO: Cantidad máxima que, en cualquier caso, se verá obligado a indemnizar el Asegurador por cada siniestro amparado por la póliza, sea cual fuese el número de coberturas afectadas y el número de víctimas o perjudicados.

- LÍMITE POR ANUALIDAD O PERIODO DE SEGURO: 2.500.000

LÍMITE POR ANUALIDAD: La cantidad máxima a cargo del Asegurador por cada periodo de seguro, con independencia de que sea consumida en uno o varios siniestros, entendiéndose por periodo de seguro el comprendido entre la fecha de efecto y de vencimiento, expresadas en las Condiciones Particulares o en el periodo anual establecido en el último recibo de primas.

Lo anterior con independencia de los límites y sublímites que específicamente se puedan establecer para las coberturas que a continuación se indican.

En los casos en que cualquier cobertura aparezca con la leyenda NO CONTRATADA, el Tomador / Asegurado asume plenamente la total carencia de cobertura y garantía por la presente póliza.

Límite de indemnización de 250.000 Euros por sujeto sometido a ensayo clínico; en caso de que la indemnización se fije como renta anual constante o creciente, el límite de la cobertura del seguro será de al menos 25.000 euros anuales por cada sujeto sometido al ensayo clínico.

COBERTURAS SUMA ASEGURADA/SUBLÍMITES

COBERTURA BÁSICA	CONTRATADA
R.C. ACCIDENTES DE TRABAJO	NO CONTRATADA
R.C. PRODUCTOS	NO CONTRATADA

III. FRANQUICIAS

- Sin franquicia específica

IV. CÁLCULO DE PRIMAS Y BASES DE APLICACIÓN

BASE DE CÁLCULO	VOLUMEN	TASA	PRIMA NETA
UNIDADES RIESGO	1	26000 U	26.000

PRIMA NETA MÍNIMA Y DE DEPÓSITO: 26.000 Euros

El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

Avda. General Perón, 40 - 28020 Madrid España  
T 91 265 742 - F 91 269 7447



POLIZA N°: 0	N. SPTO.: 000	EFEECTO: 20/07/2007
TOMADOR DEL SEGURO:		

**V. CLÁUSULAS APLICABLES.**

Son de aplicación las Condiciones Especiales adjuntas en las cuales queda definida la extensión de las coberturas de la presente póliza.

**V. OBSERVACIONES.**

**OBJETO DEL SEGURO:** LA PRESENTE POLIZA GARANTIZA AL ASEGURADO, DENTRO DE LOS LIMITES ECONOMICOS SUSCRITOS, EL PAGO DE LAS INDEMNIZACIONES PECUNIARIAS DE QUE PUDIERA RESULTAR CIVILMENTE RESPONSABLE POR LOS DAÑOS CAUSADOS A PACIENTES SOMETIDOS A ENSAYO EN EL EJERCICIO DE LAS ACTIVIDADES DERIVADAS DEL ENSAYO DESCRITO ANTERIORMENTE.

**TENDRAN LA CONSIDERACION DE ASEGURADOS A EFECTOS DE LA PRESENTE POLIZA:**

- EL PROMOTOR DEL ENSAYO
- LOS INVESTIGADORES INTERVINIENTES EN EL ENSAYO.

Fdo.: El Tomador del Seguro.

En Malaga, a 20 de julio de 2007.  
Fdo.: MAPFRE EMPRESAS, Cia. Seguros S.A.

M.

DIRECTOR GENERAL

COPIA NO VALIDA

El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

Avenida General Perón, 48 - 28020 Madrid España  
T 902 305 762 - F 91 789 76 44



SEGURO DE RESPONSABILIDAD CIVIL PROFESIONAL		CLAUSULA RC582
PÓLIZA Nº:	N. SPTO.: 000	EFECTO: 20/07/2007
TOMADOR DEL SEGURO: 1		

#### CONDICIONES ESPECIALES

##### ENSAYO CLÍNICO

###### PREAMBULO

El presente contrato se rige por lo dispuesto en la Ley 50/1980, de 8 de Octubre, de Contrato de Seguro, y por lo convenido en estas Condiciones Especiales y en las Particulares de la póliza, sin que tengan validez las cláusulas limitativas de los derechos del Asegurado que éste no haya aceptado específicamente por escrito.

Si el contenido de la póliza difiere de la proposición de seguro o de las cláusulas acordadas, el Tomador del seguro podrá reclamar a la entidad Aseguradora en el plazo de un mes a contar desde la entrega de la póliza para que se subsane la divergencia existente. Transcurrido dicho plazo sin efectuar la reclamación, se estará a lo dispuesto en la póliza.

###### 1. DEFINICIONES

1.1 **ASEGURADO:** Persona titular del interés expuesto al riesgo a quien corresponden en su caso los derechos derivados del contrato. El Asegurado podrá asumir las obligaciones y deberes del Tomador del seguro.

1.2 **TERCERO:** Cualquier persona física o jurídica distinta de:

1. El Tomador del Seguro, el Asegurado o el causante del siniestro.
2. Los familiares que convivan con las personas enunciadas en el apartado anterior.
3. Los socios y directivos del Tomador y del Asegurado.
4. Los asalariados del Tomador y Asegurado así como los trabajadores de los mismos que no teniendo la consideración de asalariados si sean considerados como tales por la normativa legal.

1.3. **DAÑOS:**

Sólo serán indemnizables por esta póliza los daños:

**CORPORALES:** Las lesiones, enfermedades o fallecimiento sufrido por personas físicas.

**MATERIALES:** El daño, deterioro o destrucción de una cosa, así como el daño ocasionado a animales.

**PERJUICIOS:** La pérdida económica consecuencia directa de los daños corporales o materiales sufridos por el reclamante de dicha pérdida.

1.4 **SINIESTRO:** Todo hecho de que pueda resultar legalmente responsable el Asegurado, siempre que sea objeto de este contrato de seguro y ponga en juego las garantías de la póliza de conformidad a los términos y condiciones pactados.

1.5 **UNIDAD DE SINIESTRO:** Se considerará como un sólo y único siniestro la sucesión de hechos o circunstancias que se deriven de un mismo origen o igual causa, con independencia del número de perjudicados y reclamaciones formuladas. Se considerará como fecha del siniestro la del momento de consumación del evento dañoso.

5

El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

EL TOMADOR:

- 1.6 **MAXIMO DE INDEMNIZACION POR SINIESTRO:** Cantidad máxima que, en cualquier caso, se verá obligado a indemnizar el Asegurador por cada siniestro amparado por la póliza, sea cual fuese el número de coberturas afectadas y el número de víctimas o perjudicados.
- 1.7 **SUBLIMITES:** Cantidades indicadas en las Condiciones Particulares que representan los límites máximos asumidos por el Asegurador para cada una de las garantías especificadas en dichas condiciones, a tal efecto se entenderá como sublímite por víctima la cantidad máxima indemnizable por la póliza por cada persona física afectada por lesiones, enfermedad e incluso la muerte, sin perjuicio del límite máximo por siniestro definido en Condiciones Particulares como suma asegurada.
- 1.8 **LIMITE POR ANUALIDAD:** La cantidad máxima a cargo del Asegurador por cada periodo de seguro, con independencia de que sea consumida en uno o varios siniestros, entendiéndose por periodo de seguro el comprendido entre la fecha de efecto y de vencimiento, expresadas en las Condiciones Particulares o en el periodo anual establecido en el último recibo de primas.
- 1.9 **FRANQUICIA:** La cantidad o procedimiento para su deducción establecido en las Condiciones Particulares de esta póliza, que no será de cuenta del Asegurador por ser asumida directamente por el Asegurado o por otro seguro distinto. Por tanto, el Asegurador sólo indemnizará los siniestros hasta el límite de la suma asegurada en exceso de las cantidades resultantes como franquicias.
- 1.10 **RECLAMACION:** El requerimiento judicial o extrajudicial formulado con arreglo a derecho contra el Asegurado como presunto responsable de un hecho dañoso amparado por la póliza, o contra el Asegurador, en el ejercicio de la acción directa, por tal motivo. Así como la comunicación del Asegurado al Asegurador de cualquier hecho o circunstancia de la que pudieran derivarse responsabilidades.
2. **OBJETO DEL SEGURO**
- El Seguro cubre la Responsabilidad Civil Legal del Tomador del seguro y/o Asegurados que se derive de la realización del ensayo clínico, descrito en las Condiciones Particulares, por los daños causados en la salud (lesión o muerte) de la persona sujeta a la experimentación, así como por los perjuicios económicos que se deriven directamente de aquellos, siempre y cuando los daños sean consecuencia del tratamiento con los medicamentos o sustancias empleadas en la experimentación autorizada o de las medidas terapéuticas o diagnósticas adoptadas para la realización del ensayo.
3. **ALCANCE DEL SEGURO**
- 3.1 Esta cobertura se extiende exclusivamente a la Responsabilidad Civil legal derivada del ensayo clínico, identificado en las Condiciones Particulares, que se derive de las reclamaciones que pudieran formularse al asegurado en base al artículo 62 de la Ley 25/1990 de 20 de Diciembre, del Medicamento que prescribe la contratación obligatoria de la correspondiente cobertura de seguro y el RD 561/93, de Abril, sobre requisitos para la realización de ensayos clínicos que la desarrolla.
- 3.2 Quedan comprendidos, dentro del límite máximo de la cobertura, los gastos de defensa jurídica (abogado, peritos, etc.) y la prestación de fianzas que por la responsabilidad civil cubierta por la póliza, fuera exigida al asegurado.
4. **UNIDAD DE SINIESTRO**
- 4.1 A los efectos de la presente póliza se conceptúa como siniestro la reclamación o reclamaciones formuladas al asegurado o al Asegurador en ejercicio de la acción directa conforme a los términos recogidos en el punto 5.-Delimitación Temporal de la cobertura.
- 4.2 Se entenderá por reclamación:

6

El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

EL TOMADOR:

www.mapfre.es | 11 de junio

Avenida General Perón, 40 - 28020 Madrid España  
T 902 363 242 - F 91 709 76 67



- a) Un procedimiento judicial o administrativo.
- b) Un requerimiento formal y por escrito dirigido al Asegurado o Asegurador en ejercicio de las acciones legales que correspondan.
- c) La comunicación al Asegurador de cualquier hecho o circunstancia concreta conocida por primera vez por el Asegurado y notificada fehacientemente que pueda razonablemente determinar la ulterior formulación de una petición de resarcimiento o hacer entrar en juego las garantías de la póliza.
- d) La constatación de cualquier clase de "acontecimiento adverso", tal y como se define este término en las disposiciones vigentes en la materia.

4.3 Se considerará como un solo y único siniestro:

- a) El conjunto de reclamaciones que directa o indirectamente se produjeran en el curso de un mismo ensayo clínico, con independencia del número de afectados.
- b) Todas las reclamaciones que tengan su origen en una misma causa común, producto, sustancia, ingrediente o medicamento concreto sujeto a un mismo protocolo, ya se trate de un primer ensayo o de un ensayo clínico posterior.

4.4 Se considerará como fecha del siniestro, la del momento de la primera reclamación, cualquiera que sea previa en el tiempo, en los términos contemplados en el punto 4.2.

4.5 Todas las reclamaciones derivadas de un mismo siniestro se reconducirán a la fecha expresada en el punto anterior, a los efectos de la consideración del momento del siniestro.

5. DELIMITACIÓN TEMPORAL DE LA COBERTURA

La cobertura del seguro sólo ampara las reclamaciones que sean formuladas por daños derivados del ensayo clínico cubierto, siempre que las mismas se formulasen durante el período de realización de aquel, o como máximo el Asegurador tenga constancia de ellas, de manera fehaciente y por escrito, dentro de los dos años siguientes a la finalización del ensayo clínico.

6. DELIMITACIÓN GEOGRÁFICA DE LA COBERTURA

La cobertura del seguro sólo ampara la Responsabilidad Civil Legal que se derive de los ensayos clínicos realizados en España.

7. OBLIGACIONES DEL TOMADOR DEL SEGURO Y ASEGURADOS

- 7.1 El Tomador del seguro o Asegurados, comunicarán al Asegurador cualquier modificación del protocolo de ensayo.
- 7.2 El Tomador del seguro o las personas que tienen consideración de asegurados notificarán inmediatamente la suspensión del ensayo clínico en caso de que ésta sea acordada por la autoridad competente, así como su reanudación. La forma de cumplimiento de esta obligación consistirá en el envío inmediato al Asegurado de copia de la resolución administrativa de suspensión o la de su levantamiento según proceda.
- 7.3 El investigador principal del ensayo o en su defecto el Promotor del mismo en calidad de Asegurado y Tomador del seguro, respectivamente, notificará inmediatamente al Asegurador cualquier reacción adversa grave o inesperada que se observe en el sentido del artículo 65.8 de la Ley 25/1990, de 20 de Diciembre, del medicamento y las disposiciones complementarias de la misma.
- 7.4 El incumplimiento de las obligaciones anteriormente descritas tendrá las consecuencias legales que se establecen en los artículos: 11, 12 y 17 de la Ley 50/1980 de 8 de Octubre, de Contrato de Seguro, según proceda.

7

El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

EL TOMADOR:

Avda: General Perón, 40 - 28020 Madrid España  
T 902 385 143 - F 91 909 76 47



## 8.- EXCLUSIONES

En ningún caso quedan cubiertos por el Asegurador:

### 8.1 Los daños y perjuicios ocasionados por aquellos ensayos clínicos:

- a) No autorizados previa y expresamente por el Ministerio de Sanidad y Consumo o que incumplan manifiestamente las condiciones de su autorización.
- b) Para los que no se dispone de la experimentación preclínica suficiente que garantice que los riesgos que implica en la persona son admisibles.
- c) Realizados sin el consentimiento previo y libremente expresado del sujeto de la experimentación, cuando no se hayan cumplido las prescripciones legales en esta materia en especial el Artículo 12.5 y 12.6 del Real Decreto 561/93, de 16 de Abril, sobre requisitos para la realización de ensayos clínicos.
- d) Que infrinjan en su realización los postulados éticos que afectan a la investigación sobre seres humanos, contenidas en la declaración de Helsinki o aquellas otras sucesivas que actualicen dichos postulados.

### 8.2 Los gastos en que incurra el Comité Ético.

### 8.3 Daños que no estén en relación causal con el ensayo, aunque estos daños ocurran temporalmente durante la realización del mismo (p.e.; intoxicaciones alimentarias en el hospital, lesiones, etc.).

### 8.4 Reclamaciones procedentes del sujeto del ensayo basados en que el producto no alcance los fines curativos previstos.

### 8.5 Reclamaciones derivadas de daños causados directa o indirectamente por el denominado VHI así como las variaciones, modificaciones o mutaciones del mismo, en relación con la adquisición o transmisión del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o cualquier enfermedad similar, aunque se denomine de diferente forma, o bien por error de diagnóstico de las citadas dolencias.

### 8.6 Daños nucleares de cualquier clase.

### 8.7 Daños genéticos y enfermedades genéticas o hereditarias, tales como las cromosopatías, metabolopatías, anomalías del óvulo, embrión o feto, así como la malformación o deformaciones congénitas del niño.

### 8.8 Responsabilidades resultantes de la aplicación de técnicas de reproducción asistida, Inseminación Artificial (IA), Fecundación in Vitro (FIV), Transferencia de Embriones (TE) y la Transferencia Intratubárica (TIG) y de la denominada ingeniería genética.

### 8.9 Reclamaciones derivadas de daños causados por la utilización en el ensayo clínico de cualquiera de los productos farmacéuticos siguientes:

- DIETHYLSTILBESTROL
- STILBESTROL/D.E.S.
- PRIMODOL
- AMENORONE FORTE
- SWINE FLU VACCINE
- METRONIDAZOLE
- CLINDAMYCIN
- LINCOMYCIN
- DEBENDOX
- ORAL CONSUMPTION OF HALOGENATED 8/HIDROXY/QUINOLINES
- DICYCOMINE
- DORBANEX/CANTHAXANTHIN
- PERTUSSIS VACCINE
- SKIN LIGHTENING AND/OR WHITENING PRODUCTS

### 8.10 Daños a la salud del sujeto sometido a ensayo cuando éstos sean inherentes a la

El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

EL TOMADOR:

Avenida General Parás, 40 - 28020 Madrid España  
T 902 365 362 - F 91 709 76 67



patología objeto de estudio.

8.11 Daños o perjuicios derivados de los efectos secundarios propios de la medicación prescrita para la patología objeto de estudio, o cuando sean consecuencia de que el sujeto sometido a ensayo desoiga intencionadamente las prescripciones realizadas por las personas encargadas de llevar a cabo el mismo.

8.12 La evolución propia de su enfermedad como consecuencia de la ineficacia del tratamiento.

9.- OTROS SEGUROS

De acuerdo con lo establecido en el artículo 32 de la Ley 50/1980 de 8 de Octubre de Contrato de Seguro podrá el Tomador del seguro y/o Asegurados contratar otros seguros adicionales al presente contrato con el fin de aumentar el límite de la suma asegurada.

Mediante la firma de este documento, en el lugar y fecha indicados más abajo, el Tomador del Seguro y el Asegurado aceptan expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del Asegurado que se resaltan en letra negrita en el texto de estas Condiciones Especiales.

En Malaga, a 20 de julio de 2007.

EL TOMADOR DEL SEGURO

Fdo.: MAPFRE EMPRESAS, Cia. Seguros S.A.

  
DIRECTOR GENERAL

9  
El tomador del seguro conoce y acepta expresamente las cláusulas limitativas de los derechos del asegurado destacadas de forma especial en letra negrita.

EL TOMADOR:

## **13. ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

---

AA: Acontecimiento Adverso  
 AAG: Acontecimiento adverso grave  
 AEMYPS, AEMPS: Agencia española de medicamento y productos sanitarios  
 AEP Asociación Española de Pediatría  
 AMM: Asociación médica mundial  
 ATB: antibiótico  
 BA: bacteriuria asintomática  
 BAR: proporción de brix con respecto a la acidez valorable  
 Brix °Bx : (contenido de azúcar) del jugo de concentración de arándano  
 C : Complemento  
 CE: Comunidad Europea  
 CECT: Colección Española de Cultivos Tipo  
 CEIC: comité ético de investigación clínica  
 Central: Cochrane Central Register of Controlled Trials  
 CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol  
 CFA: Factor de colonización antigénica  
 CGA: Chlorogenic Acid  
 CI: Consentimiento Informado  
 Cirh: Instituto de Investigación Sanitaria de Canadá  
 CID: ítem comercial de descripción  
 COX: ciclooxigenasa  
 CRD: cuaderno de recogida de datos  
 CUMS: cistourografía miccional seriada  
 CYP: citocromo  
 CZA: coctel de zumo de arándano  
 DAD: detección por red de diodos  
 DI50: Dosis infectiva 50  
 DITC50: Dosis capaz de producir alteraciones citopáticas al 50% de cultivos celulares  
 DL: Dosis letal  
 DL50: Dosis letal 50  
 DM: Diabetes Mellitus  
 DMAC: 4-dimetilamino-cinmaldehído reacción colorimétrica  
 DMSA: dimercaptosuccinico acid, ácido dimercaptosuccinico  
*E. coli: Escherichia coli*  
 ECA: Ensayos Clínicos aleatorizados  
 EDTA: European Dialysis and Transplant Association.  
 EE: error estándar  
 ESI: electrospray

ESI-TOF-MS: espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo con interfaz de ionización en electrospray.

ExPEC: *E. coli* extra-intestinal patógena

FRR: Función renal diferencial o relativa

FRRN: Función renal diferencial normalizada

GC: Grupo control

GI: Grupo de intervención

GPC: Guía de práctica clínica

Gr: gramos

H. pylori: *Helicobacter pylori*

HDL: High density lipoprotein, lipoproteínas de alta densidad

HPLC-TOF-MS: cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas de tiempo de vuelo .High Performance Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry

HPLC- MS/MS: High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

HTA: hipertensión arterial

IC o CI: Intervalo de confianza

ICMJE: comité internacional de directores de revistas medicas

ICTRP: plataforma internacional de registros de ensayos clínicos

IFPMA: Federacion Internacional de la Industria del Medicamento

Ig: inmunoglobulinas

IMC: índice de masa corporal

INR: international normalised ratio

IRC: insuficiencia renal crónica

L.monocitogenes: *Listeria monocytogenes*

ITU: infección del tracto urinario (UTI: urinary tract infection)

LC-MS: Liquid Chromatography Mass Spectrometry

LDL: low density lipoprotein, lpoproteína de baja densidad

LOD: Límite de detección

LOQ: Limite de cuantificación

M: mediana

M: mol

MA: metaanálisis

MALDI-TOF: espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo e ionización por desorción mediante laser asistida por matriz

ME: membrana externa

Mg: miligramos

MI: mililitros

MR: manosa resistente

MRC: consejo de investigación médica

MS: manosa sensible

MSI: espectrometría de masas

MS-MS: espectrómetros de masas en tándem

*N. gonorrhoeae*: *Neisseria gonorrhoeae*

*N. meningitidis*: *Neisseria meningitidis*

NHS: National Health System, sistema nacional de salud

NICE: National Institute for Health and Care Excellence, Instituto Nacional para la excelencia en la salud y el cuidado.

NNT: Numero Necesario a Tratar

NO: oxido nítrico

NR: lesión renal segmentaria no displásica con fibrosis y atrofia  
OD: Densidad Óptica  
OMS: organización Mundial de la Salud (WHO: World Health Organisation)  
OPC: Proantocianidinas oligoméricas  
OR: Razón de ventaja  
PAC: Proantocianidinas  
PCR: Proteína C Reactiva  
PNA: Pielonefritis aguda  
Ppm: partes por millón  
RAGI: reacciones adversas graves inesperadas  
RAR: reducción absoluta de riesgo  
RR: Riesgo Relativo. Relative risk  
RSD: Desviación estándar relativa.  
RVU: Reflujo vesicoureteral (VUR: vesicoureteral reflux)  
S/SE: desviación estándar / Standard Error  
S<sup>2</sup>: varianza  
SNS: Sistema Nacional; de Salud  
TMP-SMX: trimetoprim-sulfametoxazol  
UFC: Unidades Formadoras de Colonias  
UPEC: *E. coli* uropatogenico.  
UV: Ultravioleta  
USDA: US Department of Agriculture, Departamento de agricultura de los Estados Unidos de América  
VFG: velocidad de filtrado glomerular  
VSG: velocidad de sedimentación globular  
VL/min: vuelo/minuto  
WBSSH: Definición de verdadero polifenol dada por White, Bate-Smith, Swain y Haslam.  
X: Media Aritmética



## **14. REFERENCIAS**



---

## REFERENCIAS

---

- (1) Griebing TL. Urologic diseases in america project: trends in resource use for urinary tract infections in women. *The Journal of Urology* 2005 April;173(4):1281-1287.
- (2) Carlos Rodrigo Gonzalo-de-Liria, María Méndez Hernández, Marta Azuara Robles. Infección Urinaria. Protocolos de la AEP, 2008.
- (3) Hernandez Marco r, Daza A, Marín Serra J. Infeccion urinaria en el niño (1 mes-14 años). Protocolos de la AEP, 2008.
- (4) Lopez Sastre JB. Urinary Tract Infection in the newborn:clinical and radio imaging studies. *Paediatric Nephrology* 2007;22:1735-1741.
- (5) Orejón de Luna G, Ochoa Sangrador C. Los lactantes con fiebre y los niños con síntomas urinarios tienen una prevalencia de infección urinaria cercana al 7 %. Available at: URL: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=2769183>.
- (6) Fenández Puentes V, Hidalgo Calero A, Uberos Fernández J. Extracto de Arándano Americano en la Prevención de las infecciones urinarias pediátricas. 3 (2) ed. 2009:52-57.
- (7) Pecile P, Miorin E, Romanello C, Vidal E, et al. Age-Related Renal Parenchymal Lesions in Children With First Febrile Urinary Tract Infections. Jul 1;124(1) ed. 2009:9-23.
- (8) Espino Hernandez M, Loris Pablo C. Reflujo vesicoureteral primario. Asociación Española de Pediatría; 2008.
- (9) Sargent MA. What is the normal prevalence of vesicoureteral reflux? 30(9) ed. 2000:93-587.
- (10) Jepson RG, Williams G, Craig JC. Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD001321.
- (11) Agustín Pumarola. Microbiología y Parasitología Médica, Relación huésped-bacteria, capítulo 14 : Poder patógeno y virulencia.Factores determinantes de la acción patógena , colonización. In: MASSON SA, ed. 1999 ed. 1999:161-170.

- (12) Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, Hultgren SJ. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends in Microbiology* 2004 September;12(9):424-430.
- (13) Dolan LC, Potter SM, Burdock GA. Evidence-Based Review on the Effect of Normal Dietary Consumption of Fructose on Blood Lipids and Body Weight of Overweight and Obese Individuals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2010 November 22;50(10):889-918.
- (14) Liu Y, Yan X, DebRoy C et al. *Escherichia coli* O-Antigen Gene Clusters of Serogroups O62, O68, O131, O140, O142, and O163: DNA Sequences and Similarity between O62 and O68, and PCR-Based Serogrouping. 2015;5(1).
- (15) Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016 April 1;5:11.
- (16) Sahm DF, Thornsberry C, Mayfield DC, Jones ME, Karlowsky JA. Multidrug-Resistant Urinary Tract Isolates of *Escherichia coli*: Prevalence and Patient Demographics in the United States in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 May 14;45(5):1402-1406.
- (17) Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, Hayashi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cell. *FEMS Immunology &amp; Medical Microbiology* 2002 March 1;33(1):23.
- (18) Liu Y, Black MA, Caron L, Camesano TA. Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2006 February 5;93(2):297-305.
- (19) Rafsanjany N, Senker J, Brandt S, Dobrindt U, Hensel A. In Vivo Consumption of Cranberry Exerts ex Vivo Antiadhesive Activity against FimH-Dominated Uropathogenic *Escherichia coli*: A Combined in Vivo, ex Vivo, and in Vitro Study of an Extract from *Vaccinium macrocarpon*. *J Agric Food Chem* 2015 October 14;63(40):8804-8818.
- (20) Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991 January;4(1):80-128.
- (21) Vagarali M A KSGPCSMSCMMB. Haemagglutination and siderophore production as the urovirulence markers of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2008;26(1):68-70.
- (22) Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García Rodríguez JA, Piédrola-Angulo G. *Microbiología y Parasitología médica*. 2ª ed. Madrid: Salvat; 1995.
- (23) Uberos J, Rodríguez-Belmonte R, Fernández-Puentes V, Narbona-López E, Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A. Cranberry syrup vs. Trimethoprim in the prophylaxis of recurrent urinary infection: a double-blind randomized clinical trial. 99 ed. 2011:48.

- (24) Di Martino P, Agniel R, Gaillard JL, Denys P. Effects of Cranberry Juice on Uropathogenic *Escherichia coli* In Vitro Biofilm Formation. *Journal of Chemotherapy* 2005 October 1;17(5):563-565.
- (25) Laplante KL, Sarkisian SA, Woodmansee S, Rowley DC, Seeram NP. Effects of cranberry extracts on growth and biofilm production of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* species. *Phytother Res* 2012 September;26(9):1371-1374.
- (26) Sun J, Marais JPJ, Khoo C et al. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides decrease biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Functional Foods* 2015 August;17:235-242.
- (27) Jagani S, Chelikani R, Kim DS. Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 2009 March 3;25(4):321-324.
- (28) Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling* 2013 May 1;29(5):491-499.
- (29) Quideau Sp, Deffieux D, Douat-Casassus C+, Pouysegou L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew Chem Int Ed* 2011 January 17;50(3):586-621.
- (30) Swain T, Bate-Smith EC. Comparative Biochemistry. 3ed. New York: Academic Press; 1962:755-809.
- (31) Haslan E CY. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural Product Research* 1994 January;1:41-66.
- (32) Cunningham DG, Vannozzi SA, Turk R, Roderic R, O'Shea E, Brilliant K. Constituyentes fitoquímicos del arándano americano (*Vaccinium Macrocarpon*) y sus beneficios para la salud. 5(1) ed. 2005:5-16.
- (33) Howell AB, Reed JD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DG, Leahy M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry* 2005 September;66(18):2281-2291.
- (34) Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Nat Prod* 2000 September;63(9):1225-1228.
- (35) Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry* 2000 May;54(2):173-181.
- (36) Blumberg JB, Camesano TA, Cassidy A et al. Cranberries and Their Bioactive Constituents in Human Health. *Adv Nutr* 2013 November 6;4(6):618-632.
- (37) Kuzminski LN. Cranberry Juice and Urinary Tract Infections: Is There a Beneficial Relationship? *Nutr Rev* 1996 November 1;54(11):S87.

- (38) Howell AB. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Mol Nutr Food Res* 2007 June;51(6):732-737.
- (39) Neto CC. Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res* 2007 June 1;51(6):652-664.
- (40) Pappas E, Schaich KM. Phytochemicals of Cranberries and Cranberry Products: Characterization, Potential Health Effects, and Processing Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2009 October 19;49(9):741-781.
- (41) Leahy M RRBK. The cranberry – promising health benefits, old and new. *Journal of Nutritional Science* 2001;36:254-265.
- (42) Hong V WR. Cranberry juice composition. *Association of Official Analytical Chemists* 1986;69(199):207.
- (43) McKay DL, Blumberg JB. Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and cardiovascular disease risk factors. *Nutr Rev* 2007 November 1;65(11):490.
- (44) Grace MH, Massey AR, Mbeunkui F, Yousef GG, Lila MA. Comparison of Health-Relevant Flavonoids in Commonly Consumed Cranberry Products. *Journal of Food Science* 2012 August 1;77(8):H176-H183.
- (45) Fuleki T FF. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science* 1968;33:72-77.
- (46) White BL, Howard LR, Prior RL. Impact of Different Stages of Juice Processing on the Anthocyanin, Flavonol, and Procyanidin Contents of Cranberries. *J Agric Food Chem* 2011 May 11;59(9):4692-4698.
- (47) Vvedenskaya IO, Rosen RT, Guido JE, Russell DJ, Mills KA, Vorsa N. Characterization of Flavonols in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Powder. *J Agric Food Chem* 2004 January 1;52(2):188-195.
- (48) Wu X, Pittman HE, Prior RL. Fate of Anthocyanins and Antioxidant Capacity in Contents of the Gastrointestinal Tract of Weanling Pigs Following Black Raspberry Consumption. *J Agric Food Chem* 2006 January 1;54(2):583-589.
- (49) Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF. Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (*Vaccinium* Spp.) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 2001 March 1;49(3):1270-1276.
- (50) Lee J. Proanthocyanidin A2 purification and quantification of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) products. *Journal of Functional Foods* 2013 January;5(1):144-153.
- (51) Feliciano RP, Meudt JJ, Shanmuganayagam D, Krueger CG, Reed JD. Ratio of A-type to B-type Proanthocyanidin Interflavan Bonds Affects Extra-intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Invasion of Gut Epithelial Cells. *J Agric Food Chem* 2014 May 7;62(18):3919-3925.

- (52) Wang SY, Stretch AW. Antioxidant Capacity in Cranberry Is Influenced by Cultivar and Storage Temperature. *J Agric Food Chem* 2001 February 1;49(2):969-974.
- (53) Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR et al. Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts. *J Agric Food Chem* 2006 December 1;54(26):9966-9977.
- (54) Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF et al. Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *The Journal of Nutrition* 2004 March 1;134(3):613-617.
- (55) Pierre JF, Heneghan AF, Feliciano RP et al. Cranberry Proanthocyanidins Improve Intestinal sIgA During Elemental Enteral Nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2014 January 28;38(1):107-114.
- (56) Feliciano RP, Krueger CG, Shanmuganayagam D, Vestling MM, Reed JD. Deconvolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry isotope patterns to determine ratios of A-type to B-type interflavan bonds in cranberry proanthocyanidins. *Food Chemistry* 2012 December 1;135(3):1485-1493.
- (57) Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF et al. Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *J Agric Food Chem* 2003 December 1;51(25):7513-7521.
- (58) Feliciano RP, Shea MP, Shanmuganayagam D, Krueger CG, Howell AB, Reed JD. Comparison of Isolated Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) Proanthocyanidins to Catechin and Procyanidins A2 and B2 for Use as Standards in the 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde Assay. *J Agric Food Chem* 2012 May 9;60(18):4578-4585.
- (59) Tarascou I, Mazauric JP, Meudec E et al. Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LCGC-ESI-MS. *Food Chemistry* 2011 October 1;128(3):802-810.
- (60) Zheng W, Wang SY. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *J Agric Food Chem* 2003 January 1;51(2):502-509.
- (61) De Llano DG, Esteban-Fernández A, Sánchez-Patín F, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV, Bartolomé BA. Anti-Adhesive Activity of Cranberry Phenolic Compounds and Their Microbial-Derived Metabolites against Uropathogenic *Escherichia coli* in Bladder Epithelial Cell Cultures. *Int J Mol Sci* 2015 June 27;16(6):12119-12130.
- (62) Wang C, Zuo Y, Vinson JA, Deng Y. Absorption and excretion of cranberry-derived phenolics in humans. *Food Chemistry* 2012 June 1;132(3):1420-1428.
- (63) Zuo Y, Wang C, Zhan J. Separation, Characterization, and Quantitation of Benzoic and Phenolic Antioxidants in American Cranberry Fruit by GC-MS. *J Agric Food Chem* 2002 June 1;50(13):3789-3794.

- (64) Neto CC. Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of In Vitro Anticancer Studies. *The Journal of Nutrition* 2007 January 1;137(1):186S-193S.
- (65) Bhagdeo M. Determination of extractables from cranberry seeds using supercritical CO<sub>2</sub> Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, 2004.
- (66) Eno M. The effect of the supplementation of cranberry seed oil on the lipid profiles of human subjects. The Graduate School University of Wisconsin; 2007. En: <http://www2.uwstout.edu/content/lib/thesis/2007/2007enom.pdf>.
- (67) Roy Upton TB. Cranberry Fruit (*Vaccinium Macrocarpon*). Revision. Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics. 2016.
- (68) Howell AB, Botto H, Combescure C et al. Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study. *BMC Infect Dis* 2010;10:94.
- (69) Burleigh AE, Benck SM, McAchran SE, Reed JD, Krueger CG, Hopkins WJ. Consumption of sweetened, dried cranberries may reduce urinary tract infection incidence in susceptible women GÇô a modified observational study. *Nutr J* 2013 October 18;12:139.
- (70) Greenberg JA, Newmann SJ, Howell AB. Consumption of Sweetened Dried Cranberries Versus Unsweetened Raisins for Inhibition of Uropathogenic *Escherichia coli* Adhesion in Human Urine: A Pilot Study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2005 October 1;11(5):875-878.
- (71) McCall J, Hidalgo G, Asadishad B, Tufenkji N. Cranberry impairs selected behaviors essential for virulence in *Proteus mirabilis* HI4320. *Can J Microbiol* 2013 June 1;59(6):430-436.
- (72) de Llano DG, Esteban-Fernández A, S+ínchez-Pat+ín F, Mart+n-+ùlvarez PJ, Moreno-Arribas MV, Bartolom+® Ba. Anti-Adhesive Activity of Cranberry Phenolic Compounds and Their Microbial-Derived Metabolites against Uropathogenic *Escherichia coli* in Bladder Epithelial Cell Cultures. *Int J Mol Sci* 2015 June 27;16(6):12119-12130.
- (73) Sobota AE. Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections. *J Urol* 1984 May;131(5):1013-1016.
- (74) Di Martino P, Agniel R, David K et al. Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. *World J Urol* 2006 February;24(1):21-27.
- (75) Valentova K, Stejskal D, Bednar P et al. Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry juice in healthy women: a pilot double-blind placebo-controlled trial. *J Agric Food Chem* 2007 April 18;55(8):3217-3224.

- (76) Bodel PT, Cotran R, Kass EH. Cranberry juice and the antibacterial action of hippuric acid. *J Lab Clin Med* 1959 December;54:881-888.
- (77) Carlsson S, Wiklund NP, Engstrand L, Weitzberg E, Lundberg JON. Effects of pH, Nitrite, and Ascorbic Acid on Nonenzymatic Nitric Oxide Generation and Bacterial Growth in Urine. *Nitric Oxide* 2001;5(6):580-586.
- (78) Rhee KY, Charles M. Antimicrobial Mechanisms of Cranberry Juice. *Clinical Infectious Diseases* 2004 September 15;39(6):877.
- (79) Iswaldi I, Gomez-Caravaca AM, Arraez-Roman D et al. Characterization by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in a cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacterial activity. *J Pharm Biomed Anal* 2012 January 25;58:34-41.
- (80) Gonthier MP, Cheynier V+, Donovan JL et al. Microbial Aromatic Acid Metabolites Formed in the Gut Account for a Major Fraction of the Polyphenols Excreted in Urine of Rats Fed Red Wine Polyphenols. *The Journal of Nutrition* 2003 February 1;133(2):461-467.
- (81) Scalbert A, Morand C, Manach C, R+®m+®sy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002 August;56(6):276-282.
- (82) McKay DL, Chen C-YO, Zampariello CA, Blumberg JB. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chemistry* 2015 February 1;168:233-240.
- (83) Iswaldi I, Arraez-Roman D, Gomez-Caravaca AM et al. Identification of polyphenols and their metabolites in human urine after cranberry-syrup consumption. *Food Chem Toxicol* 2013 May;55:484-492.
- (84) Uesawa Y, Mohri K. Effects of cranberry juice on nifedipine pharmacokinetics in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2006 August 1;58(8):1067-1072.
- (85) Howell AB LMKEGN. In vivo evidence that cranberry proanthocyanidins inhibit adherence of P-fimbriated E. coli bacteria to uroepithelial cells. *FASEB Journal* 2001;15:A284.
- (86) McKay DL, Chen C-YO, Zampariello CA, Blumberg JB. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chemistry* 2015 February 1;168:233-240.
- (87) Kontiokari T, Sundqvist K, Nuutinen M, Pokka T, Koskela M, Uhari M. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ* 2001 June 30;322(7302):1571.

- (88) Shanmuganayugari D. A-type proanthocyanidins from cranberry inhibit the ability of extraintestinal pathogenic *E. coli* to invade gut epithelial cells and resist killing by macrophages. *FASEB Journal* 2013;27(637.16).
- (89) Krueger CG, Reed JD, Feliciano RP, Howell AB. Quantifying and characterizing proanthocyanidins in cranberries in relation to urinary tract health. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013;405(13):4385-4395.
- (90) Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J Agric Food Chem* 1997 February 1;45(2):304-309.
- (91) OHNISHI R, ITO H, KASAJIMA N et al. Urinary Excretion of Anthocyanins in Humans after Cranberry Juice Ingestion. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2006 July 23;70(7):1681-1687.
- (92) Duthie SJ, Jenkinson AM, Crozier A et al. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition* 2006;45(2):113-122.
- (93) Cao G, Muccitelli HU, S+ínchez-Moreno Cn, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr* 2001 May 1;73(5):920-926.
- (94) Wu X, Pittman HE, McKay S, Prior RL. Aglycones and Sugar Moieties Alter Anthocyanin Absorption and Metabolism after Berry Consumption in Weanling Pigs. *The Journal of Nutrition* 2005 October 1;135(10):2417-2424.
- (95) Rajbhandari R, Peng N, Moore R et al. Determination of Cranberry Phenolic Metabolites in Rats by Liquid Chromatography-GC-Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 2011 June 22;59(12):6682-6688.
- (96) Gao K, Xu A, Krul C et al. Of the Major Phenolic Acids Formed during Human Microbial Fermentation of Tea, Citrus, and Soy Flavonoid Supplements, Only 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid Has Antiproliferative Activity. *The Journal of Nutrition* 2006 January 1;136(1):52-57.
- (97) Suzuki A, Kagawa D, Fujii A, Ochiai R, Tokimitsu I, Saito I. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension* 2002 April 1;15(4):351-357.
- (98) Balasubashini MS, Rukkumani R, Viswanathan P, Menon VP. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytother Res* 2004 April 1;18(4):310-314.
- (99) Adisakwattana S, Moonsan P, Yibchok-anun S. Insulin-Releasing Properties of a Series of Cinnamic Acid Derivatives in Vitro and in Vivo. *J Agric Food Chem* 2008 September 10;56(17):7838-7844.
- (100) Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. Caffeic Acid as Active Principle from the Fruit of *Xanthium strumarium* to Lower Plasma Glucose in Diabetic Rats. *Planta Med* 2000;66(03):228-230.

- (101) Suzuki A YNJHYMFATSI. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 2006;24:1065-1073.
- (102) Hsu CL, Wu CH, Huang SL, Yen GC. Phenolic Compounds Rutin and o-Coumaric Acid Ameliorate Obesity Induced by High-Fat Diet in Rats. *J Agric Food Chem* 2009 January 28;57(2):425-431.
- (103) Liu M, Lin LQ, Song BB et al. Cranberry Phytochemical Extract Inhibits SGC-7901 Cell Growth and Human Tumor Xenografts in Balb/c nu/nu Mice. *J Agric Food Chem* 2009 January 28;57(2):762-768.
- (104) McKay DL CCB. Pharmacokinetics of flavonoids and phenolic acids from cranberry juice cocktail in humans. *FASEB Journal* 2010;24:209.1.
- (105) Liu H, Tayyari F, Khoo C, Gu L. A <sup>1</sup>H NMR-based approach to investigate metabolomic differences in the plasma and urine of young women after cranberry juice or apple juice consumption. *Journal of Functional Foods* 2015 April;14:76-86.
- (106) Pedersen CB KJJAGPMDD. Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:405-408.
- (107) Atanassova SS, Gutzow IS. Hippuric Acid as a Significant Regulator of Supersaturation in Calcium Oxalate Lithiasis: The Physiological Evidence. *Biomed Res Int* 2013 November 7;2013:374950.
- (108) Zafriri D, Ofek I, Adar R, Pocino M, Sharon N. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 January;33(1):92-98.
- (109) Howell AB, Vorsa N, Marderosian AD, Foo LY. Inhibition of the Adherence of P-Fimbriated *Escherichia coli* to Uroepithelial-Cell Surfaces by Proanthocyanidin Extracts from Cranberries. *New England Journal of Medicine* 1998 October 8;339(15):1085-1086.
- (110) Bouckaert J, Berglund J, Schembri M et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Molecular Microbiology* 2005 January 1;55(2):441-455.
- (111) Kawasaki T, Akanuma H, Yamanouchi T. Increased Fructose Concentrations in Blood and Urine in Patients With Diabetes. *Diabetes Care* 2002 February 1;25(2):353.
- (112) Gupta K, Chou MY, Howell A, Wobbe C, Grady R, Stapleton AE. Cranberry Products Inhibit Adherence of P-Fimbriated *Escherichia coli* to Primary Cultured Bladder and Vaginal Epithelial Cells. *The Journal of Urology* 2007 June;177(6):2357-2360.

- (113) Cote J, Caillet S, Doyon G, Dussault D, Sylvain JF, Lacroix M. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control* 2011 August;22(8):1413-1418.
- (114) Hidalgo G, Chan M, Tufenkji N. Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 fliC Expression and Motility by Cranberry Materials. *Appl Environ Microbiol* 2011 October 20;77(19):6852-6857.
- (115) Micali S, Isgro G, Bianchi G, Miceli N, Calapai G, Navarra M. Cranberry and Recurrent Cystitis: More than Marketing? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014 January 1;54(8):1063-1075.
- (116) Stothers K SL. A cost effectiveness analysis of naturopathic cranberry products used as prophylaxis against urinary tract infection in women. *Journal of Urology* 2001;165:10.
- (117) Papas PN BCC. Cranberry juice in the treatment of urinary tract infections. *Southwest Med* 1966;47:17-20.
- (118) Schappert SM REA. Ambulatory medical care utilization estimates for 2007. *Vital Health Stat* 2011;13:1-38.
- (119) Foxman B, Cronenwett MAE, Spino C, Berger MB, Morgan DM. Cranberry juice capsules and urinary tract infection post surgery: Results of a randomized trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2015 August 13;213(2):194.
- (120) WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014 May 11. En: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- (121) Avorn J, Monane M, Gurwitz JH, Glynn RJ, Choodnovskiy I, Lipsitz LA. Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *JAMA* 1994 March 9;271(10):751-754.
- (122) Haverkorn MJ, Mandigers J. Reduction of bacteriuria and pyuria using cranberry juice. *JAMA* 1994 August 24;272(8):590.
- (123) Dignam RR. The effect of cranberry juice on urinary tract infection rates in a long-term care facility. *Annals of Long-Term Care* 1998;6:163-167.
- (124) Bianco L, Perrelli E, Towle V, Van Ness PH, Juthani-Mehta M. Pilot Randomized Controlled Dosing Study of Cranberry Capsules for Reduction of Bacteriuria Plus Pyuria in Female Nursing Home Residents. *J Am Geriatr Soc* 2012 June;60(6):1180-1181.
- (125) Caljouw MAA, Van den Hout WB, Putter H, Achterberg WP, Cools HJM, Gussekloo J. Effectiveness of cranberry capsules to prevent urinary tract infections in vulnerable older persons. A double-blind randomized placebo-controlled trial in long-term care facilities. *European Geriatric Medicine* 2013 September;4, Supplement 1:S118-S119.

- (126) Barnoiu OS, Sequeira-García del Moral J, Sanchez-Martínez N, Díaz-Molina P, Flores-Sirvent L, Baena-González V. Valor preventivo adyuvante del arándano rojo americano (proantocianidinas 120 mg) en las infecciones del tracto urinario tras la colocación de catéter ureteral. *Actas Urológicas Españolas* 2015 March;39(2):112-117.
- (127) Stother L. A randomized trial to evaluate effectiveness and cost effectiveness of naturopathic cranberry products as prophylaxis against urinary tract infection in women. *The Canadian Journal of Urology* 2002;1558-1562.
- (128) Walker EB. Cranberry concentrate: UTI prophylaxis. *Journal of Pharmacy Practice* 1997;45(167):168.
- (129) Barbosa-Cesnik C, Brown MB, Buxton M, Zhang L, DeBusscher J, Foxman B. Cranberry Juice Fails to Prevent Recurrent Urinary Tract Infection: Results From a Randomized Placebo-Controlled Trial. *Clin Infect Dis* 2011 January 1;52(1):23-30.
- (130) Stapleton AE, Dziura J, Hooton TM et al. Recurrent Urinary Tract Infection and Urinary Escherichia coli in Women Ingesting Cranberry Juice Daily: A Randomized Controlled Trial. *Mayo Clin Proc* 2012 February;87(2):143-150.
- (131) Takahashi S, Takahashi S, Hamasuna R et al. A randomized clinical trial to evaluate the preventive effect of cranberry juice (UR65) for patients with recurrent urinary tract infection. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2013;19(1):112-117.
- (132) Sengupta K, Alluri KV, Golakoti T et al. A Randomized, Double Blind, Controlled, Dose Dependent Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of a Proanthocyanidin Standardized Whole Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Powder on Infections of the Urinary Tract. *Current Bioactive Compounds* 2011;7(1):39-46.
- (133) Vostalova J, Vidlar A, Simanek V et al. Are High Proanthocyanidins Key to Cranberry Efficacy in the Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection? *Phytother Res* 2015 October 1;29(10):1559-1567.
- (134) Sheiner E, Mazor-Drey E, Levy A. Asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2009 January 1;22(5):423-427.
- (135) Farkash E, Weintraub AY, Sergienko R, Wiznitzer A, Zlotnik A, Sheiner E. Acute antepartum pyelonephritis in pregnancy: a critical analysis of risk factors and outcomes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2012 May;162(1):24-27.
- (136) Wing DA, Rumney PJ, Preslicka CW, Chung JH. Daily Cranberry Juice for the Prevention of Asymptomatic Bacteriuria in Pregnancy: A Randomized, Controlled Pilot Study. *The Journal of Urology* 2008 October;180(4):1367-1372.

- (137) Heitmann K, Nordeng H, Holst L. Pregnancy outcome after use of cranberry in pregnancy GÇô the Norwegian mother and child cohort study. *BMC Complement Altern Med* 2013 December 7;13:345.
- (138) Nordeng H, Bayne K, Havnen GC, Paulsen BS. Use of herbal drugs during pregnancy among 600 Norwegian women in relation to concurrent use of conventional drugs and pregnancy outcome. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 2011 August;17(3):147-151.
- (139) Ferrara P, Romaniello L, Vitelli O, Gatto A, Serva M, Cataldi L. Cranberry juice for the prevention of recurrent urinary tract infections: a randomized controlled trial in children. *Scand J Urol Nephrol* 2009;43(5):369-372.
- (140) Salo J, Uhari M, Helminen M et al. Cranberry juice for the prevention of recurrences of urinary tract infections in children: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2012 February 1;54(3):340-346.
- (141) Afshar K, Stothers L, Scott H, MacNeily AE. Cranberry juice for the prevention of pediatric urinary tract infection: a randomized controlled trial. *J Urol* 2012 October;188(4 Suppl):1584-1587.
- (142) Tapiainen T, Hanni AM, Salo J, Ikaheimo I, Uhari M. Escherichia coli biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014 January;33(1):111-115.
- (143) Durham SH, Stamm PL, Eiland LS. Cranberry Products for the Prophylaxis of Urinary Tract Infections in Pediatric Patients. *Annals of Pharmacotherapy* 2015 December 1;49(12):1349-1356.
- (144) Schlager TA, Anderson S, Trudell J, Hendley JO. Effect of cranberry juice on bacteriuria in children with neurogenic bladder receiving intermittent catheterization. *J Pediatr* 1999 December;135(6):698-702.
- (145) Foda MM, Middlebrook PF, Gatfield CT, Potvin G, Wells G, Schillinger JF. Efficacy of cranberry in prevention of urinary tract infection in a susceptible pediatric population. *Can J Urol* 1995 January;2(1):98-102.
- (146) Rogers J. Clinical: Pass the cranberry juice. *Nurse Times* 1991;27:36-37.
- (147) Linsenmeyer TA HBOKSSJM. Evaluation of cranberry supplement for reduction of urinary tract infections in individuals with neurogenic bladders secondary to spinal cord injury. A prospective, doubleblinded, placebo-controlled, crossover study. *Journal of Spinal Cord Medicine* 2004;27:29-34.
- (148) Waites KB CKADMJ. Effect of cranberry extract on bacteriuria and pyuria in persons with neurogenic bladder secondary to spinal cord injury. 27:35-40. *Journal of Spinal Cord Medicine* 2004;27:35-40.
- (149) Hess MJ, Hess PE, Sullivan MR, Nee M, Yalla SV. Evaluation of cranberry tablets for the prevention of urinary tract infections in spinal cord injured patients with neurogenic bladder. *Spinal Cord* 2008 April 8;46(9):622-626.

- (150) Reid G. Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells: pilot study in spinal cord injured patients. *Spinal Cord* 2001;39:26-30.
- (151) Botto H, Neuzillet Y. Effectiveness of a cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) preparation in reducing asymptomatic bacteriuria in patients with an ileal enterocystoplasty. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 2010 April 1;44(3):165-168.
- (152) Rosenbaum TP. Cranberry juice and the mucus production in entero-uroplasties. *Neurology and Uridynamic Journal* 1989;8:344-345.
- (153) Gettman MT, Ogan K, Brinkley LJ, Adams-Huet B, Pak CY, Pearle MS. Effect of cranberry juice consumption on urinary stone risk factors. *J Urol* 2005 August;174(2):590-594.
- (154) Light I, Gursel E, Zinnser HH. Urinary ionized calcium in urolithiasis Effect of cranberry juice. *Urology* 1973;1(1):67-70.
- (155) Brinkley LRD, McGuire JMD, Gregory JMD, PAK CYC. Bioavailability of oxalate in foods. *Urology* 1981;17(6):534-538.
- (156) Terris MK, Issa MM, Tacker JR. Dietary supplementation with cranberry concentrate tablets may increase the risk of nephrolithiasis. *Urology* 2001 January;57(1):26-29.
- (157) Zinsser HH. Management of infected stones with acidifying agents. *New York State Journal of Medicine* 1968;68(23):3001-3010.
- (158) MAHER MA, Mataczynski Heid, Stefaniak HM, Wilson Ted. Cranberry Juice Induces Nitric Oxide-Dependent Vasodilation In Vitro and Its Infusion Transiently Reduces Blood Pressure in Anesthetized Rats. *Journal of Medicinal Food* 2000 January 1;3(3):141-147.
- (159) Apostolidis E. Potential of cranberry-based herbalsynergies for diabetes and hypertension management. *Asia Pacific Journal of Clinical nutrition* 2006;15:433-441.
- (160) Ruel G, Lapointe A, Pomerleau S et al. Evidence that cranberry juice may improve augmentation index in overweight men. *Nutrition Research* 2013 January;33(1):41-49.
- (161) Zhu Y, Ling W, Guo H et al. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2013 September;23(9):843-849.
- (162) Dohadwala MM, Holbrook M, Hamburg NM et al. Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 2011 May 16;93(5):934-940.

- (163) Yang Y, Shi Z, Reheman A et al. Plant Food Delphinidin-3-Glucoside Significantly Inhibits Platelet Activation and Thrombosis: Novel Protective Roles against Cardiovascular Diseases. *PLoS One* 2012 May 18;7(5):e37323.
- (164) Weiss EI, Kozlovsky A, Steinberg D et al. A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters* 2004 March 1;232(1):89.
- (165) Shmueli H, Yahav J, Samra Z et al. Effect of cranberry juice on eradication of *Helicobacter pylori* in patients treated with antibiotics and a proton pump inhibitor. *Mol Nutr Food Res* 2007 June 1;51(6):746-751.
- (166) Gotteland M, Andrews M, Toledo M et al. Modulation of *Helicobacter pylori* colonization with cranberry juice and *Lactobacillus johnsonii* La1 in children. *Nutrition* 2008 May;24(5):421-426.
- (167) Rodriguez-Perez C, Quirantes-Pine R, Uberos J, Jimenez-Sanchez C, Pena A, Segura-Carretero A. Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. *Food Funct* 2016 March;7(3):1564-1573.
- (168) Uberos J, Fernandez-Puentes V, Molina-Oya M et al. Urinary excretion of phenolic acids by infants and children: a randomised double-blind clinical assay. *Clin Med Insights Pediatr* 2012;6:67-74.
- (169) Uberos J, Iswaldi I, Rodríguez-Belmonte R et al. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) changes the surface hydrophobicity and biofilm formation of *E. coli*. *Microbiology Insights* 2011;4(21):27.
- (170) Gonthier MP, Donovan JL, Texier O, Felgines C, Remesy C, Scalbert A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med* 2003 October 15;35(8):837-844.
- (171) Tsang C, Auger C, Mullen W et al. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr* 2005 August;94(2):170-181.
- (172) Stoupi S, Williamson G, Viton F et al. In vivo bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [<sup>14</sup>C]procyanidin B2 in male rats. *Drug Metab Dispos* 2010 February;38(2):287-291.
- (173) Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004 May;79(5):727-747.
- (174) Garin EH, Olavarria F, Garcia N, V, Valenciano B, Campos A, Young L. Clinical significance of primary vesicoureteral reflux and urinary antibiotic prophylaxis after acute pyelonephritis: a multicenter, randomized, controlled study. *Pediatrics* 2006 March;117(3):626-632.
- (175) Savage DC, Howie G, Adler K, Wilson MI. Controlled trial of therapy in covert bacteriuria of childhood. *Lancet* 1975 February 15;1(7903):358-361.

- (176) Blanco M, Blanco J, Blanco JE et al. [Virulence factors and O serogroups of *Escherichia coli* as a cause of community-acquired urinary infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995 April;13(4):236-241.
- (177) Evans DG, Evans DJ, Jr., Tjoa W. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect Immun* 1977 November;18(2):330-337.
- (178) Lindahl M, Faris A, Wadstrom T, Hjerten S. A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim Biophys Acta* 1981;677:471-476.
- (179) Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple methods for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Letters* 1980;9:29-33.
- (180) Lachica RV, Zink DL. Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1984 May;44(2):540-543.
- (181) Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 2000 April;40(2):175-179.
- (182) Singleton YL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965;16:144-158.
- (183) Julkunen-Titto R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 1985;33:213-217.
- (184) Fuleki T, Francis FJ. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries. *J Food Sci* 1968;33:72-77.
- (185) Chen SN, Turner A, Jaki BU et al. An experimental implementation of chemical subtraction. *J Pharm Biomed Anal* 2008 March 13;46(4):692-698.
- (186) Deprez S, Brezillon C, Rabot S et al. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr* 2000 November;130(11):2733-2738.
- (187) Wiese S, Esatbeyoglu T, Winterhalter P et al. Comparative biokinetics and metabolism of pure monomeric, dimeric, and polymeric flavan-3-ols: a randomized cross-over study in humans. *Mol Nutr Food Res* 2015 April;59(4):610-621.
- (188) Ferreiros CM, Criado MT. Expression of surface hydrophobicity encoded by R-plasmids in *Escherichia coli* laboratory strains. *Arch Microbiol* 1984 July;138(3):191-194.

- (189) Gibbons RJ, Spinell DM, Skobe Z. Selective adherence as a determinant of the host tropisms of certain indigenous and pathogenic bacteria. *Infect Immun* 1976 January;13(1):238-246.
- (190) Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. *J Dent Res* 1989 September;68(9):1303-1307.
- (191) Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 2008 August;85(1):11-19.
- (192) Magnusson KE. Hydrophobic interaction--a mechanism of bacterial binding. *Scand J Infect Dis Suppl* 1982;33:32-36.
- (193) Hancock V, Wits° IL, Klemm P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *Int J Med Microbiol* 2011;301(7):570-576.
- (194) Braga LHP, Bagli DJ, Lorenzo AJ. Placebo-controlled trials in pediatric urology: A cautionary view from an ethical perspective. *Journal of Pediatric Urology* 2010 October;6(5):435-442.
- (195) Craig JC, Simpson JM, Williams GJ et al. Antibiotic prophylaxis and recurrent urinary tract infection in children. *N Engl J Med* 2009 October 29;361(18):1748-1759.
- (196) McMurdo ME, Argo I, Phillips G, Daly F, Davey P. Cranberry or trimethoprim for the prevention of recurrent urinary tract infections? A randomized controlled trial in older women. *J Antimicrob Chemother* 2009 February;63(2):389-395.
- (197) Uberos J, Noguera-Ocaña M, Fernández-Puentes V, Rodríguez-Belmonte R, Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A. Cranberry syrup vs trimethoprim in the prophylaxis of recurrent urinary tract infections among children: a controlled trial. *Open Access Journal of Clinical Trials* 2012(4):31-38,.
- (198) Latti AK, Kainulainen PS, Hayirlioglu-Ayaz S, Ayaz FA, Riihinen KR. Characterization of Anthocyanins in Caucasian Blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Native to Turkey. 57 ed. 2009:5244-5249.
- (199) Cheng CH, Tsai MH, Huang YC et al. Antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in children with vesicoureteral reflux receiving prophylactic antibiotic therapy. *Pediatrics* 2008 December;122(6):1212-1217.
- (200) Combet E, Lean MEJ, Boyle JG, Crozier A, Davidson DF. Dietary flavonols contribute to false-positive elevation of homovanillic acid, a marker of catecholamine-secreting tumors. *Clin Chim Acta* 2011 January 14;412(1-2):165-169.
- (201) Nurmi T, Mursu J, Heinonen M, Nurmi A, Hiltunen R, Voutilainen S. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J Agric Food Chem* 2009 March 25;57(6):2274-2281.

- (202) Hirabayashi T, Ochiai H, Sakai S, Nakajima K, Teresawa K. Inhibitory Effect of Ferulic Acid and Isoferulic Acid on Murine Interleukin-8 Production in Response to Influenza Virus Infections in vitro and in vivo. *Planta Med* 1995;61(3):221-226.
- (203) Sakai S, Kawamata H, Kogure T et al. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in RAW264.7 cells. *Mediators Inflamm* 1999;8(3):173-175.
- (204) Tempera G, Corsello S, Genovese C, Caruso FE, Nicolosi D. Inhibitory activity of cranberry extract on the bacterial adhesiveness in the urine of women: an ex-vivo study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010 April;23(2):611-618.
- (205) Lavigne JP, Bourg G, Combescure C, Botto H, Sotto A. In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) capsules. *Clin Microbiol Infect* 2008 January 7.
- (206) Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995 December;62(6):1276-1282.
- (207) Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* 2007 September;137(9):2043-2048.
- (208) Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res* 1998 February;21(1):17-23.
- (209) Salminen A, Loimaranta V, Joosten JA et al. Inhibition of P-fimbriated *Escherichia coli* adhesion by multivalent galabiose derivatives studied by a live-bacteria application of surface plasmon resonance. *J Antimicrob Chemother* 2007 September;60(3):495-501.
- (210) Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-333.
- (211) Xiao X, Gao M, Zhu Q, Mo F, Liu H, Gao S. Studies on pharmacokinetics and metabolism of ferulic acid. *Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics* 2009;9(2):135-143.
- (212) Fu K, Hassett DJ, Cohen M.S. Oxidant stress in *Neisseria gonorrhoeae*: Adaptation and effects on L-(+)Lactate dehydrogenase activity. *Infect Immun* 1989;57(7):2173-2178.
- (213) Uberos J, Augustin C, Liebana J, Molina A, Munoz-Hoyos A. Comparative study of the influence of melatonin and vitamin E on the surface characteristics of *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 2001 May;32(5):303-306.

- (214) Daniels WMU, Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Pablos MI, Ortiz GG. Melatonin Counteracts Lipid Peroxidation Induced by Carbon Tetrachloride But Does Not Restore Glucose 6 Phosphatase Activity. *J Pineal Res* 1995;19:1-6.
- (215) Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R, Sewerynek E, Melchiorri D, Barlowwalden LR. Melatonin, a Mediator of Electron Transfer and Repair Reactions, Acts Synergistically with the Chain Breaking Antioxidants Ascorbate, Trolox and Glutathione. *Neuroendocrinological Letters* 1995;17:87-92.
- (216) Sadowska B, Paszkiewicz M, Podsedek A, Redzynia M, Rozalska B. Vaccinium myrtillus leaves and Frangula alnus bark derived extracts as potential antistaphylococcal agents. *Acta Biochimica Polonica* 2014;61(1):163-169.
- (217) Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simoes M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist* 2013 August;19(4):256-265.