

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS FLAVONOIDES COMO  
AGENTES ANTIINFLAMATORIOS INTESTINALES**

TESIS DOCTORAL PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Isabel María Ballester Espigares

Bajo la dirección de los doctores:

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Julio Gálvez Peralta

Antonio Zarzuelo Zurita

**Granada, 2006**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Isabel María Ballester Espigares  
D.L.: Gr. 1870 - 2006  
ISBN: 978-84-338-4107-0

---

## *Índice*



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. Enfermedad inflamatoria intestinal</b>	<b>1</b>
1. 1. Generalidades	1
1. 2. Epidemiología	1
1. 3. Etiología	2
Factores ambientales	2
Factores genéticos	4
Flora bacteriana	5
1. 4. Fisiopatología de la EII	6
1. 5. Transducción de señal en la EII	9
MAP quinasas	11
LPS	16
<b>2. Flavonoides</b>	<b>19</b>
2. 1. Estructura química	19
2. 2. Distribución	20
2. 3. Metabolismo y absorción	22
2. 4. Acciones farmacológicas	23
Actividad antioxidante	23
Efectos cardiovasculares	25
Actividad anticancerosa	26
Actividad antiinflamatoria	27
<b>3. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>39</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>43</b>
<b>1. Reactivos</b>	<b>43</b>
<b>1. Cultivos celulares</b>	<b>43</b>
2. 1. Líneas tumorales	43
2. 2. Cultivos primarios	44
Obtención y cultivo de macrófagos murinos derivados de médula ósea	44

Obtención del medio condicionado para el cultivo de macrófagos	45
Extracción de linfocitos murinos de bazo	45
<b>3. Ensayos de viabilidad y proliferación celular</b>	<b>46</b>
3. 1. Estudio de viabilidad celular por cristal violeta	46
3. 2. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa	47
3. 3. Estudio de viabilidad/proliferación celular con el reactivo WST-1	47
3. 4. Ensayos de incorporación de timidina marcada	48
<b>4. Determinación de la secreción de citoquinas</b>	<b>50</b>
4. 1. Determinación de la secreción de IL-8 en HT29	50
4. 2. Determinación de la secreción de IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6 en células THP-1	50
4. 3. Determinación de la secreción de TNF e IL-10 en macrófagos murinos	51
4. 4. Determinación de la secreción de IL-2 en linfocitos de bazo	51
<b>5. Determinación de la expresión de iNOS e I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math>-P en macrófagos de ratón</b>	<b>51</b>
5. 1. Obtención de muestras	52
Obtención del lisado celular	52
Determinación del contenido de proteínas. Método del ácido bicinchonínico	52
5. 2. Western Blot	53
<b>6. Determinación de mucinas en células HT29-MTX</b>	<b>54</b>
6. 1. Extracción y cuantificación de RNA total	54
6. 2. Determinación de la concentración de RNA	54
6. 3. Separación de RNA mediante electroforesis	55
6. 4. Transcripción inversa	55
6. 5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	55
6. 6. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	56
<b>7. Determinación de los niveles de mRNA de IL-10 en macrófagos</b>	<b>57</b>
<b>8. Inducción de la colitis y determinación del daño colónico</b>	<b>57</b>
8. 1. Animales de experimentación	57
8. 2. Diseño del experimento e inducción de la colitis	58
8. 3. Determinación de la actividad mieloperoxidasa colónica	60
8. 4. Determinación de IL-1 $\beta$ y TNF en el tejido colónico	60
8. 5. Fermentación fecal de la quercitrina y análisis por HPLC	61

<b>9. Estudio estadístico</b>	<b>61</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>65</b>
<b>1. Efecto de los flavonoides sobre la secreción de mediadores inflamatorios</b>	<b>65</b>
1. 1. Ensayos en líneas tumorales	66
1. 1. 1. Efecto de los flavonoides sobre la línea celular HT29	66
1. 1. 2. Efecto de los flavonoides sobre la producción de mucinas en la línea celular HT29-MTX	69
1. 1. 3. Efecto de los flavonoides sobre la línea celular THP-1	71
1. 2. Ensayos en cultivos primarios	77
1. 2. 1. Efecto de los flavonoides sobre linfocitos aislados de bazo de ratón	77
Efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL-2 en linfocito de bazo	77
Efecto de los flavonoides sobre la proliferación de linfocitos de bazo	78
1. 2. 2. Efecto de los flavonoides sobre macrófagos derivados de la médula ósea	81
Efecto de los flavonoides sobre la viabilidad y proliferación de los macrófagos dependiente de M-CSF	81
Efecto de los flavonoides sobre la liberación de TNF en macrófagos activados con LPS	84
Efecto de los flavonoides sobre la expresión de iNOS en macrófagos activados con LPS	85
Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ inducida por LPS	87
Efecto de la luteolina y la quercetina sobre la secreción de IL-10 inducida por LPS	90
<b>2. Efecto de la administración de quercitrina en un modelo de colitis experimental <i>in vivo</i></b>	<b>92</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>99</b>
<b>1. Efecto de los flavonoides sobre células epiteliales</b>	<b>102</b>
<b>2. Efecto de los flavonoides sobre monocitos humanos</b>	<b>106</b>
<b>3. Efecto de los flavonoides sobre linfocitos murinos procedentes de bazo</b>	<b>109</b>
<b>4. Efecto de los flavonoides sobre macrófagos murinos derivados de médula ósea</b>	<b>112</b>
<b>5. Efecto de la administración de quercitrina en el modelo de colitis inducida con sulfato de dextrano en ratas</b>	<b>118</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>127</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>161</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>161</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>163</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>164</b>
<b>Publicaciones derivadas del trabajo realizado en el período de tesis</b>	<b>166</b>

---

## *Introducción*



## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Enfermedad inflamatoria intestinal**

#### 1. 1. Generalidades

La denominación enfermedad inflamatoria intestinal (EII) engloba una serie de trastornos multisistémicos de etiología desconocida, caracterizados por una inflamación recurrente del tracto gastrointestinal y cuyos cuadros clínicos más representativos son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Ambas presentan síntomas clínicos comunes como dolor abdominal, diarrea y pérdida de peso, aunque también poseen claras diferencias en cuanto a la distribución de las lesiones que causan. La CU afecta a las capas más superficiales del intestino grueso (mucosa y submucosa) (Obrador A, 1994). Las lesiones comienzan en el recto y se extienden hacia la zona proximal de manera continua. La EC en cambio puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano, aunque se presenta más comúnmente en el íleon terminal y en el colon proximal. El daño afecta a todo el grueso de la pared del intestino, llegando a producir perforaciones, estenosis y fístulas con órganos adyacentes (Gassull MA, 1994). En los dos casos se encuentran características histológicas muy similares a nivel de la mucosa, lo cual dificulta su diagnóstico. No obstante, la existencia de granulomas es específica de la EC, aunque éstos sólo se detectan en un 25% de los casos frente a la CU.

#### 1. 2. Epidemiología

La EII se presenta con más incidencia en individuos de raza blanca y a edades tempranas. Varios estudios han sugerido que dentro de áreas geográficas específicas, la tasa de incidencia de la EII es de 2 a 4 veces más alta en judíos que en otros grupos étnicos. La EC tiene una mayor incidencia en mujeres que en varones, mientras que la CU afecta por igual a ambos sexos. En cuanto a la edad, en la CU se observa un pico de máxima incidencia entre los 30 y 35 años y otro menos importante entre los 60 y 65

años, mientras que en la EC la máxima incidencia está entre los 15 y 25 años, con un segundo pico menos relevante entre los 60 y 65 años (Stowe et al., 1990).

La incidencia de la EII varía mucho en cada área geográfica y entre diferentes poblaciones. Se calcula que de aproximadamente 400 millones de europeos, unas 850.000 personas padecen EC y 1.000.000 CU (Loftus and Sandborn, 2002). En Asia y América del sur la EII es muy infrecuente (Royero HA, 2003). Aunque la prevalencia de la EII está empezando a estabilizarse en áreas de alta incidencia como el norte de Europa y de América, continúan aumentando en países de baja incidencia como Asia, el sur de Europa y otros países en vías de desarrollo (Loftus, 2004). En España, varios estudios prospectivos poblacionales han mostrado una frecuencia variable de EII (8-16 casos por 100.000 habitantes/año) (Brullet et al., 1998; Lopez Miguel et al., 1999; Saro Gismera et al., 2000).

### 1. 3. Etiología

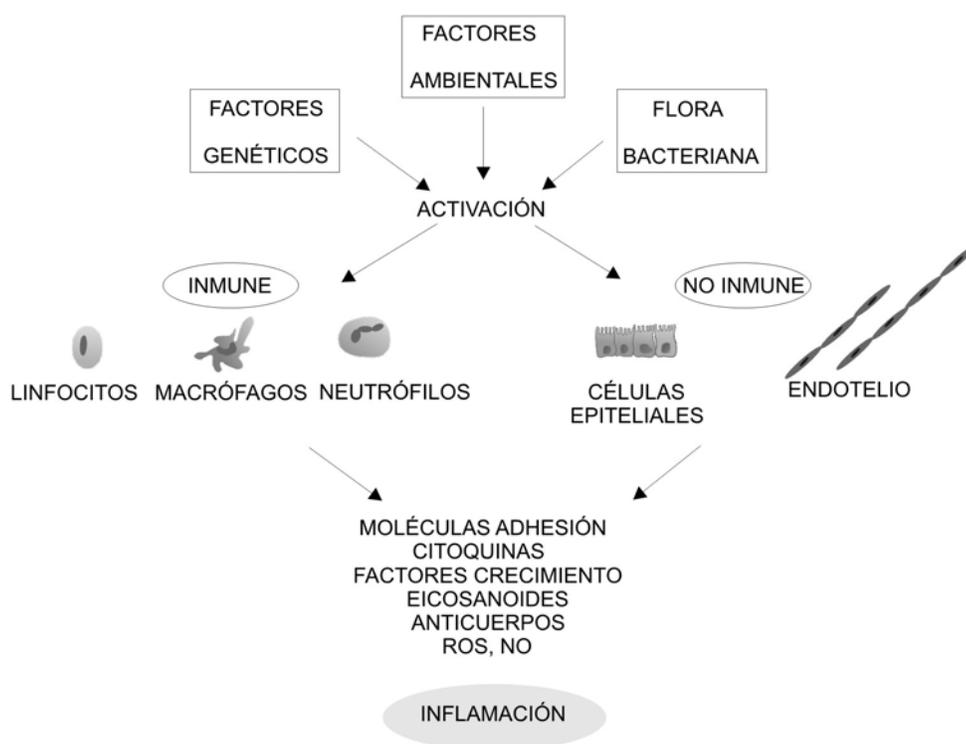
La causa de estas enfermedades se considera desconocida, aunque existen una serie de factores que inciden tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de las mismas (Figura 1).

#### Factores ambientales

El **tabaco** se ha mostrado como un factor protector para la CU y un factor de riesgo para la EC, siendo la asociación entre tabaco y EC más frecuente entre las mujeres. Los mecanismos por los cuales fumar afecta la frecuencia y la evolución de la CU y la EC son desconocidos, aunque la nicotina parece poseer cierto efecto antiinflamatorio (Sykes et al., 2000). El tabaco está asociado con el desarrollo de EC a partir de los 40 años, y protege frente al desarrollo de CU a cualquier edad, pero sobre todo en edades tempranas (Regueiro et al., 2005). Los efectos agravantes del humo del tabaco sobre la colitis se han atribuido asimismo a la nicotina, a partir de datos obtenidos en un modelo experimental de colitis en ratas. Un bloqueante de receptores nicotínicos, el

hexametonio, fue capaz de prevenir los efectos nocivos de la exposición al humo de tabaco a la que los animales fueron sometidos (Galeazzi et al., 1999).

**Dieta.** La dieta ejerce una influencia destacable en la EII, como cabe esperar de una enfermedad que afecta al tubo digestivo. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que los cambios en la composición de la dieta pueden afectar a la respuesta inmunológica. Concretamente, los lípidos son uno de los sustratos nutricionales que más afectan a la modulación de la inmunidad. La composición de los lípidos de las membranas celulares puede variar según la dieta, y esto influye en la síntesis de eicosanoides y en la respuesta celular (Gassull, 2004; Gassull et al., 2005).



**Figura 1.** Factores desencadenantes de la EII.

El *estrés* está también asociado con la EII, pero más como un agente modificador que inductor, y su papel es más obvio en modelos animales de EII que en humanos. Así, existen estudios que relacionan el estrés psicológico duradero con un aumento de exacerbación de los síntomas de la enfermedad (Levenstein et al., 2000).

### Factores genéticos

Se sabe que los parientes en primer grado de los enfermos de Crohn o colitis ulcerosa tienen una probabilidad mucho mayor que la población general de presentar la enfermedad. La ilustración más directa de lo anterior y la evidencia más sólida, quizás, en favor del factor genético, ha sido la observación de una concordancia muy alta en la frecuencia de aparición de la enfermedad en pares de gemelos (44%), comparada con un 3.8% en mellizos (Orholm et al., 2000). Dentro de familias con múltiples casos de EC, existen además patrones comunes en cuanto a las características de la enfermedad. Esto sugiere que ciertos factores genéticos o ambientales compartidos por los miembros de una misma familia determinan el curso de la patología (Halme et al., 2006; Cho et al., 2004). Hugot et al. y Ogura et al. identificaron el primer gen de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn, el NOD2. Nod2 pertenece a una familia de proteínas intracelulares que participan en la regulación de la muerte celular programada o apoptosis y en la respuesta inmune del organismo contra los patógenos. Hoy se sabe que las diferentes áreas de la proteína Nod2 tienen funciones muy específicas que, en general, determinan la capacidad de la proteína para regular la respuesta a las bacterias, una vez que éstas han invadido la célula. Nod2 participa en la detección de productos bacterianos, concretamente el muramil dipéptido (MDP), la unidad menor del peptidoglicano común a grampositivos y a gramnegativos, y produce la activación del NFκB. Las mutaciones en el gen NOD2 conducen a una apoptosis anormal, y a una activación deficiente del factor de transcripción NFκB, que influye en la patogénesis de la enfermedad (Ogura et al., 2001). Sin embargo, de forma paradójica la actividad NF κB se encuentra aumentada en la mucosa de pacientes con EC. Este hecho puede deberse a la inhibición que Nod2 ejerce sobre la activación de NFκB por el TLR2, la

cual se transforma en potenciación cuando Nod2 presenta las mutaciones relacionadas con la EC (Watanabe et al., 2004).

### Flora bacteriana

Se sabe que el factor genético por sí solo no es suficiente para provocar EII. Existe cada vez más certeza de que la presencia de ciertas bacterias, no forzosamente patógenas *per se*, es determinante para el desarrollo de la inflamación. De hecho, se ha comprobado la eficacia clínica del uso de antibióticos de amplio espectro y de probióticos en algunos grupos de pacientes (Rembacken et al., 1999; Sutherland et al., 1991; Turunen et al., 1998).

En investigaciones desarrolladas en los últimos diez años, llama la atención que en diversos modelos experimentales de EII, incluyendo animales transgénicos o con delección génica (knockout), la enfermedad no se manifiesta en ambiente libre de patógenos, pero sí en presencia de flora normal (Aranda et al., 1997).

En el intestino existe un estado que se ha definido como "inflamación fisiológica", es decir, de cierto estado de activación leucocitaria mayor que en otros tejidos pero con tolerancia a los antígenos presentes en el lumen intestinal, mayoritariamente de origen bacteriano. En la EII esta tolerancia parece disiparse, al menos en parte. Así, las células mononucleares obtenidas de la *lamina propria* de individuos sanos o con EII en remisión no proliferan en respuesta a sonidos de flora intestinal "autóloga", pero sí lo hacen las procedentes de pacientes con EII activa. Este fenómeno es específico, ya que las células mononucleares de *lamina propria* son estimuladas normalmente por antígenos de la flora intestinal de otros individuos, en tanto que las de sangre periférica no reaccionan en ningún caso (Duchmann et al., 1995). La respuesta inflamatoria en la EII, por tanto, depende de la presencia de antígenos en el lumen y está mediada por linfocitos T, aunque se desconoce la identidad de las bacterias que podrían influir en el desarrollo de la enfermedad (Davidson et al., 1996).

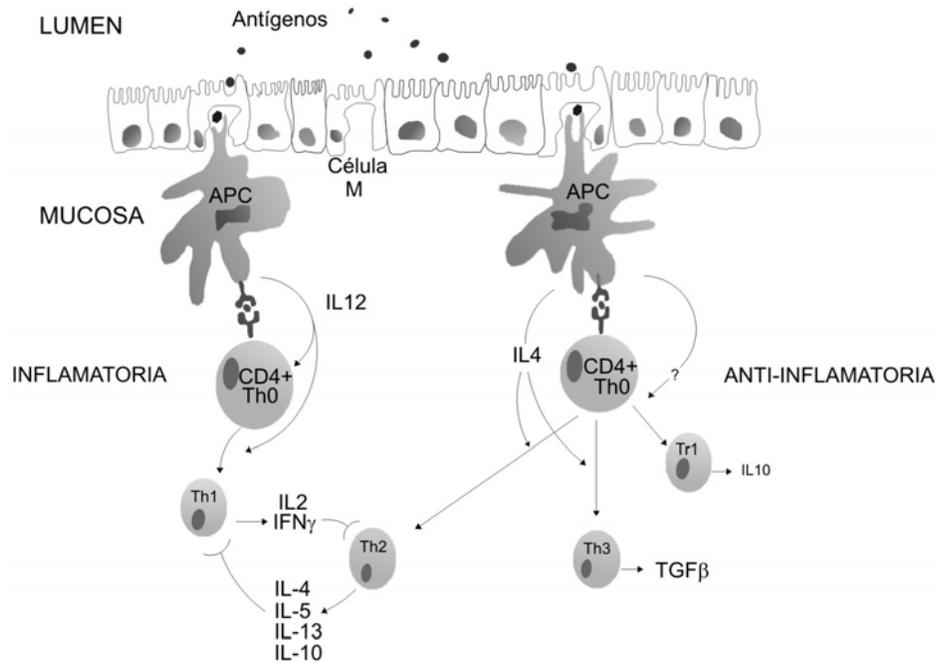
#### 1. 4. Fisiopatología de la EII

La enfermedad de Crohn parece ser una patología mediada por una respuesta Th1, dado que se encuentran aumentados los niveles de  $IFN\gamma$  (Breese et al., 1993), así como los de las citoquinas que estimulan su liberación (IL-12 e IL-18) (te Velde et al., 2003). Aunque los modelos animales de EII muestran una clara polarización hacia una respuesta Th1 o Th2, esto no parece cumplirse en el caso de la colitis ulcerosa en humanos. No obstante, sí está muy bien determinado que la EC se caracteriza por una respuesta Th1 (Podolsky, 2002).

La decantación del sistema inmunológico por uno u otro tipo de respuesta efectora depende fundamentalmente de la influencia de las citoquinas sobre los linfocitos T vírgenes (Th0: "naive") en el momento de la interacción con el antígeno (Figura 2). Este proceso está protagonizado por los macrófagos y las células dendríticas. Ambos tipos celulares se encuentran presentes en todo momento en la mucosa intestinal, pero los macrófagos acuden además masivamente en caso de inflamación. Tras penetrar en el tejido, los monocitos se diferencian a macrófagos tisulares, que persisten mucho más tiempo que los neutrófilos en el foco inflamado. Por ese motivo son las células efectoras que predominan en las fases avanzadas de la respuesta inmunitaria. Los macrófagos y células dendríticas procesan y presentan el antígeno en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad a los linfocitos T  $CD4^+$ . La decisión de cuál es el fenotipo que una célula T va a adoptar en respuesta a la estimulación se toma en el primer encuentro con el antígeno, y dependerá de éste y de las señales coestimuladoras que intervengan en su presentación, que a su vez dependen en buena medida del tipo de antígeno implicado.

La importancia de las citoquinas y quimioquinas en la respuesta inflamatoria intestinal ha quedado sólidamente establecida por el éxito de numerosas terapias inmunoregulatoras utilizadas en modelos de colitis experimental (Neurath et al., 1996; Ten Hove et al., 2001). En humanos, hasta el momento se han utilizado anticuerpos

frente al TNF que han dado buenos resultados tanto en la CU como en la EC (Sands et al., 2004).



**Figura 2.** Inflamación de la mucosa. Reconocimiento del antígeno e inmunoregulación. Respuestas inflamatoria y antiinflamatoria.

Los mediadores liberados por las células presentadoras de antígenos (APCs), fundamentalmente IL-12, IL-18 y TNF, inducen la activación de linfocitos vírgenes intraepiteliales y de la *lamina propria* y su diferenciación hacia Th1. Estas células activadas, liberan a su vez citoquinas, lo que tiende a ampliar y reforzar la respuesta. Por otra parte, los mediadores proinflamatorios que se producen (IL-1, IL-6, TNF, entre otros) activan también a los linfocitos y macrófagos residentes en la *lamina propria*, así como a las células del epitelio intestinal, para que establezcan un gradiente quimiotáctico a través de la mucosa, promoviendo la migración de leucocitos al foco

inflamatorio. Entre las sustancias implicadas destacan el leucotrieno B4 (LTB4) y la IL-8, liberadas, entre otras sustancias, por las células del epitelio (Kagnoff y Eckmann, 1997). El LTB4 tiene un claro efecto proinflamatorio derivado de su actividad quimiotáctica y activadora de neutrófilos, que puede ser responsable de gran parte de fenómenos de citotoxicidad directos sobre el tejido intestinal, a través de la secreción de diversas proteasas y radicales libres (Yamada T, 1994). El reclutamiento de leucocitos circulantes depende además de la activación del endotelio, la cual consiste en la expresión de moléculas de adhesión (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) que median los procesos de rodamiento, frenado y diapédesis. La IL-1 y el TNF parecen ser los principales responsables de este fenómeno. El resultado final es el acúmulo de leucocitos en la mucosa intestinal y la producción de múltiples mediadores proinflamatorios, incluyendo, además de los ya mencionados, la prostaglandina E2 (PGE2), el ácido 5-hidroxicicosatetraenoico (5-HETE), el 12-HETE, el 15-HETE y el factor activador de plaquetas (PAF) (Wallace et al., 1994).

Sin embargo, el hecho de que el intestino esté en contacto continuo con la flora bacteriana hace necesaria la existencia de mecanismos de control que eviten una respuesta desproporcionada. Así, en la mucosa normal esta respuesta es controlada por una serie de citoquinas antiinflamatorias y reguladoras (IL-10, IL-4, IL-5, TGF $\beta$ ) que son producidas por macrófagos y linfocitos Th2, Th3 y Tr1. Por algún motivo que desconocemos, los pacientes de EII no son capaces de mantener este equilibrio.

En ambas enfermedades, CU y EC, se produce una síntesis elevada de citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF. No está claro qué tipo de mediadores influyen en este fenómeno, pero parece ser que los factores de transcripción que se unen a las regiones promotoras de estos genes juegan un papel importante. Entre ellos se encuentra el factor nuclear  $\kappa$ B, que regula la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-18 y TNF, entre otros mediadores, en linfocitos, monocitos y células del epitelio intestinal, y cuya actividad se encuentra aumentada en la mucosa de pacientes con enfermedad activa (Neurath et al., 1998).

La regulación del sistema inmunológico intestinal ha sido investigada profundamente en modelos animales. Así, se han generado varios modelos de colitis, tanto Th1 como Th2, utilizando la inactivación funcional de citoquinas reguladoras. Estos modelos destacan la importancia de que exista una regulación controlada de la respuesta inmune de la mucosa dado que, por ejemplo, la ausencia de la IL-10 en ratones da lugar a una inflamación intestinal caracterizada por la producción elevada de IFN $\gamma$  e IL-2 (Rennick et al., 1995). Es interesante constatar que estos ratones responden a la administración repetida de IL-10 durante la primera fase de la enfermedad pero, cuando la patología avanza, ésta sólo puede ser tratada mediante la administración de anticuerpos que neutralizan el IFN $\gamma$  (Berg et al., 1996). Análogamente, en la mucosa de individuos sanos, las células CD4<sup>+</sup> contribuyen a la inhibición de la acción de linfocitos T efectores mediante la producción de IL-10 y TGF $\beta$ , pero en la mucosa inflamada la producción de IL-10 es insuficiente. Aunque los niveles de TGF $\beta$  están aumentados, las células T son insensibles a sus efectos reguladores, por la sobreexpresión de SMAD7 (Monteleone et al., 2001), un inhibidor de la señalización del TGF $\beta$ . Este tipo de estudios sugiere que en la enfermedad de Crohn el objetivo debe ser inhibir la producción de las citoquinas Th1 como el IFN $\gamma$ , prevenir la diferenciación de linfocitos T hacia el fenotipo Th1, o administrar citoquinas reguladoras como la IL-10, que inhiban a las células Th1. Esto podría conseguirse también de forma indirecta. Un ejemplo es el éxito del tratamiento de la EII con huevos de helmintos, basado en que estos parásitos inhiben el desarrollo de la respuesta inmune Th1, y al mismo tiempo favorecen la producción de citoquinas reguladoras (IL-10 y TGF $\beta$ ) (Elliott et al., 2005).

### 1. 5. Transducción de señal en la EII

El estudio de los mecanismos de transducción de señal activados por mediadores inflamatorios es muy importante para entender el desarrollo de la respuesta inmunitaria y para el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas más específicas que las existentes hoy en día.

La activación de receptores de membrana por estos mediadores inflamatorios inicia una compleja red de señales intracelulares que en muchos casos culmina en un cambio en la expresión génica de la célula diana. Existen numerosos mecanismos de transducción de señal. En este apartado hablaremos de algunos de los que poseen una conocida implicación en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, se ha descrito la implicación de la familia SMAD, que participa en la transducción de señal del TGF $\beta$  (Hommes et al., 2003). En el caso de la familia STAT, la unión de citoquinas como IFN $\gamma$ , IL-6 o IL-10 a sus correspondientes receptores conduce a la fosforilación de los mismos por parte de la familia de las Jak quinasas y a la posterior unión de proteínas STAT inactivas. Dichas proteínas STAT se dimerizan y fosforilan por acción de Jak y a continuación migran al núcleo, activando la transcripción génica. Se ha demostrado que la IL-12 induce el desarrollo de linfocitos Th1 a través de una vía dependiente de STAT-4 (Thierfelder et al., 1996), en tanto que la IL-4 favorece la diferenciación de linfocitos Th2 a través de una vía dependiente de STAT 6 (Kaplan et al., 1996).

La activación de PPAR $\gamma$  mejora la colitis mediante la inhibición de NF $\kappa$ B. Este efecto se ha conseguido en modelos experimentales de EII tanto mediante la manipulación farmacológica (Sánchez-Hidalgo et al., 2005) como por terapia génica (Nakajima et al., 2003). La expresión de PPAR $\gamma$  es más alta en la mucosa colónica normal (y en la de enfermos de Crohn) que en la de pacientes con colitis ulcerosa (Rogler, 2004).

Otro ejemplo de vía de señalización, implicada en la respuesta inflamatoria de los linfocitos, es la activación del factor de transcripción NF-AT, que desempeña un papel esencial en la respuesta proliferativa de los mismos. El NF-AT se encuentra en reposo en el citoplasma de la célula con un residuo de serina fosforilado. Se activa por la enzima calcineurina fosfatasa, dependiente del complejo calcio-calmodulina, que desfosforila a NF-AT y permite su translocación al núcleo, donde activa la transcripción de diversas citoquinas proinflamatorias, como la IL-2 y la IL-4, entre otras.

Existen dos vías ampliamente descritas por su implicación en la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias por los monocitos/macrófagos activados durante la EII. Se trata de la cascada de activación de las MAPKs y la vía IKK/NFκB.

#### MAP quinasas

En mamíferos, el término general MAPK "*Mitogen-Activated Protein Kinase*" comprende una superfamilia de serín/treonín-quinasas que pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos, como por ejemplo shock osmótico, irradiación, lesiones en el DNA o productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS). Se expresan en todas las células e intervienen en mecanismos de supervivencia, crecimiento e inflamación (van Montfrans et al., 2002).

En función de los estímulos que inducen su activación estas MAP quinasas han sido divididas en tres grandes grupos. Así, los factores de crecimiento o estímulos mitogénicos promueven principalmente la activación de las quinasas ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), mientras que los estímulos de estrés celular inducen la activación de otras dos subfamilias, las JNK/SAPK (*c-jun NH2-terminal Kinase* o *Stress-Activated MAP Kinase*) y un tercer grupo constituido por p38RK (*Reactivated Kinase*). En los últimos años, p38 ha suscitado mucho interés por su participación en la respuesta celular frente al estrés, citoquinas como TNF e IL-1, PMA y componentes bacterianos como el LPS.

Además, con respecto a la EII, se ha demostrado que la inhibición de JNK y p38 en enfermos de Crohn mediante la administración de CNI-1493 dio lugar a una disminución de la producción de TNF y a una mejora clínica considerable (Hommes et al., 2002). Sin embargo, los ensayos realizados en modelos experimentales han dado resultados contradictorios (Kruschewski et al., 2006).

Entre los sustratos de JNK se encuentra el factor de transcripción c-Jun, que participa en la activación del complejo transcripcional AP-1 (*Activator-Protein-1*) implicado a su vez

en la activación de los linfocitos y en otros procesos celulares (Han et al., 1998). p38 participa también en la activación de AP-1, promoviendo la transcripción de los genes que lo forman: Jun y Fos (Karin et al., 1997).

En los macrófagos, la vía de las MAP quinasas controla numerosos procesos celulares (diferenciación, activación, proliferación, apoptosis) y tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la inmunidad en condiciones normales y en situaciones de inflamación.

### IKK/NFκB

La vía de señalización de IKK/NFκB es activada por distintos estímulos extracelulares, como el estrés, las citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1) y componentes de las bacterias como el lipopolisacárido (LPS), a través de los receptores de tipo Toll (Toll like Receptors, TLR) (Akira et al., 2001). Esta vía es activada también por NOD2 (CARD 15), que como hemos mencionado, es un receptor intracitoplasmático que reconoce al MDP.

La activación de NFκB desempeña un papel muy importante en la inflamación a través de la regulación de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y enzimas inducibles como la COX-2 y la iNOS. Además de participar en la inmunidad innata, influye en múltiples aspectos de la fisiología normal y de la enfermedad (Hayden y Ghosh, 2004), y su actividad es muy importante en la regulación de la proliferación celular (Bremner y Heinrich, 2002). La forma clásica y predominante del NFκB consiste en un heterodímero formado por las subunidades p65 (RelA) y p50 (NFκB1). Sin embargo, existen múltiples variantes que se presentan como homodímeros o heterodímeros de los cinco miembros conocidos de la familia de proteínas Rel (p65/RelA, c-Rel, RelB, p50/NFκB 1 y p52/NFκB 2) (Verma et al., 1995). La subunidad p65 es la que posee más fuerte activación transcripcional. p50 y p52 proceden de las proteínas precursoras p105 y p100, respectivamente. Ambas son inactivas transcripcionalmente pero pueden inducir la expresión de genes cuando forman

heterodímeros con p65, c-Rel, o Rel-B. Los homodímeros compuestos por p50/p50 y p52/p52 pueden bloquear la transcripción (Schmitz y Baeuerle, 1991).

En situación de reposo el dímero NF $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma en forma inactiva unido a la proteína inhibidora I $\kappa$ B. La activación de NF $\kappa$ B por los estímulos extracelulares depende de la fosforilación y la posterior degradación de I $\kappa$ B por parte de las I $\kappa$ B quinasas (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$  o NEMO). La activación de estas I $\kappa$ B quinasas está regulada, entre otros, por la fosforilación de miembros de las quinasas de la familia de las proteínas activadas por mitógenos (MAPKKK). Una vez que el NF $\kappa$ B queda libre, se dirige al núcleo para modular la transcripción de los correspondientes genes diana en linfocitos, monocitos y células epiteliales.

Se han descrito hasta el momento tres mecanismos principales implicados en la activación de este factor de transcripción (Figura 3); la vía clásica, la vía no clásica, y una tercera vía atípica que se induce por agentes que dañan el DNA como las especies reactivas del oxígeno (ROS), radiación ultravioleta (UV), etc.

#### *La vía clásica de activación de NF $\kappa$ B*

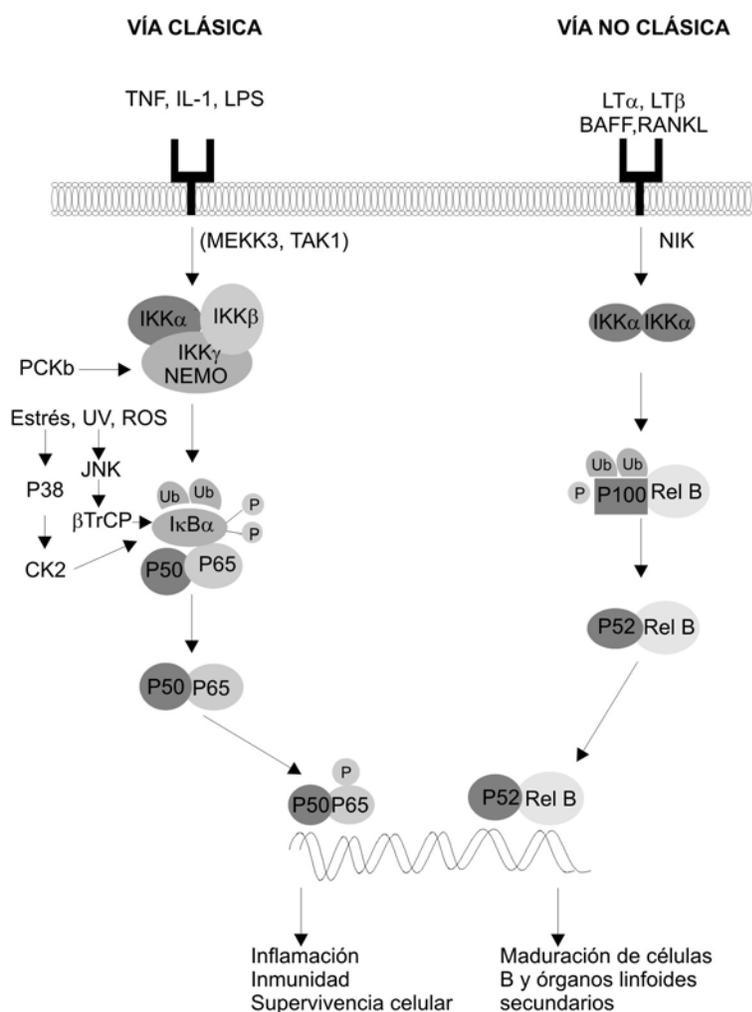
El paso determinante en esta vía es la activación de las quinasas IKK que fosforilan a I $\kappa$ B $\alpha$  promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación, permitiendo así la entrada al núcleo del dímero libre. Esta vía es dependiente de IKK $\beta$  y NEMO. El papel de IKK $\alpha$  en la vía clásica no se conoce bien. Estudios recientes indican que parece intervenir regulando la transcripción mediante la modificación del estado de fosforilación de las histonas (Hayden y Ghosh, 2004).

#### *Vía no clásica de activación de NF $\kappa$ B*

Esta vía se da principalmente en células B, y tiene como resultado la transcripción de genes involucrados en el desarrollo y mantenimiento de los órganos linfoides secundarios. Este mecanismo depende únicamente de la subunidad IKK $\alpha$ , puede ocurrir

en ausencia de IKK $\beta$  o NEMO. Conduce al procesamiento de la proteína p100, tras el cual se produce la liberación de p52. Los dímeros formados son p52-RelB y p50/RelB.

La vía clásica produce rápidamente la síntesis de I $\kappa$ B $\alpha$ , que hace que NF $\kappa$ B se separe del DNA. La vía no clásica, por el contrario, induce una respuesta más sostenida, aunque más lenta (Muller y Siebenlist, 2003).



**Figura 3.** Vías clásica y no clásica de activación del NF $\kappa$ B.

*Otros mecanismos de activación NFκB*

NFκB puede activarse como consecuencia de estímulos que producen daño en el DNA, radiación UV y radicales libres. En este caso no hay intervención de las IKK quinasas. La IκBα se fosforila por un mecanismo dependiente de las MAP quinasas p38 o JNK, dependiendo del tipo celular. Las MAPK activadas se translocan al núcleo, donde fosforilan a varios factores de transcripción como c-Myc, c-Jun o NFκB, aunque también se ha descrito la presencia de estas proteínas activadas en el citoplasma (Roux y Blenis, 2004).

En los últimos años se ha demostrado que la actividad de NFκB se encuentra aumentada en pacientes con CU y EC (Schreiber et al., 1998), pero en diferentes tipos celulares (en células de la *lamina propria* en la EC y en células epiteliales en la CU). En las células epiteliales este factor de transcripción se ha descrito como un importante regulador de la producción de IL-8 e ICAM 1 (Wang et al., 2003).

En la actualidad el tratamiento de la EC está basado en el uso de sulfazalazina y glucocorticoides, dos conocidos inhibidores del NFκB (Thiele et al., 1999; Weber et al., 2000). Dada la implicación de NFκB en numerosos fenómenos celulares, es lógico pensar que su inhibición sea también causante de efectos adversos. De hecho, la ausencia de p65 en ratones produce la muerte a los 15-16 días de gestación. Los ratones que carecen de p50 no experimentan fallos en su desarrollo, pero sí en su respuesta inmunológica (Rogler G, 2003). De estas observaciones se puede concluir que un bloqueo sistémico de este factor de transcripción puede ser perjudicial, siendo preferible un bloqueo local. La administración intracolónica de oligonucleótidos anti-p65 en un modelo experimental de colitis produjo una disminución de los niveles de IL-1, TNF e IL-6 en la mucosa, así como una mejora desde el punto de vista clínico e histológico (Murano et al., 2000). Un estudio piloto en humanos administrando oligonucleótidos antisentido frente a p65 en forma de enema ha proporcionado buenos resultados en el tratamiento de CU y EC (Hibi et al., 2003). Además de los fármacos clásicos utilizados

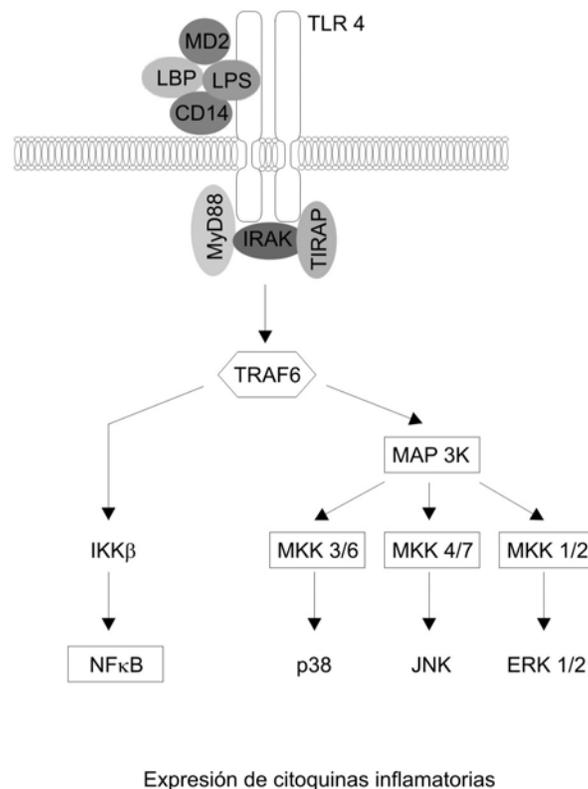
en el tratamiento de la EII, que inhiben la activación del NFκB, al menos en parte, existen otras moléculas que forman parte de la dieta, como el butirato (Segain et al., 2000) o flavonoides como la curcumina (Jobin et al., 1999) o la quercetina (Comalada et al., 2005) que son capaces de regular su actividad en la mucosa intestinal.

## LPS

Una de las hipótesis más extendidas sobre la causa de la EII es que ésta se produce como consecuencia de una alteración en la regulación del sistema inmunológico, de manera que se genera una reacción exacerbada frente a un antígeno del lumen intestinal que persiste en el tiempo, hasta hacerse crónica. El lipopolisacárido bacteriano tiene un papel potencialmente importante en la activación de esta respuesta inmunológica, puesto que la mucosa del intestino se encuentra en contacto directo con las bacterias de la flora. El lipopolisacárido es el componente mayoritario de la membrana de bacterias Gram-negativas y las hace ser reconocidas inmediatamente por el sistema inmunológico. Los receptores Toll (TLRs) se encargan del reconocimiento de éste y otros componentes bacterianos, protegiendo a la mucosa ante posibles infecciones. Se ha descrito que determinadas mutaciones en los TLRs pueden provocar una alteración en el reconocimiento de patógenos, un cambio en la capacidad del organismo para desarrollar tolerancia frente a la flora bacteriana propia, o ambos (Abreu et al., 2005). Estudios clínicos sugieren que la sobreexpresión de ciertos TLRs y/o la deficiente expresión de antagonistas de los mismos pueden ser los responsables de una reacción inadecuada frente a la flora bacteriana del intestino. Así, se ha demostrado que la expresión de TLR4 se encuentra aumentada en la mucosa colónica de pacientes con CU y EC, y se han asociado mutaciones descritas en este gen (Asp299Gly y Thr399Ile) con el desarrollo de ambas enfermedades (Harris et al., 2006).

La respuesta del organismo frente al LPS incluye la expresión de una gran variedad de citoquinas como el TNF, el IFN $\gamma$ , así como otros mediadores proinflamatorios. Existe una gran variedad de células involucradas en el proceso inflamatorio que responden al

LPS, como los monocitos, macrófagos, las células epiteliales, los neutrófilos y las células dendríticas, entre otras. En macrófagos, el LPS induce la síntesis de citoquinas tales como el TNF, TGF $\beta$ , las interleuquinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12, metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) y otros lípidos bioactivos como el PAF, enzimas inducibles como la COX-2 o la iNOS y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.



**Figura 4.** Transducción de señal del LPS a través del receptor TLR4.

La primera proteína involucrada en el reconocimiento del LPS es la LBP (proteína de unión al LPS) (Schumann et al., 1990). El papel de la LBP consiste en acoplar el LPS al CD14, presente en la membrana de células inflamatorias (monocitos/macrófagos y granulocitos, pero no linfocitos), facilitando así la unión del LPS a su receptor TLR-4, que a su vez se encuentra unido a la proteína MD-2 (Hailman et al., 1994) (Figura 4) .

El papel del CD14 en la señalización del TLR-4 consiste en unirse al LPS y presentarlo al complejo TLR-4/MD-2. MD-2 actúa como un adaptador extracelular en la activación del TLR-4 por LPS y es esencial para que se produzca activación, puesto que los ratones knockout para MD-2 no responden al LPS (Nagai et al., 2002).

Tras la unión del LPS a su receptor, éste inicia una cascada en el interior de la célula que transmite la señal hasta el núcleo, provocando una respuesta celular. Las vías de transducción activadas son numerosas, entre ellas MAP quinasas, PKC y PKA, que conducen a la activación de NFκB, entre otros. En esta vía, la unión del LPS al receptor de la superficie celular atrae varias moléculas de señalización, entre las que se encuentran MyD88 e IRAK (quinasa asociada al receptor de IL-1). Estas proteínas poseen *dominios de muerte* e IRAK un dominio de proteína quinasa que provoca su autofosforilación y la posterior activación de TRAF-6 (factor asociado al receptor de TNF-6) (Palsson-McDermott y O'Neill, 2004). TRAF-6 activa a continuación la cascada de la quinasa que fosforila a IκB, lo que da lugar, como hemos apuntado en el apartado anterior, a la activación de NFκB, aunque en macrófagos se ha demostrado que existen otras vías, como las MAP quinasas con un papel más importante en la respuesta al LPS.

La comprensión de la patogenia de la EC y CU ha progresado considerablemente en la última década. La combinación de alteraciones del sistema inmune, diversos factores genéticos predisponentes, y una variedad de factores ambientales pueden ser necesarios para inducir lo que conocemos clínicamente como EII. Es probable que sean numerosos los agentes capaces de iniciar una respuesta inmune en el intestino, y que los factores genéticos sean los determinantes de la aparición de daño tisular. En los próximos años una caracterización más completa de las moléculas implicadas en la patogenia de la inflamación intestinal y de su relación funcional probablemente nos ayudará a identificar elementos claves en la regulación de la respuesta inmune intestinal y abrirá la posibilidad de diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas más específicas y potentes.

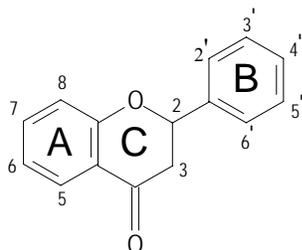
## **2. Flavonoides**

### **2. 1. Estructura química**

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común compuesto por dos anillos bencénicos (A y B) ligados a través de una unidad de tres carbonos que constituye un anillo heterocíclico (C). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 1 al 8, y los del anillo B desde el 1' al 6' (Figura 5). La clasificación de los distintos flavonoides se basa en la presencia o ausencia de un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C, la presencia o ausencia de un doble enlace en 2-3 del anillo C, y la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B (Figura 6). En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, o flavan-3-oles, como la catequina, con un grupo hidroxilo en posición 3.
2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4, un grupo hidroxilo en posición 3 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, apigenina, luteolina y crisina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, pero carecen del grupo hidroxilo en posición 3.
4. Isoflavonas, como la genisteína y la daidzeína, que poseen el anillo B en posición 3 (iso).
5. Flavanonas, como la hesperetina, que carecen de doble enlace entre los carbonos 2 y 3.

6. Antocianidinas, que tienen un hidroxilo en posición 3 y además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.



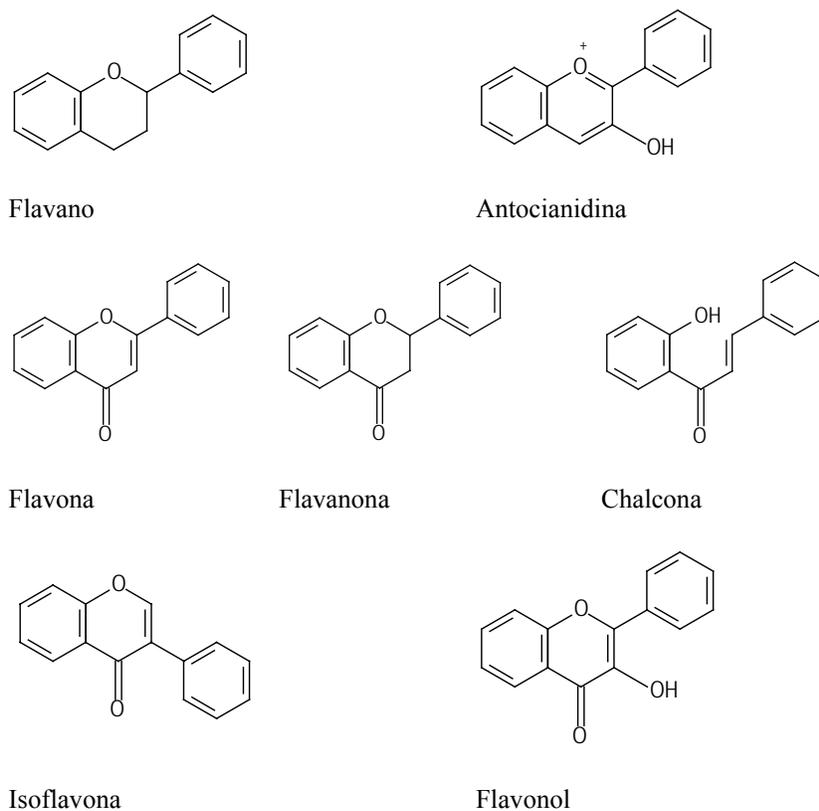
**Figura 5.** Estructura y numeración de los flavonoides

Las diferentes modificaciones químicas que pueden darse en cada uno de los grupos, como hidrogenaciones, hidroxilaciones, sulfuraciones, metilaciones, acilaciones y glicosilaciones, dan lugar a la enorme diversidad de flavonoides que se encuentran en la naturaleza. Se han identificado unos 4500 flavonoides de origen vegetal, pero este número sigue aumentando en la actualidad.

## 2. 2. Distribución

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en la cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual. Se encuentran también en extractos de plantas como el arándano, ginkgo biloba y cardo mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas, reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Además, los flavonoides tienen propiedades antifúngicas y bactericidas, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización, y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Formica y Regelson, 1995). Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas, flores y frutos, aunque también los podemos encontrar en las raíces y el tallo.

La mayoría de los flavonoides se encuentran en forma de heterósidos, y entre los azúcares que forman parte de su estructura se incluyen la D-glucosa, la L-ramnosa, la glucoramnosa, la galactosa y la arabinosa. La presencia generalizada de los flavonoides en los alimentos implica su consumo regular en una dieta normal (Hertog et al., 1993), aunque la cantidad diaria varía dependiendo de los hábitos dietéticos de una población determinada. Recientemente, Noroozi (2000) y colaboradores han establecido que la ingesta media de flavonoles es de aproximadamente 35 mg por día, de los que el 91% es quercetina.



**Figura 6.** Clasificación de los flavonoides.

### 2. 3. Metabolismo y absorción

Los flavonoides sufren una intensa metabolización y se excretan en buena medida en la orina. Inicialmente se pensaba que sólo las geninas eran capaces de atravesar la pared intestinal, puesto que se consideraba que muchas especies de mamíferos, incluido el hombre, carecen de las enzimas necesarias para romper los enlaces  $\beta$ -glucosídicos de los heterósidos. Este proceso podía llevarse a cabo gracias a que las bacterias de la flora intestinal, preferentemente del colon, sí poseen estas glucosidasas (Kuhnau, 1976). No obstante, estudios recientes han demostrado la capacidad de algunas  $\beta$ -glucosidasas presentes en la membrana de borde en cepillo del intestino delgado de los mamíferos para hidrolizar distintos heterósidos de flavonoles e isoflavonas (Day y Williamson, 1999).

La transformación de los flavonoides tiene lugar principalmente en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares. En las reacciones de fase II, la conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos o glicina parece tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina (Rowland M, 1995).

Para evaluar los efectos biológicos de los flavonoides, un aspecto importante a considerar es la biodisponibilidad. Los polifenoles sufren importantes alteraciones durante el metabolismo de primer paso, de forma que las moléculas que alcanzan el torrente circulatorio y los tejidos son diferentes de las que originariamente se encuentran en los alimentos, lo que afecta a la biodisponibilidad. Las moléculas resultantes son en su mayoría glucuronatos y sulfatos, con o sin metilaciones en el grupo catecol, y muchos están conjugados de forma múltiple. El intestino delgado parece ser el principal órgano responsable de la glucuronización, pero también juega un papel importante en la metilación. Los productos que alcanzan la vena portal son glucurónidos y metilglucurónidos. Los flavonoides que son absorbidos se distribuyen por el organismo

fijados a proteínas plasmáticas como la albúmina en una elevada proporción (Boulton et al., 1998).

#### 2. 4. Acciones farmacológicas

Los flavonoides poseen una elevada afinidad para unirse a proteínas y otras macromoléculas biológicas (hormonas, ácidos nucleicos), así como iones metálicos, además de presentar una gran capacidad para catalizar el transporte de electrones y captar radicales libres (Martinez-Florez et al., 2002). Estas propiedades pueden dar lugar a efectos fisiológicos muy diversos, aunque muchos de ellos sólo han podido ser puestos de manifiesto en ensayos *in vitro*. Todos estos posibles efectos hacen de los flavonoides un grupo de sustancias con un importante potencial terapéutico, especialmente por sus propiedades antioxidantes. Por las mismas razones ha aumentado su interés en tanto que son componentes de los alimentos y en particular su aplicación como parte de alimentos funcionales.

Se han descrito efectos protectores de estos compuestos en enfermedades como la diabetes mellitus, el cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal y procesos inflamatorios (Saskia ABE et al., 1998). Numerosos estudios describen los distintos efectos biológicos que se les atribuyen, incluyendo la actividad antibacteriana (Havsteen, 1983), antiviral (Amoros et al., 1992), antiinflamatoria (Moroney et al., 1988; Emim et al., 1994), espasmolítica (Capasso et al., 1991), antiulcerosa (Batista et al., 2004), vasodilatadora (Duarte et al., 1993a; Duarte et al., 1993b) antiagregante plaquetaria (Landolfi et al., 1984; Gryglewski et al., 1987), citotóxica (Edwards et al., 1979; Cushman y Nagarathnam, 1991), antitumoral (Virgili et al., 2004) y estrogénica (Hong et al., 2004).

#### Actividad antioxidante

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo y poseen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de

transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Además, los flavonoides se comportan como captadores de radicales libres (scavengers). Por todo ello desempeñan un papel importante en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo. Sus propiedades antirradicalarias se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (Pace-Asciak et al., 1995).

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides (Bors et al., 1990) son:

1. Presencia de un grupo hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B, que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.

2. Doble enlace entre los carbonos 2 y 3, en conjunción con el grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C, responsable de la deslocalización de electrones desde el anillo B.

3. Presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 junto con un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C.

De acuerdo a estos criterios, el flavonoide quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante. Los flavonoides captan el oxígeno activo especialmente en forma de anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. Para ello, un átomo de hidrógeno del flavonoide se transfiere al radical potencialmente lesivo, originándose un radical libre derivado del flavonoide que es más estable que el radical que lo genera. De esta manera bloquean la acción nociva de dichas sustancias sobre las células. Diversos flavonoides han mostrado ser eficaces en la inhibición de los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de homogenados de cerebro (Ursini et al., 1994; Laughton et al., 1989). Asimismo, se ha

comprobado su potente capacidad para inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoproteins, LDL) por los macrófagos y reducir por tanto su citotoxicidad (Hirano et al., 2001; Terao et al., 2001). También se ha puesto de manifiesto que la quercetina inhibe la peroxidación lipídica producida por hierro en homogenados de mucosa intestinal (Murota et al., 2004). Por otra parte, algunos flavonoides como la quercetina y el kanferol pueden presentar un mecanismo antioxidante directo mediante el control de las concentraciones intracelulares de glutatión. Son capaces de aumentar los niveles en un 50%, induciendo el sistema antioxidante celular y contribuyendo así a la prevención de enfermedades (Myhrstad et al., 2002). Tanto la quercetina como la silimarina (extracto de las semillas de cardo mariano consistente en una mezcla de tres flavonoides: silibina, silidianina y silicristina) son capaces de incrementar el contenido intestinal de glutatión cuando se administran a ratas normales por vía oral, protegiendo el intestino del daño de tipo lipoperoxidativo que puede generarse cuando existe una superproducción de radicales libres (Valenzuela et al., 1989; Gálvez et al., 1994).

No obstante, las mismas propiedades que caracterizan la actividad antioxidante de los flavonoides determinan que puedan presentar efectos prooxidantes. Los mecanismos moleculares implicados se basan en la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide-hierro redox lábil. En el primer caso, la autooxidación del radical aroxilo genera un anión superóxido ( $O_2^-$ ) que da lugar a su vez al dañino radical hidroxilo ( $HO^\cdot$ ). Estos mecanismos pueden constituir la base de las acciones mutagénicas y citotóxicas descritas para algunos flavonoides (Hodnick et al., 1988). Éstas estarían por tanto asociadas de forma insoluble a sus efectos antioxidantes, de forma que nunca puede descartarse su aparición, especialmente cuando las dosis de flavonoides utilizadas son muy altas (da Silva et al., 2002).

#### Efectos cardiovasculares

Las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (Geleijnse et al., 2002). Los mecanismos

propuestos para explicar los efectos protectores cardiovasculares de los flavonoides son: (1) efectos antiaterogénicos, (2) inhibición de la agregación plaquetaria, (3) efectos vasodilatadores y (4) propiedades antihipertensivas. En ratas se ha podido observar que la quercetina produce un efecto vasodilatador en aorta aislada de rata mediado por la inhibición de la proteína quinasa C (Duarte et al., 1993b). La quercetina previene la hipertrofia en células del músculo liso vascular inducida por angiotensina II a través del bloqueo de la vía del factor de transcripción AP-1 y de la inhibición de JNK (Kyaw et al., 2004), ambos implicados en la transducción de señal de numerosos procesos de transformación celular.

Además, los flavonoides evitan el daño producido en el endotelio vascular al prevenir la superproducción de mediadores inflamatorios como IL-8 e ICAM 1, inducidos por la citoquina proinflamatoria TNF (Wang y Mazza, 2002).

#### Actividad anticancerosa

Existen numerosos estudios que relacionan el consumo diario de té y verduras con un menor riesgo de padecer cáncer. Los flavonoides podrían estar implicados en el efecto preventivo de estos alimentos. Concretamente, la baja incidencia de cáncer de próstata y de mama en países asiáticos se ha atribuido al alto consumo de té y soja que se da en estos países (Barnes, 1995; Messina y Bennink, 1998). Aunque existen estudios que han confirmado el papel protector de los flavonoides frente al cáncer (Knekt et al., 1997; Stefani et al., 1999), existe controversia en este sentido, puesto que hay otros que muestran lo contrario (Hollman y Katan, 1999).

La mayoría de los datos de los que se dispone acerca de la actividad anticancerosa de los flavonoides proceden de estudios realizados en modelos animales y en líneas celulares. Los mecanismos de acción propuestos como responsables de la actividad antitumoral de estos compuestos son:

*Actividad antioxidante/antimutagénica.* Las propiedades anticancerosas de los flavonoides se pueden atribuir a su potente acción antioxidante, ya que el estrés oxidativo puede originar alteraciones en el ADN que den lugar a mutaciones. Otro mecanismo implicado en la actividad antitumoral es la capacidad de los flavonoides para inhibir la activación metabólica de carcinógenos alimentarios tales como el benzo[ $\alpha$ ]pireno, la 2-amino-3-metilimidazol [4,5-f] quinolona o la aflatoxina B1 (Alldrick et al., 1986; Buening et al., 1981; Matsukawa et al., 1993). Activan enzimas detoxificantes como la NADPH quinona reductasa (Wang et al., 1998) o la glutatión-S-transferasa (Ito, 1992), protegen frente a la formación de especies reactivas del nitrógeno mediante la inhibición de la iNOS (Chan et al., 1997) y algunos como la miricetina son capaces de estimular la reparación del ADN a través de la activación de la ADN polimerasa  $\beta$  en hepatocitos (Abalea et al., 1999).

*Inhibición de enzimas involucradas en la transducción de señal.* Existen enzimas como la proteína quinasa C, la fosfatidilinositol-3-quinasa y las tirosín quinasa, que se encuentran activadas en procesos cancerosos. Flavonoides como la quercetina o la genisteína son capaces de inhibir las tirosín quinasa.

*Modulación del ciclo celular.* Algunos flavonoides, como la quercetina (Choi et al., 1998; Constantinou et al., 1995), son capaces de inhibir las topoisomerasas involucradas en la replicación del ADN. Los flavonoides también han mostrado cierto efecto inductor en la expresión de genes supresores de tumores como el gen p53 o p21 (Plaumann et al., 1996).

#### Actividad antiinflamatoria

Es bien conocida la relación existente entre el estrés oxidativo y las enfermedades inflamatorias (Herencia et al., 2001). La reacción inflamatoria se caracteriza por la hiperproducción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, agentes oxidantes que pueden desencadenar por sí solos una respuesta inflamatoria. Los antioxidantes como los flavonoides y extractos de plantas que los contienen en muchas ocasiones presentan a su

vez efecto antiinflamatorio. Éste se relaciona en parte con su actuación sobre las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico: ciclooxigenasa y lipooxigenasa (COX y LOX). En general, se ha demostrado que los flavonoides polihidroxilados inhiben preferentemente la enzima 5-LOX y los menos hidroxilados inhiben la COX. En cambio, *in vivo* pueden comportarse como inhibidores duales debido probablemente a la biotransformación que sufren en el organismo (Yoshimoto et al., 1983). Hay estudios que apuntan a un efecto inhibitor preferentemente de la COX por parte de las flavonas, mientras que los flavonoles parecen inhibir fundamentalmente a la LOX (Kim et al., 2004).

Algunos flavonoides afectan específicamente a la función de sistemas enzimáticos involucrados en los procesos inflamatorios, del tipo de las tirosín y serín-treonín proteín quinasas (Hunter, 1995). Estas enzimas se encuentran en diversos tipos celulares y están implicadas en la regulación del crecimiento y transformación celulares además de participar en la activación y transducción de señal en células del sistema inmunológico. Los flavonoides ejercen acciones de carácter antiinflamatorio sobre varios tipos celulares. Así, poseen un efecto modulador sobre la proliferación de linfocitos B y T cuando las células están activadas, y normalmente este efecto es de tipo inhibitor (Cerqueira et al., 2003); no obstante, existen estudios en los que ocurre lo contrario. Por ejemplo, la administración parenteral de silimarina a ratones produjo una supresión de la actividad de linfocitos T a la dosis de 10 mg/kg, mientras que el efecto fue el contrario a medida que las dosis se aumentaron (Johnson et al., 2003).

Los flavonoides también afectan a otras células de la inflamación, como los macrófagos y neutrófilos. Existen numerosos estudios que hablan de su papel inhibitor de la síntesis de mediadores proinflamatorios inducidos por el LPS o diversas citoquinas como el TNF o la IL-1 $\beta$  en macrófagos (Kim et al., 2004). Ueda y colaboradores (2004) mostraron que aunque *in vitro* varios flavonoides de los distintos grupos (luteolina, crisina, apigenina, quercetina, miricetina y taxifolina) son capaces de inhibir la producción de TNF en macrófagos estimulados con LPS, la estructura idónea para el mayor efecto

antiinflamatorio *in vivo* es la de 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona . En un estudio llevado a cabo en células RAW 264.7 los flavonoides apigenina, genisteína y kanferol inhibieron la síntesis de COX-2 inducida por LPS, presumiblemente a través de la inhibición de la fosforilación de I $\kappa$ B (Liang et al., 1999).

La capacidad de interferir con la vía de activación del NF $\kappa$ B fue previamente descrita para la quercetina, a través de un mecanismo de inhibición de la fosforilación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ , unida al NF $\kappa$ B en situación basal. Por su parte, un derivado de los polifenoles presentes en el té negro, el teaflavina-3,3'-digalato, ha mostrado una fuerte inhibición del NF $\kappa$ B en células RAW 267.4 estimuladas con LPS. Como consecuencia de esta actividad se produjo una reducción de la producción de NO y de la expresión de la propia proteína iNOS. A la misma concentración el teaflavina-3,3'-digalato inhibió a la IKK $\alpha$  (Pan et al., 2000). El resveratrol es otro inhibidor relativamente potente (5  $\mu$ M) de la activación de NF $\kappa$ B estimulado por TNF en diferentes tipos celulares, incluyendo U-937 (monocitos humanos) y Jurkat (linfocitos T humanos) (Manna et al., 2000). Este compuesto ha mostrado asimismo una acción inhibidora de la activación del factor de transcripción AP-1, c-Jun-quinasa y MAPK quinasa en células U-937 estimuladas con TNF.

Manthey et al. (2001) revisaron la capacidad de distintos flavonoides presentes en los cítricos para inhibir la expresión de TNF en monocitos humanos. Estos autores formularon la hipótesis de que, entre otros mecanismos, la capacidad manifestada por estos flavonoides de inhibir la actividad fosfodiesterasa podía estar relacionada con la inhibición en la producción de citoquinas. Xagorari et al. (2001) describieron que los flavonoides luteolina, 7-glucósido de luteolina, quercetina y genisteína inhiben la liberación de TNF e IL-6 en células RAW 267.4 estimuladas con LPS. Por otra parte, la luteolina, junto con la apigenina, inhibe la expresión de ICAM-1 en células del epitelio respiratorio estimuladas con TNF a través de la inhibición de p38, JNK y ERK, así como la actividad de IKK (Chen et al., 2004).

Los flavonoides tienen la propiedad de modificar la respuesta inmune y la inflamación a varios niveles. Hasta el momento, parece ser que los grupos que han mostrado más actividad son el de las flavonas y los flavonoles (Kim et al., 2004). No obstante, resulta difícil establecer unos requerimientos estructurales básicos para conseguir los mayores efectos beneficiosos.

### **3. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal**

Las enfermedades que se recogen bajo la denominación común de EII han sido objeto de intenso estudio por parte de la comunidad científica en los últimos años, pero su terapia sigue siendo insatisfactoria, asociándose con una elevada incidencia de reacciones adversas. Por este motivo, existe en la actualidad un gran interés en el desarrollo de nuevos agentes aplicables en el tratamiento de la EII que combinen eficacia con pocos efectos secundarios, que cambien el curso de la patología prolongando los períodos de remisión de los síntomas y que mejoren la calidad de vida del enfermo. Éste puede ser el caso de los flavonoides, compuestos que además de estar dotados de una baja toxicidad (Middleton et al., 2000), presentan unas características idóneas para ser considerados como compuestos antiinflamatorios aplicables en la EII.

El primer estudio que apuntó el potencial efecto beneficioso de los flavonoides en la EII fue realizado por Galsanov y colaboradores (1976). En él se describe la actividad antiinflamatoria presentada por la quercitrina, a las dosis de 25 y 100 mg/kg, en un modelo de inflamación intestinal de tipo alérgico en rata. Más recientemente se ha valorado la actividad de los flavonoides en varios modelos bien establecidos de inflamación intestinal en rata, como el modelo de colitis inducida por ácido acético, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y sulfato de dextrano sódico (DSS), que presentan algunas similitudes con la EII en humanos (Elson et al., 1995). Distintos flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria intestinal en estos modelos, incluyendo heterósidos como la quercitrina (Sánchez de Medina et al., 1996; Camuesco et al., 2004), la rutina (Gálvez et al., 1997; Cruz et al., 1998), la diosmina y la hesperidina (Crespo et al., 1999), y geninas como la morina (Ocete et al., 1998; Gálvez et al., 2001) o la silimarina (Cruz et al., 2001). Estos efectos se han puesto de manifiesto en las fases aguda y semicrónica del proceso inflamatorio intestinal. Así, los flavonoides previenen el daño colónico agudo cuando se administran antes del agente lesivo (ácido acético o TNBS), y facilitan la recuperación del tejido colónico dañado en la fase semicrónica de la inflamación cuando se inicia la administración del flavonoide una vez

inducido el daño. De todos los flavonoides ensayados hasta el momento la quercitrina es el más potente, al ejercer su actividad a las dosis de 1 y 5 mg/kg, mientras que el resto de los flavonoides ejercen su actividad antiinflamatoria intestinal en un rango de dosis entre 10 y 25 mg/kg, cuando se trata de los heterósidos, y entre 10 y 200 mg/kg con las geninas. Recientemente el dosmalfato, un compuesto derivado de la diosmina, ha mostrado ser efectivo en los modelos de colitis inducida por DSS (Villegas et al., 2003a) y TNBS (Villegas et al., 2003b) en ratones. La administración oral de un flavonoide sintético, el DA-6034 (7-carboximetoxi-3',4',5-trimetoxi flavona), en los modelos de colitis experimental inducidos por TNBS y ácido acético y el de colitis espontánea en ratas transgénicas HLA-B27, mostró que dicho flavonoide posee la misma eficacia que otros fármacos ampliamente utilizados en la EII, como son la prednisona y la sulfasalazina (Kim et al., 1999).

Se ha propuesto la participación de distintos mecanismos en la actividad antiinflamatoria intestinal de los flavonoides:

*Propiedades antioxidantes y/o antirradicalarias (mencionadas anteriormente).* Todos los flavonoides estudiados mejoran el estado de estrés oxidativo asociado al proceso inflamatorio intestinal inducido experimentalmente (Loguercio et al., 1996; Gálvez et al., 2000), ya que, o bien reducen la depleción de glutatión o disminuyen el contenido colónico de malonildialdehído (MDA), dos de los marcadores bioquímicos indicativos del grado de estrés oxidativo en el tejido intestinal. Este efecto puede considerarse de gran interés, dado que los radicales libres, incluyendo los derivados del oxígeno y los del nitrógeno, pueden desempeñar un papel importante en la etiopatogénesis de la EII en humanos (Kruidenier et al., 2003).

*Actuación sobre la síntesis del óxido nítrico (NO).* Es importante señalar el creciente interés que ha suscitado en la última década el NO en la patogénesis de la EII (Grisham et al., 1999). Es posible que los efectos farmacológicos de los flavonoides estén relacionados con el metabolismo del NO. En primer lugar, los flavonoides pueden preservar las funciones beneficiosas del NO, al captar directamente aniones superóxido

(Sichel et al., 1991) y por tanto impedir la interacción con el NO generado. Además, actúan como potentes captadores de radicales peroxinitrito (Haenen et al., 1997). En segundo lugar, los flavonoides son capaces de inhibir la expresión de la iNOS (Chan et al., 1997; Gálvez et al., 1997). En consecuencia, los flavonoides pueden prevenir los efectos perjudiciales generados por el NO en situaciones de inflamación intestinal. De hecho, se ha podido comprobar que el tratamiento de animales con colitis inducida con TNBS con morina se traduce en una disminución de la actividad de la NOS en explantes intestinales procedentes de estos animales (Gálvez et al., 2001).

*Inhibición de la actividad ciclooxigenasa, lipoxigenasa y reducción de la producción de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>).* Los leucotrienos son los metabolitos del ácido araquidónico formados por acción de la 5-LOX. Distintos estudios han postulado que el LTB<sub>4</sub> es un mediador inflamatorio con una importante función en la EII; de hecho, la inhibición de su síntesis (Bertran et al., 1996) o el bloqueo de su receptor (Fretland et al., 1990) se traduce en efectos beneficiosos en la colitis experimental. Aunque la mayoría de los flavonoides estudiados reducen la producción de LTB<sub>4</sub> colónico, no se ha podido dilucidar si existe una relación directa entre la reducción en los niveles colónicos del eicosanoide y el efecto antiinflamatorio intestinal (Sánchez de Medina et al., 1996; Ocete et al., 1998). El LTB<sub>4</sub> está implicado en la patología de la EII, dado que facilita la quimiotaxis de los neutrófilos, su adherencia y desgranulación en el colon inflamado (Fretland et al., 1990). Secundariamente, y como consecuencia de la activación del sistema NADPH oxidasa y de la acción posterior de la mieloperoxidasa (MPO), se generan cantidades masivas de superóxido y ácido hipocloroso, responsables de fenómenos de citotoxicidad directa en el tejido intestinal, lo que a su vez facilita la liberación adicional de distintos mediadores proinflamatorios (Yamada et al., 1991). De hecho, en la mayoría de los estudios realizados con flavonoides en modelos de colitis experimental se observa una reducción significativa en la actividad mieloperoxidasa colónica, enzima que se encuentra predominantemente en los gránulos azurofílicos de los neutrófilos y que es considerada como marcador sensible de la infiltración leucocitaria (Veljaca et al., 1995). En cualquier caso, es conveniente resaltar que la

inhibición de la lipoxigenasa no constituye, por sí sola, una diana terapéutica útil en la EII (Rask-Madsen et al., 1994).

*Inhibición de la producción de citoquinas.* El inicio de cualquier respuesta inmunológica requiere la síntesis de una gran variedad de proteínas efectoras. Hoy se conocen muchos de los mecanismos intracelulares implicados en la síntesis de estos mediadores, incluyendo como uno de los encargados últimos de esta cascada de eventos a los factores de transcripción, que se unen a las regiones promotoras de sus genes respectivos. Entre estas dianas se incluyen, en el caso de la EII, genes de moléculas de adhesión, citoquinas y quimioquinas, entre otros. En la mucosa inflamada de enfermos de CU y de EC se encuentra incrementada la síntesis de citoquinas proinflamatorias como el TNF, la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y la IL-8, (Monteleone et al., 2002) además de otros marcadores como iNOS y COX-2 (Bremner y Heinrich, 2002). El NF $\kappa$ B es uno de los factores de transcripción inducibles más importantes en los mamíferos y juega un papel crucial en la EII, puesto que regula la expresión de numerosos genes de citoquinas proinflamatorias, como las citadas anteriormente, y su actividad se encuentra aumentada en la mucosa inflamada de pacientes con enfermedad activa (Neurath et al., 1998). Por esta razón se considera al NF $\kappa$ B una diana terapéutica para el tratamiento de procesos inflamatorios, así como de algunos cánceres (Bours et al., 2000; Yamamoto y Gaynor, 2001).

Con relación a los estudios *in vivo*, hasta el momento, se ha descrito que el tratamiento con morina es capaz de inhibir la producción de IL-1 $\beta$  en la fase semicrónica de la inflamación intestinal inducida con TNBS (Gálvez et al., 2001). También se observó esta inhibición con la rutina en este mismo modelo de colitis realizado en ratones (Kwon et al., 2005) y con la quercitrina en el tratamiento de la colitis experimental inducida por DSS en ratas (Comalada et al., 2005). El tratamiento con quercitrina, además, redujo la actividad NF $\kappa$ B en la mucosa inflamada (Camuesco et al., 2004).

*Preservación de la función absortiva colónica.* La función absortiva colónica se encuentra profundamente alterada en la inflamación intestinal (Sánchez de Medina et al., 2002a; Yue et al., 1996) de forma que su restauración puede contribuir, conjuntamente con las acciones comentadas anteriormente, a los efectos beneficiosos manifestados por los flavonoides en los modelos de colitis experimental. Una alteración de la permeabilidad intestinal puede ser un factor desencadenante del proceso inflamatorio intestinal (Brandzaeg P et al., 1999), ya que un epitelio fácilmente permeable puede permitir la entrada en la *lamina propria* de antígenos bacterianos o procedentes de la dieta que no sean convenientemente anulados por el sistema inmune de la mucosa intestinal, pudiendo desencadenar una respuesta inflamatoria descontrolada. Se ha podido comprobar que la absorción colónica de fluidos *in vivo* se encuentra profundamente comprometida en diferentes modelos experimentales de inflamación intestinal, siendo una de las funciones que más tarda en recuperarse como consecuencia del proceso inflamatorio. Se ha descrito que se encuentra incluso alterada cuando la recuperación histológica es prácticamente completa (Asfaha et al., 2001). De los distintos flavonoides estudiados, la quercitrina (Sánchez de Medina et al., 1996), la rutina (Gálvez et al., 1997), la hesperidina (Crespo et al., 1999) y la morina (Ocete et al., 1998) han demostrado su capacidad de promover la mejora de la funcionalidad absortiva colónica en los animales colíticos. No obstante, únicamente la quercitrina fue capaz de restaurar completamente el transporte hidroelectrolítico colónico, lo que se tradujo en una reducción de la incidencia de diarrea, uno de los síntomas que caracterizan la inflamación intestinal, en comparación con el correspondiente grupo control (sin tratamiento con el flavonoide). Aunque es probable que la mejora en la funcionalidad colónica sea consecuencia, de la recuperación más rápida de la mucosa sometida al proceso inflamatorio, es probable que la quercitrina ejerza efectos moduladores directos sobre el epitelio intestinal (Sánchez de Medina et al., 1997; Sánchez de Medina et al., 1996). La capacidad de los flavonoides de actuar sobre el transporte hidroelectrolítico alterado permite justificar su actividad antidiarreica. La diarrea en la EII puede deberse a una alteración en el transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa y/o a una

alteración en la motilidad. Por tanto, el estudio de las acciones por las que los flavonoides ejercen el efecto antidiarreico se ha centrado en conocer cómo afectan a ambas funciones intestinales, las cuales se encuentran íntimamente relacionadas. Distintos ensayos *in vivo* han demostrado que los flavonoides inhiben la secreción y la motilidad intestinales, retrasando en consecuencia el tránsito intestinal y contrarrestando la acumulación de fluido en el lumen generado en presencia de compuestos secretagogos como el aceite de ricino (Rao et al., 1997; Di Carlo et al., 1993).

Es importante indicar que la mayoría de los estudios *in vitro* de motilidad se han llevado a cabo con la quercetina, que es el flavonoide mayoritario en la naturaleza. Además de sus efectos sobre las vías intracelulares mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula muscular lisa (Abdalla et al., 1989; Morales et al., 1994), otros mecanismos pueden también estar involucrados. En este sentido, la quercetina es capaz de inhibir la fosfodiesterasa de AMPc, generando un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, como se ha podido demostrar en otros tejidos (Beretz A, 1996; Kuppusamy y Das, 1992; Nikaido et al., 1982). Otro mecanismo que puede estar involucrado es la inhibición de la actividad de la protein quinasa C (PKC) (Ferriola et al., 1989), que se ha postulado que contribuye al efecto relajante de los flavonoides en otros tejidos, como el músculo liso vascular (Duarte et al., 1993b).

---

*Objetivo*



## OBJETIVO

El carácter incurable de la EII y las complicaciones secundarias que caracterizan a esta enfermedad hacen que la búsqueda de nuevas terapias más eficaces sea una prioridad para la comunidad científica en la actualidad. No existe por el momento ningún tratamiento curativo y los fármacos utilizados van dirigidos mayoritariamente a la inhibición de la respuesta inflamatoria de manera inespecífica, aunque hoy en día existen numerosos estudios encaminados al desarrollo de inhibidores específicos de mediadores como el TNF (Sands et al., 2004) o la IL-1 $\beta$  (Cohen et al., 2002) para mejorar el tratamiento de enfermedades crónicas de esta índole.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos con propiedades antiinflamatorias. Los estudios publicados hasta ahora apuntan a que sus efectos observados *in vivo* no se pueden atribuir a un solo mecanismo de acción, sino que probablemente actúan a muchos niveles del proceso inflamatorio. Así, además de su conocida capacidad antioxidante, se ha demostrado que inhiben enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides como la COX, y la transcripción de distintos genes proinflamatorios. Éstos parecen ser los mecanismos antiinflamatorios más importantes (Kim et al., 2004). Los trabajos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación desde el año 1996 han demostrado el éxito de los flavonoides en el tratamiento de animales con colitis experimental. En estos estudios se ha puesto de manifiesto el papel antioxidante e inmunomodulador de estos compuestos, pero no se han llegado a establecer los requerimientos estructurales que influyen en una mayor o menor actividad.

En esta tesis doctoral nos hemos propuesto abordar el estudio de la relación estructura-actividad de los flavonoides como agentes moduladores de la respuesta inflamatoria. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio del efecto de un grupo de flavonoides sobre:

- La secreción de IL-8 en células HT29, utilizadas como modelo de epitelio intestinal.
  - La secreción de mucinas y factores trébol en células HT29-MTX, utilizadas como modelo de células caliciformes.
  - La secreción de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 en células THP-1, utilizadas como modelo de monocitos humanos.
  - La secreción de IL-2 y proliferación celular en linfocitos murinos obtenidos del bazo.
  - La secreción de TNF, iNOS e IL-10 en macrófagos murinos derivados de la médula ósea.
2. Estudio del mecanismo de acción de los flavonoides, concretamente a nivel del factor de transcripción NF $\kappa$ B, en macrófagos murinos derivados de la médula ósea..
3. Estudio del efecto antiinflamatorio de la quercitrina en el modelo de colitis inducida con sulfato de dextrano (DSS) en ratas.



## *Metodología*



## METODOLOGÍA

### **1. Reactivos**

Todos los reactivos utilizados, excepto donde se indique, han sido proporcionados por SIGMA Chem. Co. (Barcelona).

### **1. Cultivos celulares**

Los cultivos celulares utilizados son de dos tipos: líneas celulares tumorales, entre las que se encuentran las células HT29, HT29-MTX y THP-1, y cultivos primarios, que son macrófagos derivados de la médula ósea y linfocitos obtenidos del bazo, ambos procedentes de ratones Balb/c.

#### **2. 1. Líneas tumorales**

Como modelo de epitelio intestinal se ha utilizado la línea celular de adenocarcinoma de colon humano grado II, HT29, obtenida del Servicio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Granada. Estas células se cultivan con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con L-glutamina (2 mM), penicilina/estreptomicina (50000 U/L), anfotericina B (2,5 mg/L) y 10% de suero bovino fetal inactivado (40 minutos a 56 °C). Al medio DMEM con esta composición le llamaremos en adelante DMEM completo.

Las células THP-1 constituyen una línea celular de monocitos humanos y también han sido obtenidas del Servicio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Granada. Se cultivan en medio RPMI suplementado con L-glutamina (2 mM), penicilina/estreptomicina (50000 U/L), anfotericina B (2,5 mg/L), 2-mercaptoetanol (0,05 mM) y 10% de suero bovino fetal inactivado.

La línea HT29MTX, cedida por la Dra. Tecla Lesuffleur (INSERUM U505, Centre Recherches Biomédicales des Cordeliers, París, Francia), se ha utilizado como modelo

de células epiteliales secretoras de moco (Lesuffleur et al., 1990). Se cultivan en DMEM completo y se mantienen en un incubador a 37 °C y con una presión de CO<sub>2</sub> del 5%.

## 2. 2. Cultivos primarios

### Obtención y cultivo de macrófagos murinos derivados de médula ósea

Los macrófagos murinos se obtienen a partir de la médula ósea de los fémures y tibias de ratones Balb/c suministrados por el servicio de animales de laboratorio de la Universidad de Granada, como se ha descrito anteriormente (Celada et al., 1984). Los ratones, de 6 a 8 semanas, son sacrificados por dislocación cervical, se extraen los fémures y tibias liberándolos de la musculatura y se eluye la médula ósea con medio de cultivo DMEM. Para evitar los efectos de la variabilidad entre ratones, se recogen varias médulas óseas en una misma placa y se procede a su disgregación hasta conseguir una suspensión homogénea de células.

Las células obtenidas se cultivan en DMEM, suplementado con un 20% de suero bovino fetal inactivado y un 30% de medio condicionado para macrófagos (ver siguiente apartado). El cultivo de las células se lleva a cabo en un incubador a 37°C y con una presión de CO<sub>2</sub> del 5%. Al tercer día de cultivo ya se puede observar un cambio en la morfología celular y un aumento de la adherencia a la superficie de la placa debido a la diferenciación de los precursores de la médula ósea hacia la línea macrofágica. Las células se mantienen hasta llegar a un estado de subconfluencia (5-6 días), momento en que se sustituye el medio de cultivo por medio DMEM suplementado con suero bovino fetal, pero sin el factor de crecimiento de macrófagos (M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor). Al cabo de 16-18 horas se llevan a cabo los distintos experimentos. Estas condiciones permiten la obtención de macrófagos quiescentes que, al ser estimulados con M-CSF, entran de forma sincronizada dentro del ciclo celular. Se mantienen las mismas condiciones en los experimentos destinados al estudio de la proliferación celular y de las vías de señalización, pero no en los estudios de viabilidad, secreción de citoquinas y en la determinación de la proteína iNOS. En estos casos, el

medio de cultivo utilizado hasta la recogida de muestra contiene un 20% de suero y un 30% de medio condicionado para macrófagos.

#### Obtención del medio condicionado para el cultivo de macrófagos

El M-CSF necesario para la diferenciación y proliferación de macrófagos murinos se obtiene a partir del sobrenadante del cultivo de fibroblastos de ratón de la línea celular L929 (ATCC CCL 1, NCTC clon 929). Estas células producen grandes cantidades de M-CSF, que es el único factor de crecimiento capaz de estimular la proliferación y diferenciación de los macrófagos. Por este motivo, el sobrenadante resultante del cultivo de las células L929 también recibe el nombre de medio condicionado para macrófagos. Las células L929 se siembran en placas de cultivo de 150 cm<sup>2</sup>, a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células por placa, y se cultivan en 40 ml de medio DMEM. El sobrenadante se recoge al cabo de 7 días, cuando las células alcanzan la confluencia. Se centrifuga el sobrenadante para eliminar las células en suspensión y se conserva en alícuotas a -20° C hasta el momento de su utilización. Los sobrenadantes pueden conservarse en estas condiciones durante más de 6 meses. Una vez descongeladas, las alícuotas se pueden mantener a 4° C para evitar la degradación del M-CSF producto de un exceso de ciclos de congelación-descongelación.

El contenido en M-CSF de los sobrenadantes de las células L929 fue previamente valorado mediante un ensayo de proliferación basado en la incorporación de [3H]-timidina en macrófagos de médula ósea de ratón y comparando con un estándar en el que se utilizó M-CSF recombinante. Mediante este ensayo se determinó que los niveles máximos de proliferación de los macrófagos se alcanzaban con un 30% del medio condicionado, lo que equivale a 900 U/ml de M-CSF recombinante.

#### Extracción de linfocitos murinos de bazo

Tras el sacrificio del ratón se procede a la extracción del bazo con cuidado de no romper la membrana externa que lo envuelve. En condiciones estériles, se coloca el bazo en una

placa de cultivo de 10 cm con 5 ml de medio DMEM suplementado con un 1% de mezcla antibiótica (penicilina/estreptomicina) y con ayuda de unas pinzas se presiona el bazo contra la propia placa hasta que el órgano queda transparente y todas las células que contiene quedan en el medio. A continuación, con ayuda de una jeringa y aguja estériles, se homogeneiza la suspensión de células y se pasa a un tubo de 15 ml. Se procede a una centrifugación de 5 minutos a 2000 G. El precipitado resultante se resuspende en 5 ml de tampón de lisis de hematíes (NH<sub>4</sub>Cl 0,17 M, KHCO<sub>3</sub> 0,012 M, EDTA 0,9 mM, pH 7,3) y se mantiene a 4 °C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se centrifuga la suspensión, que contiene principalmente linfocitos y macrófagos, a 2000 G durante 5 minutos. Se añaden 5 ml de medio DMEM completo al precipitado resultante y se lleva a cabo el recuento de las células obtenidas. A continuación se siembran en placas de cultivo de 24 pocillos a distinta densidad dependiendo del experimento a realizar.

### **3. Ensayos de viabilidad y proliferación celular**

#### **3. 1. Estudio de viabilidad celular por cristal violeta**

Esta técnica se utilizó para el estudio del efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de células adherentes. Para realizar dicho estudio, las células (HT29, HT29-MTX y BMDM) se siembran en placas de cultivo de 24 pocillos hasta alcanzar la confluencia y se exponen a las distintas concentraciones de los flavonoides a estudiar durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se lavan con PBS y se ponen en contacto con el colorante cristal violeta al 0.2% (p/v) en etanol al 2% durante 30 minutos. Se repiten los lavados necesarios para eliminar el exceso de colorante y se añade SDS al 1% (p/v). Las células se recogen en tubos Eppendorff, se centrifugan a 7000 G durante 5 minutos y se determina la absorbancia en el sobrenadante a 560 nm. Las células no viables no son capaces de incorporar el colorante en sus membranas, y por tanto será más tóxico aquel flavonoide cuya muestra tenga menos intensidad de color (Ishiyama et al., 1996). Los resultados se expresan como % de viabilidad con respecto a las células control (no tratadas).

### 3. 2. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa

La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) se determina como índice de toxicidad puesto que es liberada por las células lisadas. Se utilizó para medir el efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de las células THP-1, ya que en estas células no se puede llevar a cabo el ensayo de tinción con cristal violeta.

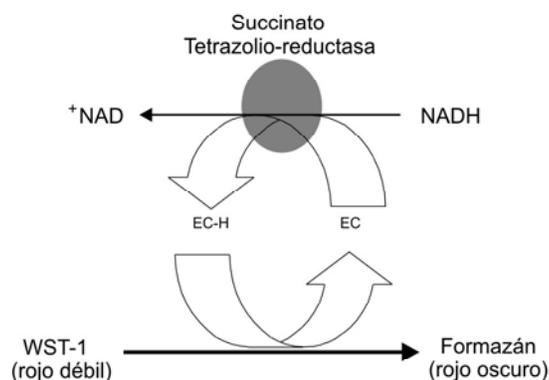
Las muestras, medio de cultivo recogido de las células cuya lisis se quiere monitorizar, se centrifugan a 3000 G durante 10 minutos a 4 °C. En una placa de 96 pocillos se añaden 30 µl de la muestra y 80 µl de β-NADH (1,45 mM) en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7,5). Tras incubar a 37 °C durante 5 minutos, se añaden 20 µl de piruvato sódico (25 mM) y se monitoriza la desaparición de β-NADH dependiente de piruvato. De la pendiente obtenida se resta la del ciego, que incorpora β-NADH y muestra, pero tampón en vez de piruvato. Los cálculos se realizan por interpolación en una curva patrón de LDH y los resultados se expresan como mU/ml.

### 3. 3. Estudio de viabilidad/proliferación celular con el reactivo WST-1

Esta técnica fue utilizada en la línea celular THP-1 y en los linfocitos de bazo. Consiste en una determinación colorimétrica de la actividad metabólica y de la proliferación celular. La sal soluble de tetrazolio (WST-1) pasa a formazán mediante la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células viables, produciéndose un cambio de color. A mayor proliferación, mayor actividad mitocondrial, que se traduce en una mayor hidrólisis del reactivo WST-1, dando una coloración que se detecta a 450 nm.

Para llevar a cabo la experiencia, las células se incuban en una placa de 96 pocillos ( $8 \times 10^4$  células/pocillo) con los flavonoides y el estímulo (LPS/PMA en THP-1 y concanavalina A en linfocitos) durante 24 horas en el primer caso y 48 en el segundo. Tras estos periodos de tiempo se añaden 5 µl/pocillo del reactivo WST-1 (Roche) y se mantienen durante 2 horas a 37 °C. La medida de la absorbancia a 450 nm se lleva a cabo agitando previamente la placa durante 1 minuto. Los resultados se expresan como

% de viabilidad (actividad de la deshidrogenasa mitocondrial) con respecto a las células control (no tratadas).



**Figura 7.** La acción de la Succinato Tetrazolio-reductasa

### 3. 4. Ensayos de incorporación de timidina marcada

Las células en proliferación incorporan ácidos nucleicos para formar DNA y RNA. Para cuantificar el ritmo de proliferación se añade timidina marcada al medio de cultivo, de tal forma que las células la incorporan en su DNA y así podemos valorar la proliferación en contacto con los flavonoides utilizados. El protocolo varía ligeramente según el tipo de células que se esté utilizando (adherentes o no). Los resultados se expresan como c.p.m. (cuentas por minuto).

#### Macrófagos procedentes de médula ósea

Los macrófagos se adhieren a la placa de cultivo para proliferar. Estas células se encuentran inicialmente proliferando en medio DMEM suplementado con 20% de suero y 30% de medio condicionado para macrófagos. Antes de llevar a cabo la experiencia, se detiene la proliferación de las células eliminando el factor de crecimiento del medio y

reduciendo la concentración de suero al 10%, de forma que las células permanecen en G<sub>1</sub> (fase del ciclo celular que transcurre entre la última división y el inicio de la síntesis de DNA, en la que la célula se ocupa de la replicación del material genético). Transcurridas 18 horas, las células se pasan a placas de 24 pocillos a una concentración de 10000 células por pocillo. Se espera el tiempo necesario para que se adhirieran a la placa (aproximadamente 2 horas) y a continuación se añaden los flavonoides objeto de estudio. Una hora después se aporta el medio condicionado para macrófagos en distintos porcentajes: 5%, 15% y 25%. Transcurridas 24 horas se añade la <sup>3</sup>[H]-timidina (0,001 µCi/ml). A las 4 horas se retira el medio y se fijan las células con metanol al 70% durante 30 minutos. A continuación se retira el metanol, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TCA al 10 % a 4°C y seguidamente se añade una mezcla de SDS 1% y NaOH 1 N. Después de 30 minutos agitando a temperatura ambiente se deposita el contenido de cada pocillo en un vial con 3 ml de líquido de centelleo para cuantificar en un contador de radiación β.

#### Linfocitos de bazo

Los linfocitos no se adhieren a la placa de cultivo, sino que permanecen en suspensión, por lo que el procedimiento es distinto al anterior. En una placa de 24 pocillos añadimos a cada pocillo 2,5 millones de células en 450 µl de medio, se añaden los flavonoides y la concanavalina A (5 µg/ml) e inmediatamente se añaden 50 µl a cada pozo de <sup>3</sup>H-timidina (0,001 µCi/ml). La razón por la cual añadimos los flavonoides junto con el estímulo y la timidina al mismo tiempo es porque, a diferencia de los macrófagos, los linfocitos tardan aproximadamente 24 horas en comenzar a proliferar. Transcurridas 48 horas, se pasan las células a tubos Eppendorf y se centrifugan durante 5 minutos a 2000 G. Seguidamente se realizan 2 lavados con TCA al 10%. En cada lavado centrifugamos durante 5 minutos a 2000 G. A continuación se añade la mezcla de SDS 1% en NaOH 1 N y se agitan las muestras 30 minutos a temperatura ambiente, tiempo en el cual se preparan los viales con 3 ml de líquido de centelleo a los que añadimos cada muestra para llevar a un contador β.

#### **4. Determinación de la secreción de citoquinas**

##### **4. 1. Determinación de la secreción de IL-8 en HT29**

Las células se siembran en placas de cultivos de 24 pocillos hasta que alcanzan la confluencia. Se estimulan con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* serotipo (055-B5) a distintas concentraciones (1, 5 y 10 µg/ml de medio de cultivo). Se recogen distintas muestras de medio transcurridas 12, 24 y 48 horas y se centrifugan a 7000 G durante 10 minutos para eliminar las células en suspensión. A continuación se congelan los sobrenadantes a -80° C hasta la determinación de IL-8, llevada a cabo por enzimoimmunoensayo (ELISA) (Biosource). Una vez determinados la concentración y el tiempo de estimulación ideales, se realiza el experimento con los distintos flavonoides a las concentraciones de 10, 30 y 100 µM, que se añaden al medio una hora antes de la estimulación con LPS. Los resultados se expresan como concentración de IL-8 (pg/ml).

##### **4. 2. Determinación de la secreción de IL-1β, TNF e IL-6 en células THP-1**

Las células se cultivan en placas de 24 pocillos a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml. Los flavonoides se añaden a las concentraciones finales indicadas (25, 50 y 100 µM) una hora antes de realizar la estimulación con LPS (1 µg/ml) y 12-miristato acetato de forbol (PMA, 1 µM). Previamente en nuestro laboratorio se determinó que el tiempo de incubación ideal para detectar el aumento de estas citoquinas es de 24 horas. Transcurrido este tiempo se retira el medio y se procede a su centrifugación para eliminar las células. En los sobrenadantes resultantes se llevan a cabo las determinaciones de las distintas citoquinas mediante kits de ELISA (Amersham Biosciences) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En el caso de no hacer las determinaciones al instante de la obtención de las muestras, éstas se mantienen a -80°C. Los resultados se expresan como concentración de la citoquina correspondiente (pg/ml).

#### 4. 3. Determinación de la secreción de TNF e IL-10 en macrófagos murinos

Los macrófagos se siembran en placas de 24 pocillos hasta alcanzar la confluencia. En ese momento se incuban con los distintos flavonoides durante 1 hora. En el caso del estudio del efecto de la quercetina resultante de la fermentación de su heterósido quercitrina en contacto con un homogenado de heces, las condiciones fueron las mismas. Transcurrido este tiempo se estimulan con LPS (10 ng/ml), y se recoge el medio de cultivo a las 24 horas para determinar la concentración de las distintas citoquinas por ELISA (Biosource). Los datos se expresan como concentración del mediador correspondiente (pg/ml).

#### 4. 4. Determinación de la secreción de IL-2 en linfocitos de bazo

Los linfocitos se siembran en placas de 24 pocillos a una concentración de 1,5 millones de células por ml. Se añaden los distintos productos y se estimulan con concanavalina A (5 µg/ml) durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se recogen las células y se centrifugan a 7000 G para extraer los sobrenadantes, que se congelan a -80°C hasta la determinación por ELISA de los niveles de IL-2 (Biosource). Los resultados se expresan como concentración de IL-2 (pg/ml).

### **5. Determinación de la expresión de iNOS e IκBα-P en macrófagos de ratón**

La determinación de estas dos proteínas se ha llevado a cabo por western blot. Las células se siembran en placas de cultivo de 10 cm (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y se incuban con los flavonoides durante una hora previamente a la estimulación con LPS (10 ng/ml). Transcurridas 6 horas en el caso de la determinación de iNOS y 10 minutos en el caso de IκBα-P, se eliminan los sobrenadantes y se recogen las células para llevar a cabo el análisis de las proteínas citadas.

## 5. 1. Obtención de muestras

### Obtención del lisado celular

Tras los tratamientos anteriormente descritos, cada placa de macrófagos se deposita sobre hielo con el fin de detener el metabolismo celular, así como la acción de las proteasas. Se elimina el medio de cultivo y se lavan las células con PBS frío. A continuación, las células se despegan de la placa con ayuda de una espátula y se procede a un proceso de lisado.

Las células son lisadas en hielo con solución de lisis (Hepes 20 mM a pH 7,5, EGTA 10 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 40 mM,  $MgCl_2$  25 mM, NP-40 1%, DTT 1 mM) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa: 1  $\mu$ g/ml de aprotinina, 1  $\mu$ g/ml de leupeptina, 1  $\mu$ g/ml de iodacetamida, ortovanadato sódico 2 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM. El lisado celular resultante se incubaba en un agitador orbital a 4°C durante 15 minutos. El material insoluble se elimina mediante centrifugación a 10000 G durante 5 minutos a 4°C. Se determina la concentración proteica mediante el método del ácido bicinchonínico, descrito en el apartado siguiente. En el caso de la determinación de iNOS en el tejido colónico, uno de los cortes longitudinales de colon se homogeneiza en el tampón citado utilizando un homogeneizador Heidolph. Los pasos siguientes son comunes.

### Determinación del contenido de proteínas. Método del ácido bicinchonínico

Para la determinación de proteínas se ha seguido la técnica descrita por Smith et al. (1985). Este método utiliza un colorante (ácido bicinchonínico, BCA) que se obtiene mezclando dos reactivos A y B en proporción 50:1 (v/v). El reactivo A consiste en una disolución acuosa de BCA (25,7 mM) en forma de sal sódica (ácido 4, 4'-dicarboxi-2, 2'-biquinolínico),  $Na_2CO_3 \cdot H_2O$  (0,16 M), tartrato sódico potásico (5,7 M), NaOH (0,1 M) y  $NaHCO_3$  (0,11 M) (pH 11,25). El reactivo B es una disolución acuosa al 40% de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ . El fundamento de la técnica se basa en la capacidad de algunos

aminoácidos y del enlace peptídico para reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . El reactivo BCA forma un complejo color púrpura con el  $\text{Cu}^{1+}$  en condiciones alcalinas, que presenta un máximo de absorbancia a 562 nm. Para realizar la determinación se añaden 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de coloración a 3  $\mu\text{l}$  del homogenado celular o colónico y tras incubarlo a 37 °C durante 30 minutos se procede a la lectura espectrofotométrica a 560 nm. El aumento de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteína de cada muestra. El cálculo del contenido de proteínas se realiza por interpolación en una curva patrón de albúmina sérica bovina fracción V.

## 5. 2. Western Blot

Una fracción de la proteína total de los lisados (65  $\mu\text{g}$  en el caso de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{-P}$  y 80  $\mu\text{g}$  en el caso de iNOS) es desnaturizada en tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,8, SDS al 2%, 2-mercaptoetanol al 0,7%, glicerol al 10%, azul de bromofenol) a 95°C, durante 5 minutos. A continuación, las proteínas se separan por electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% para la determinación de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{-P}$  y al 7% para la iNOS. Como indicador de pesos moleculares se utiliza una mezcla estándar de proteínas (8-220 kDa) previamente marcadas con un colorante.

Una vez finalizada la electroforesis, el contenido proteico del gel se transfiere a una membrana PVDF (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts) en el caso de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{-P}$  y de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience) en el caso de iNOS.

Después de la transferencia y con el objeto de bloquear los sitios de unión inespecífica, las membranas se incuban durante una hora y media a temperatura ambiente con una solución de bloqueo compuesta por leche desnatada en polvo al 5%. A continuación, las membranas se incuban con el anticuerpo primario, cuya dilución depende del tipo de anticuerpo (1:2500 para  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{-P}$  y 1:3000 para iNOS). Finalizada la incubación (aproximadamente 12 horas a 4°C), las membranas se lavan tres veces y se incuban con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. En ambos casos el anticuerpo secundario está conjugado a la enzima peroxidasa y se utiliza a una dilución

1:3000. Una vez finalizada la incubación se procede a la detección y cuantificación. Para ello se introduce la membrana en una mezcla de reactivos del kit de quimioluminiscencia (NEM, Zaventem, Bélgica), los cuales contienen el sustrato para la enzima peroxidasa. El análisis semicuantitativo de las bandas se realiza con el programa informático Scion Image (Scion Corporation, EEUU).

## **6. Determinación de mucinas en células HT29-MTX**

### **6. 1. Extracción y cuantificación de RNA total**

Las células HT29-MTX se cultivan en placas de 6 pocillos y se mantienen durante 2 semanas una vez alcanzada la confluencia, tiempo necesario para que estas células comiencen la secreción de moco. Transcurrido este tiempo se lleva a cabo el tratamiento con los flavonoides a la concentración final de 50  $\mu$ M durante 4 días. Durante este tiempo el medio que contiene los flavonoides se cambia una vez. Al finalizar este periodo se retira el medio de cultivo y se procede a la recogida de células con 1 ml de Trizol (Gibco) por pocillo. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se añaden 200  $\mu$ l de bromocloropropano a cada muestra y se centrifuga a 12000 G durante 15 minutos. La fase superior resultante contiene el RNA total. A dicha fracción de aproximadamente 0.5 ml se le añade la misma cantidad de isopropanol con la finalidad de precipitar el RNA. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente se procede a una centrifugación de 12000 G a 4°C. El precipitado resultante se lava con etanol al 75% y se deja secar. Por último, el RNA extraído se redisuelve en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para eliminar RNAsas, y se mantiene a -80°C hasta su posterior cuantificación y retrotranscripción.

### **6. 2. Determinación de la concentración de RNA**

La concentración de RNA se cuantifica espectrofotométricamente determinando la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm frente a un blanco de agua DEPC. La concentración de RNA se calcula con respecto al valor estándar de absorbancia a 260

nm que corresponde a 1 para una solución de 40 µg/ml de RNA. Asimismo se considera la ratio A260/A280 para estimar el grado de pureza de las muestras de forma que un valor superior a 1,9 se considera indicador de contaminación por DNA e inferior a 1,7 se considera indicativo de contaminación por proteínas y/o fenol.

### 6. 3. Separación de RNA mediante electroforesis

Este paso se ha realizado para comprobar la calidad del RNA extraído. Para llevar a cabo la electroforesis, se diluyen 5 µg de RNA hasta un volumen final de 10 µl y se les añaden 5 µl de tampón de carga (formamida desionizada 0.5%, formaldehído 6%, glicerol 0,13%, azul de bromofenol 0,013% en tampón MOPS/EDTA) y 1 µl de bromuro de etidio. Se desnaturalizan a 65°C durante 10 minutos y se separan en un gel de agarosa/formaldehído al 1,5%.

### 6. 4. Transcripción inversa

Mediante la retrotranscripción conseguimos sintetizar DNA complementario (cDNA) al RNA extraído a las células HT29-MTX mediante el uso de una transcriptasa inversa retroviral. Esta técnica se realiza mediante el uso de un kit comercial (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de DNA obtenido se mantienen a -20 °C hasta su amplificación.

### 6. 5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El cDNA resultante de la transcripción inversa se somete a una reacción de PCR con el fin de amplificar moléculas que contengan regiones homólogas a los oligonucleótidos de las mucinas a determinar. Las condiciones son diferentes según la mucina de que se trate en cada caso.

Las reacciones de amplificación se realizan en un volumen final de 25 µl. Se utilizan ciclos de número variable con 3 fases cada uno; una primera fase de desnaturalización, una segunda de hibridación, y una tercera de extensión. Transcurridos los ciclos

necesarios, las muestras se incuban durante 5 minutos a 72 °C para aumentar la eficiencia de la extensión del DNA.

La concentración de los cebadores en cada reacción es de 1 pmol/μl, la de los nucleótidos dNTPs es de 0,1 mM y se utilizan 5 unidades de Taq polimerasa. Como tampón de reacción hemos utilizado el suministrado por el fabricante (Amersham). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla :

**Tabla 1.** Oligonucleótidos HT29-MTX

Mucinas	Sentido	Antisentido
h 18S	5' GTAACCCGTTGAACCCATT	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG
h Muc-1	5' CGTCGTGGACATTGATGGTACC	5' GGTACCTCCTCTCACCTCCTCCA
h Muc-3	5' GCAAGTCAGTAACGAGCCTCAG	5' GGGGAAAGGATACAGGAATGA
h Muc-4	5' GTTCTTCGGCATCTTCTTTGGGG	5' CACCTTCCCTTTTCCAGTCTCCC
h Muc-5b	5' CATCGGCCCCATAACCACG	5' AGGCTGCATTCCACGACCTG
h TFF-1	5' GGCCACCATGGAGAACAAG	5' GTCAAAGTCAGAGCAGTCAATC
h TFF-3	5' GCTCTGCTGAGGAGTACGTGG	5' GGGGCTTGAAACACCAAGGC

#### 6. 6. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Las muestras de DNA amplificado mediante RT-PCR se mezclan con tampón de carga (glicerol al 30% (v/v), azul bromofenol-xileno cianol al 0,25 % (p/v)) y se cargan en los pocillos de un gel de agarosa al 2% en tampón TAE (Tris acetato 0,04 M, pH 8,0), EDTA 1 mM). Se procede a la electroforesis en gel a 70 V. Por último, se observan las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta y los geles se fotografian con una cámara Kodak DC120 y su paquete informático, suministrado por SIGMA. El análisis semicuantitativo de las bandas se realiza con el programa informático Scion Image (Scion Corporation, EEUU).

## **7. Determinación de los niveles de mRNA de IL-10 en macrófagos**

El protocolo es similar al del apartado anterior con algunas modificaciones. En este caso las células se sembraron en placas de 10 cm y estuvieron en contacto con los flavonoides y la sulfasalazina a las dosis indicadas durante 1 hora antes de añadir el LPS (10 ng/ml). Transcurridas 6 h se retira el medio de cultivo y se lleva a cabo la recogida de las células, la extracción del RNA, su cuantificación y posterior retrotranscripción de la misma forma que se ha explicado anteriormente. En este caso las condiciones de amplificación fueron diferentes; la concentración de los cebadores en cada reacción es de 1  $\mu$ M, la de los nucleótidos dNTPs es de 0,2 mM y se utiliza 1 unidad de Taq polimerasa. En la Tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados :

**Tabla 2.** Oligonucleótidos BMDM

	Sentido	Antisentido
r IL-10	5'- TCCTTAATGCAGGACTTTAAGGG	5'- GGTCTTGGAGCTTATTA AAAAT
r $\beta$ -actina	5'- TGGAATCCTGTGGCATCC	5'- AACGCAGCTCAGTAACAGTCC

## **8. Inducción de la colitis y determinación del daño colónico**

### **8. 1. Animales de experimentación**

Los animales utilizados en este estudio han sido ratas albinas hembra de la cepa Wistar con peso comprendido entre 180 y 200 g y suministradas por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los animales se mantienen en el estabulario del laboratorio durante 7 días antes de llevar a cabo el experimento, a una temperatura de 22 $\pm$ 2 °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas se alojan en cubetas de makrolon con lecho de viruta, dispuestas en estanterías de acero inoxidable, en grupos de 8 ratas. Se alimentan con una dieta estándar para roedores (Panlab A04). Estos estudios se han realizado de acuerdo con las directivas de la *Convención para la*

protección de los animales vertebrados usados en experimentación y con otros fines científicos establecidas por la Unión Europea (85/ETS123; 86/609/EEC).

## 8. 2. Diseño del experimento e inducción de la colitis

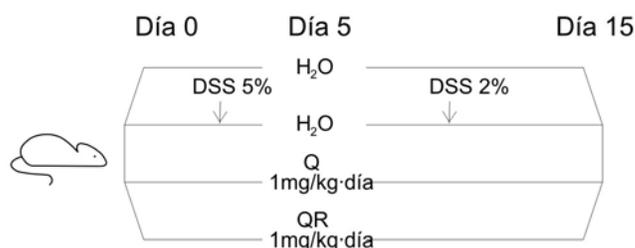
Los animales se disponen de manera aleatoria en 4 grupos:

Grupo control (C): no se les induce colitis ni reciben tratamiento alguno. Se sondan diariamente a partir del sexto día con agua.

Grupo colítico (DSS): se les induce la colitis pero no reciben tratamiento alguno. Se sondan diariamente a partir del sexto día con agua.

Grupo quercetina (Q): se les induce la colitis y son tratados con quercetina (1 mg/kg por día) a partir del sexto día.

Grupo quercitrina (QR): se les induce la colitis y son tratados con quercitrina (1 mg/kg por día) a partir del sexto día.



**Figura 8.** Diseño experimental. La primera línea corresponde al grupo de animales control no colíticos, la segunda al grupo de animales colíticos sin tratamiento; ambos recibieron 1 ml de agua vía oral a partir del día 5. La tercera (Q) y cuarta (QR) líneas corresponden a los animales tratados con quercetina y quercitrina, respectivamente.

El experimento duró un total de 15 días. La inducción de la colitis se lleva a cabo mediante la sustitución del agua de bebida por una solución de DSS al 5 % (p/v) en agua destilada durante 5 días. A partir del sexto día y hasta el día número 15 el porcentaje de DSS pasa a ser del 2 %. En este momento de reducción de la dosis de DSS se inicia el tratamiento con quercetina o quercitrina, que son administradas con una sonda oral disueltas en agua. A los animales control y colíticos sin tratamiento se les administra un volumen equivalente de agua. Durante el transcurso del experimento se registra diariamente el peso corporal de los animales y la existencia o no de diarrea y/o sangre en las heces. Dependiendo de estos factores, se asigna un valor al que llamamos índice de actividad de la enfermedad (IAE), según lo descrito por Cooper HS y colaboradores (Cooper et al., 1993) (Tabla 3). Este índice es valioso para evaluar la actividad y evolución de la enfermedad, así como la eficacia de los tratamientos farmacológicos. Una vez sacrificados los animales por dislocación cervical se les extrae el colon y se procede a la limpieza del mismo sobre una superficie fría, retirando los restos de grasa y las adhesiones mesentéricas. Se realizan cortes longitudinales para la determinación de mieloperoxidasa colónica, la enzima iNOS y las citoquinas TNF e IL-1 $\beta$ .

**Tabla 3.** Criterio de asignación del Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) en el modelo de colitis inducida por DSS.

Puntuación	Pérdida de Peso	Consistencia de las Heces	Sangrado Rectal
0	Ninguna	Normal	No
1	1-5%		
2	5-10%	Blandas	
3	10-20%		
4	>20%	Diarrea	Si

El valor del IAE es la suma de los tres parámetros dividido por tres (Cooper et al., 1993)

### 8. 3. Determinación de la actividad mieloperoxidasa colónica

Esta determinación se lleva a cabo por el método descrito por Krawisz et al. (1984). Esta enzima se utiliza como marcador de la infiltración de neutrófilos, aunque no es específico de estos fagocitos. Los fragmentos de colon se homogeneizan en una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 0,5 % (p/v) en tampón fosfato salino (50 mM, pH=6,0), con una dilución final de 1:20 (p/v) y con la ayuda de un homogeneizador Heidolph durante aproximadamente 45 segundos. Seguidamente, el homogenado se sonica durante 10 segundos y se somete a un triple proceso de congelación-descongelación que facilita la ruptura de estructuras celulares, favoreciendo la liberación de la enzima. Tras la última descongelación, el homogenado se centrifuga a 7000 G durante 10 minutos a 4° C y se procede a la medida de la actividad mieloperoxidasa (MPO), haciendo reaccionar el sobrenadante con un reactivo de coloración compuesto por clorhidrato de o-dianisidina y peróxido de hidrógeno en tampón fosfato (50 mM, pH=6,0). Se determina el incremento de absorbancia a 450 nm y la actividad MPO se calcula interpolando los datos obtenidos en una curva patrón de peroxidasa de rábano. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1  $\mu$ mol/minuto de peróxido de hidrógeno a 25°C. Los resultados se expresan como U/g tejido fresco.

### 8. 4. Determinación de IL-1 $\beta$ y TNF en el tejido colónico

Para la determinación de estos parámetros bioquímicos se realiza un procedimiento simple de extracción de forma inmediata (<1 h) a la obtención del órgano (McCafferty et al., 1992). Los fragmentos de colon se trocean con unas tijeras sobre una superficie fría durante 15 segundos y se incuban en tampón fosfato sódico (10 mM, pH=7.4) en proporción 1:5 (p/v) a 37°C durante 20 minutos con agitación constante. A continuación se centrifugan las muestras a 9000 G durante 5 minutos a 4°C y se congela el sobrenadante obtenido a -80°C. Para la determinación de la concentración de IL-1 $\beta$  y

TNF se utilizan kits comerciales de enzimoimmunoensayo (Amersham). Los resultados se expresan como pg/g de tejido.

#### 8. 5. Fermentación fecal de la quercitrina y análisis por HPLC

En primer lugar se diluyen 100 mg de heces en 1 ml de agua de peptona (Oxoid, Basinstoke, UK) junto con la quercitrina (10 mM). Se incuba la mezcla a 37 °C en condiciones anaerobias a distintos tiempos (1, 2, 4, 6, 24 h). A continuación, parte de las muestras se filtran utilizando un tamaño de poro de 0,22 µm para poder ser utilizadas en los ensayos *in vitro*. Otra parte se somete a un proceso de extracción utilizando metanol. La mezcla se agita durante 1 minuto en vortex y se centrifuga a 5000 G durante 5 minutos para analizar posteriormente por HPLC (High Performance Liquid Chromatography; cromatografía líquida de alta resolución) el contenido en quercetina y quercitrina.

#### **9. Estudio estadístico**

Todos los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  desviación estándar de la media. La significación estadística se determinó realizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test de significancia mínima (LSD). El umbral de significación se estableció en  $p < 0,05$ . Para es estudio de los datos no paramétricos se utilizó el test de Kruskal Wallis. El programa estadístico utilizado fue SigmaStat 2.0 (Jandel, San Rafael, California).



---

## *Resultados*



## RESULTADOS

### **1. Efecto de los flavonoides sobre la secreción de mediadores inflamatorios**

El objetivo principal de estos ensayos consistió en analizar el efecto de los flavonoides sobre la producción de distintos marcadores inflamatorios utilizando diferentes líneas celulares y cultivos primarios:

- Las células HT29 se han utilizado como modelo de epitelio intestinal y se ha determinado el efecto de los flavonoides sobre la producción de la quimioquina IL-8.
- Las células HT29-MTX constituyen un modelo de células caliciformes, productoras de moco. En estas células se ha determinado la influencia de los flavonoides en la síntesis de diversas mucinas como MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5b y factores trébol “trefoil factors” como el TFF-1 y TFF-3.
- Las células THP-1 constituyen una línea monocítica. En ellas se ha determinado el efecto de los flavonoides sobre la síntesis de las citoquinas proinflamatorias TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6.
- También se ha determinado el efecto de los flavonoides sobre la producción de TNF e IL-10 y sobre la expresión de iNOS en macrófagos murinos derivados de médula ósea. Además, estas células se utilizaron para profundizar en el estudio del mecanismo de acción por el cual los flavonoides inhiben la producción de las citoquinas estudiadas ya que, al ser un cultivo primario y no una línea celular establecida, se considera en general más representativo en cuanto a su comportamiento de la situación fisiológica.
- Por último, se determinó el efecto de los flavonoides sobre la síntesis de IL-2 en linfocitos murinos procedentes del bazo.

En todos los estudios *in vitro* se ha evaluado el efecto de los flavonoides sobre la viabilidad celular con el fin de comprobar si los efectos sobre las citoquinas se deben a

una actuación específica o son por el contrario derivados de un efecto lesivo sobre las células.

Los flavonoides escogidos para iniciar estos estudios fueron seleccionados por poseer distintas características estructurales que nos permitiesen establecer la relación estructura-actividad que determina su actividad antiinflamatoria. Dentro de los grupos escogidos, flavonoles y flavonas son los más abundantes.

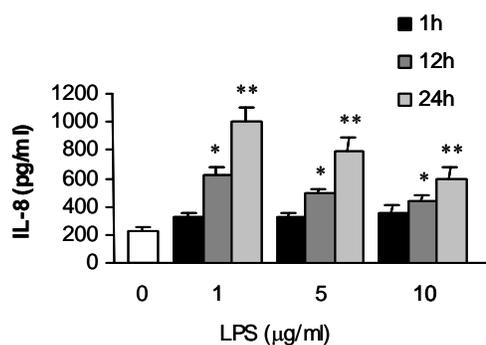
**Tabla 4.** Flavonoides seleccionados

<b>Flavonoles</b>	<b>Flavonas</b>	<b>Isoflavonas</b>	<b>Flavanonas</b>
Kanferol	Apigenina	Daidzeína	Hesperetina
Quercetina	Crisina	Genisteína	
	Diosmetina		
	Luteolina		

### 1. 1. Ensayos en líneas tumorales

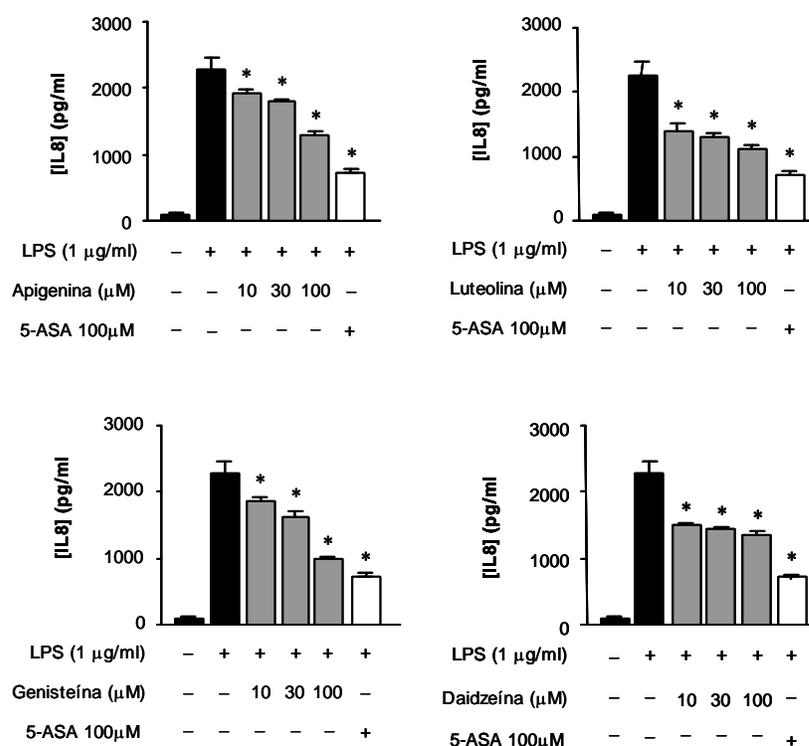
#### 1. 1. 1. Efecto de los flavonoides sobre la línea celular HT29

La IL-8 es una citoquina quimiotáctica que juega un importante papel en la respuesta inflamatoria, y, puesto que las células epiteliales intestinales constituyen una fuente fundamental de esta citoquina (McGee DW, 1999), hemos estudiado el papel de los flavonoides en la secreción de este mediador en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT29, utilizada como modelo de epitelio intestinal. En primer lugar se llevó a cabo la estimulación de las células a distintos tiempos y con diferentes concentraciones de LPS (1, 5 y 10 µg/ml) para determinar el momento y la concentración de LPS óptimos para realizar el experimento (Figura 9).



**Figura 9.** Secreción de IL8 en células HT29 estimuladas con LPS. Se utilizó LPS a distintas concentraciones (1, 5 y 10 µM) y a distintos tiempos (1, 12 y 24 horas). La IL8 se determinó en el medio de cultivo mediante ELISA. \*p<0,05, \*\*p<0,01 frente al control no estimulado.

Los resultados muestran que la mayor producción de IL-8 se obtuvo tras incubar las células durante 24 horas con 1 µg/ml de LPS, por lo que se utilizaron estas condiciones para los estudios posteriores.



**Figura 10.** Efecto de los flavonoides más activos sobre la secreción de IL-8 en células HT29 estimuladas con LPS (1 µg/ml) durante 24 horas. Todos los grupos son significativamente distintos del grupo no tratado, \*P<0,05 frente al control estimulado con LPS. La IL8 se determinó mediante ELISA en el medio de cultivo.

Los flavonoides más eficaces inhibiendo la producción de IL-8 fueron la genisteína, la daidzeína, la apigenina y la luteolina, alcanzando a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  una inhibición del 56,6, 46,4, 42,9 y 42,7%, respectivamente. El resto de los flavonoides ensayados no alcanzaron el 20% de inhibición a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  y el comportamiento no siguió un patrón concentración-dependiente. El 5-ASA se utilizó como fármaco control, ya que se ha descrito que inhibe la producción de IL-8 en células epiteliales de intestino (Bocker et al., 2003). Éste resultó más eficaz, presentando una inhibición del 89,6% a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 10).

Con el objetivo de descartar que el efecto podía ser debido a una posible toxicidad por parte de los flavonoides sobre estas células, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad mediante la técnica de tinción con cristal violeta. Transcurridas 24 horas de incubación de las células con los flavonoides, el vehículo (DMSO 0,1%) y 5-ASA a 50 y 100  $\mu\text{M}$ , no se observó un impacto significativo sobre la viabilidad de los colonocitos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efecto de los flavonoides más activos sobre la viabilidad de las células HT29. Técnica de tinción con cristal violeta.

	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	% Viabilidad
Control		100
DMSO		89,1 $\pm$ 7,4
Apigenina	50	110,9 $\pm$ 2,2
	100	113,0 $\pm$ 7,7
Luteolina	50	92,6 $\pm$ 3,6
	100	101,1 $\pm$ 8,4
Daidzeína	50	93,1 $\pm$ 0,3
	100	97,7 $\pm$ 9,5
Genisteína	50	98,3 $\pm$ 7,8
	100	106,6 $\pm$ 24,1

Los resultados se representan como la media  $\pm$  desviación estándar.  
No existen diferencias significativas

### 1. 1. 2. Efecto de los flavonoides sobre la producción de mucinas en la línea celular HT29-MTX

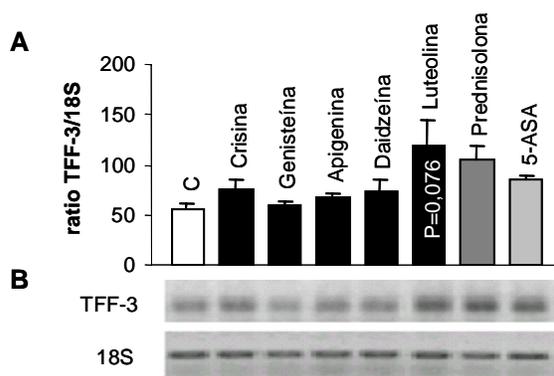
El epitelio intestinal, junto a la capa de moco a la que se encuentra asociado, constituye una barrera física entre bacterias y células del sistema inmune que juega un papel fundamental en la EII (Einerhand et al., 2002). Las mucinas son las principales constituyentes de esta barrera de moco que recubre el epitelio y su expresión puede verse alterada por productos bacterianos y por distintos mediadores de la inflamación. Una alteración de las mismas podría desembocar en una ruptura de la barrera epitelial o modificar las interacciones entre las bacterias y la mucosa.

Se ha demostrado que en la EII se encuentra alterada la expresión de MUC2 y MUC4. Concretamente la expresión de MUC2 disminuye en pacientes con colitis ulcerosa (Tytgat et al., 1996; van Klinken et al., 1999), en tanto que la expresión de MUC4 se encuentra reducida en pacientes de Crohn (Buisine et al., 2001). Esta disminución también se ha demostrado en modelos experimentales de colitis (Gonzalez et al., 2004).

Las células HT29-MTX se han utilizado como modelo de células caliciformes intestinales debido a la abundante producción de moco que las caracteriza, particularmente a las dos semanas de alcanzarse la confluencia. En estas condiciones se realizó un tratamiento con flavonoides a la concentración de 50  $\mu$ M. Se ensayó una única concentración debido a la complejidad del análisis de las mucinas y factores trébol. La selección de la concentración de 50  $\mu$ M obedece, por una parte, a que algunos flavonoides presentaban actividad a 10  $\mu$ M en células HT29, mientras que niveles en torno a 100  $\mu$ M son poco plausibles *in vivo*, aun con dietas ricas en flavonoides (Kroon et al., 2004).

Transcurridos 4 días en contacto con los flavonoides se valoró el efecto de los mismos sobre la expresión de MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5b, TFF-1 y TFF-3. Los resultados evidencian que, de las mucinas estudiadas y factores trébol, sólo la luteolina

produce un aumento del 40% en la expresión de TFF-3 (Figura 11). De los fármacos utilizados como controles, sólo la prednisolona dio lugar a un aumento del 25%.



**Figura 11.** Efecto de los flavonoides (50  $\mu$ M) sobre la expresión de TFF-3 en células HT29 MTX. La luteolina produjo un aumento en la expresión de TFF-3. (A) cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en la RT-PCR, (B) fotografía del gel de agarosa donde se realizó la electroforesis de las muestras resultado de la PCR.

Mostramos sólo resultados correspondientes a la luteolina y algunos de los flavonoides representativos: crisina, genisteína, apigenina, daidzeína y luteolina.

Los ensayos de viabilidad celular mediante la técnica del cristal violeta (Tabla 6) prueban que a la concentración de 50  $\mu$ M los flavonoides ensayados no producen cambios con respecto a las células control.

**Tabla 6.** Efecto de los flavonoides (50  $\mu$ M) sobre la viabilidad de las células HT29-MTX. Técnica de tinción con cristal violeta.

	% Viabilidad
Controles	100
DMSO	98,8 $\pm$ 11,1
Apigenina	110,5 $\pm$ 4,7
Crisina	98,7 $\pm$ 21,0
Luteolina	90,5 $\pm$ 8,4
Daidzeína	88,7 $\pm$ 17,4
Genisteína	92,8 $\pm$ 3,8
Prednisolona	93,4 $\pm$ 5,7
5-ASA	91,1 $\pm$ 13,0

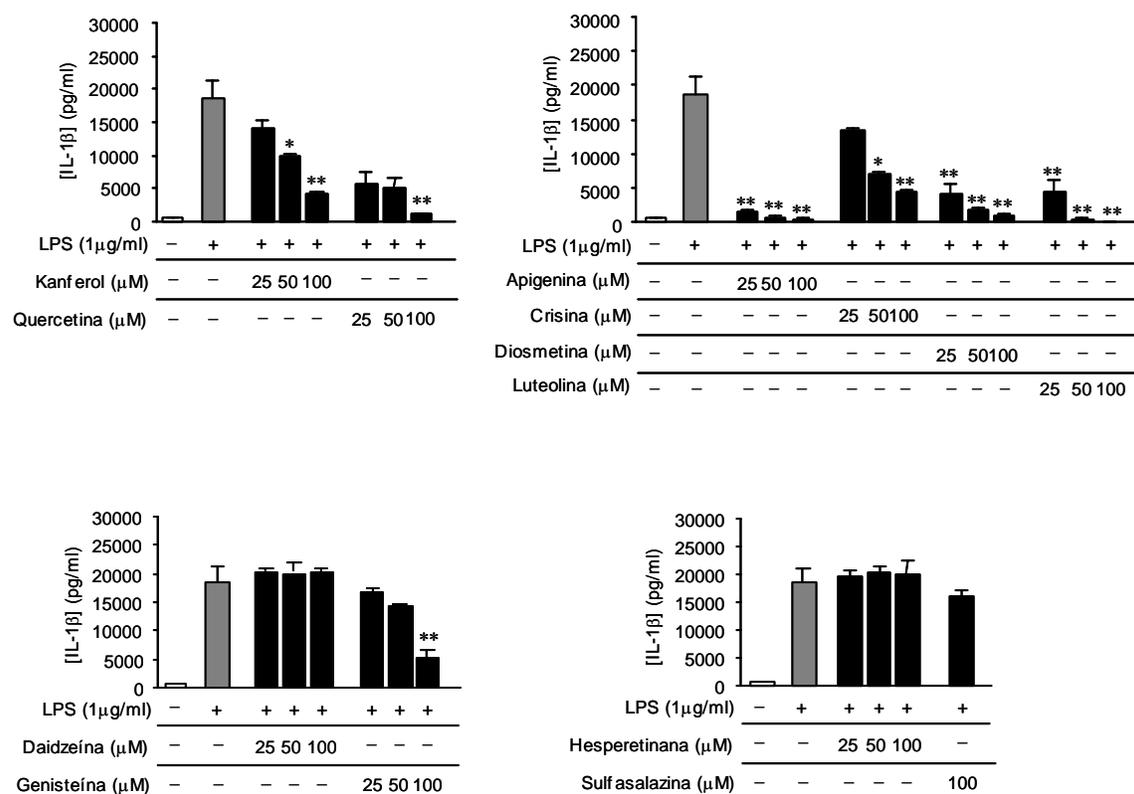
Los resultados se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. No existen diferencias significativas

### 1. 1. 3. Efecto de los flavonoides sobre la línea celular THP-1

Los macrófagos constituyen un tipo celular con un papel importante en la patología de la EII (Leon et al., 2006). Su participación se traduce en gran medida en la secreción de citoquinas proinflamatorias, las cuales contribuyen de forma significativa a la respuesta inflamatoria intestinal. Hemos seleccionado la línea celular THP-1 como modelo de monocitos humanos y se ha estudiado el efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6 inducida por LPS. Estas tres citoquinas desempeñan un importante papel en la fisiopatología de la EII y sus niveles se encuentran elevados en la mucosa inflamada (Mitsuyama et al., 1991; Sartor, 1994). Las células se estimularon con LPS (1  $\mu$ g/ml) y PMA (1  $\mu$ M) de acuerdo a lo descrito por Weiss y colaboradores (2004) durante 24 horas, lo cual origina un incremento significativo de los niveles de estas citoquinas. La mayoría de los flavonoides ensayados presentan un efecto inhibitorio. Los menos activos fueron la daidzeína y la hesperetina.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 12, 13 y 14. La Tabla 7 recoge la IC<sub>50</sub> (concentración que produce una inhibición del 50%) de los flavonoides más activos junto con el efecto máximo. La luteolina a 100  $\mu$ M produjo una inhibición casi total de la secreción de IL-1 $\beta$  ( $99,8 \pm 0,2$  %, Tabla 7 y Figura 12). Le siguieron la apigenina, la diosmetina y la quercetina, con porcentajes de inhibición de  $97,8 \pm 0,4$ ,  $95,0 \pm 1,2$  y  $93,5 \pm 1,7$ , respectivamente. Debemos resaltar la mayor potencia de la apigenina, que a 25  $\mu$ M mostró una eficacia de un 91.9%.

En el caso del TNF, el más eficaz fue la luteolina, con una inhibición máxima del  $78,3 \pm 4,0$  % y una IC<sub>50</sub> de  $10 \pm 6,6$   $\mu$ M. A continuación, la apigenina, la diosmetina, y por último la quercetina, que alcanzó una inhibición del 59,7 % a 100 $\mu$ M. El fármaco control utilizado, la sulfasalazina, resultó mucho menos eficaz que los flavonoides empleados, produciendo un efecto máximo inferior al 50%.



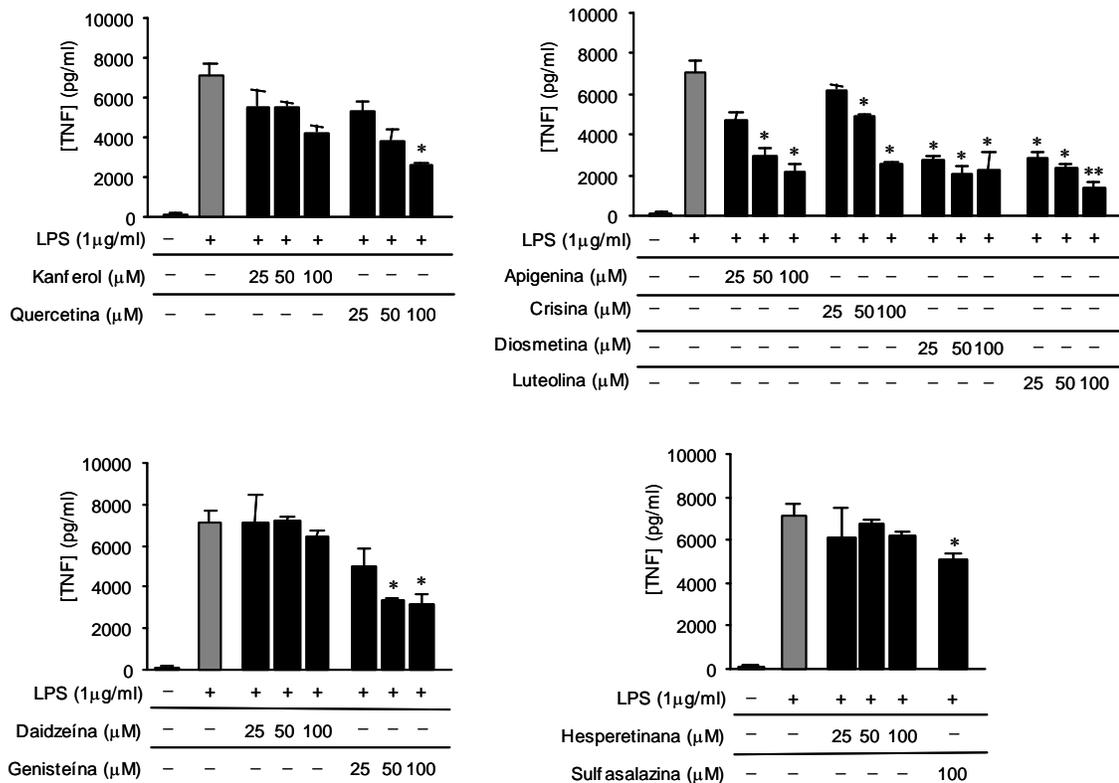
**Figura 12.** Efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL-1β en células THP-1 estimuladas con LPS (1 μg/ml) y PMA (1 μM). Todos los grupos presentan diferencias significativas frente al control sin estimular, \*P<0,05, \*\*P<0,01 frente a LPS.

**Tabla 7.** Efecto de la quercetina, apigenina, diosmetina y luteolina sobre la secreción de IL-1β y TNF en THP-1

	<u>Quercetina</u>		<u>Apigenina</u>		<u>Diosmetina</u>		<u>Luteolina</u>	
	IC <sub>50</sub> (μM)	% Inh. (100 μM)						
IL-1β	10,0 ± 0,1	93,5 ± 1,7**	7,5 ± 1,3	97,8 ± 0,4**	10,0 ± 1,4	95,0 ± 1,2**	20,0 ± 9,5	99,8 ± 0,2**
TNF	30,0 ± 3,1	59,7 ± 0,6*	30,0 ± 1,1	67,4 ± 7,3*	10,0 ± 1,9	64,9 ± 9,8*	10,0 ± 6,6	78,3 ± 4,0**

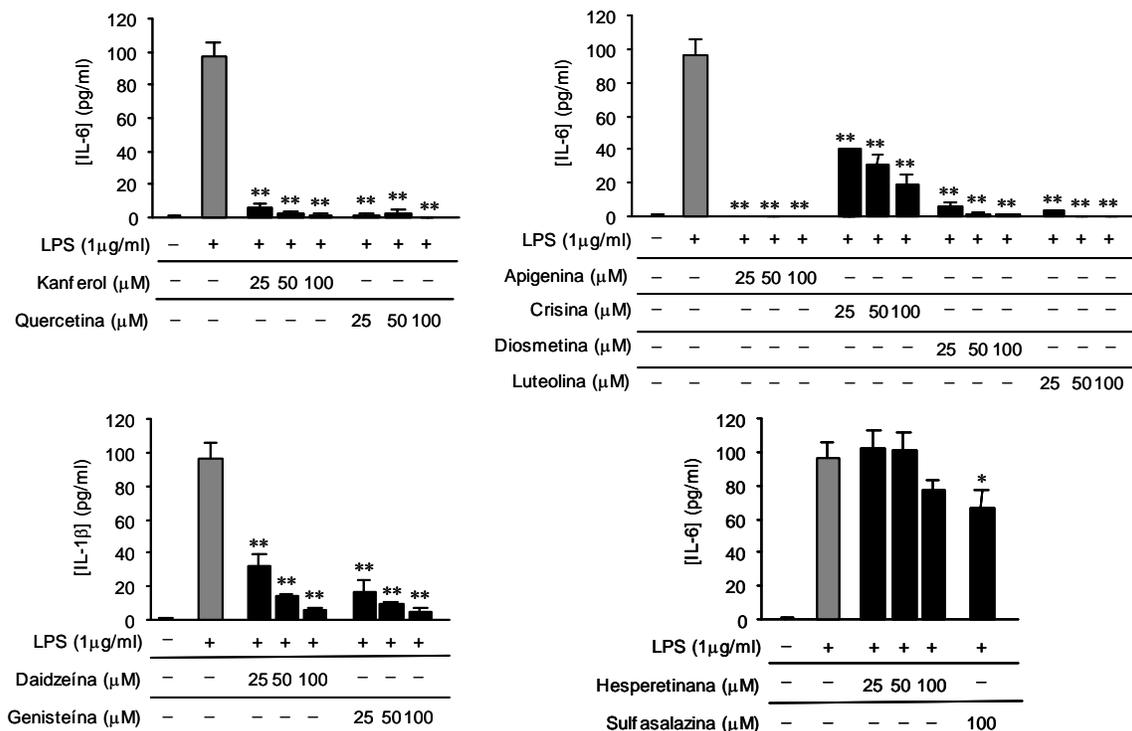
Los resultados se representan como la media ± desviación estándar. En el porcentaje de inhibición, \*P<0,05, \*\*P<0,01 frente a las células control sin estimular.

Existen diferencias en la capacidad de inhibición de estas dos citoquinas, siendo la de IL-1β mucho más sensible.



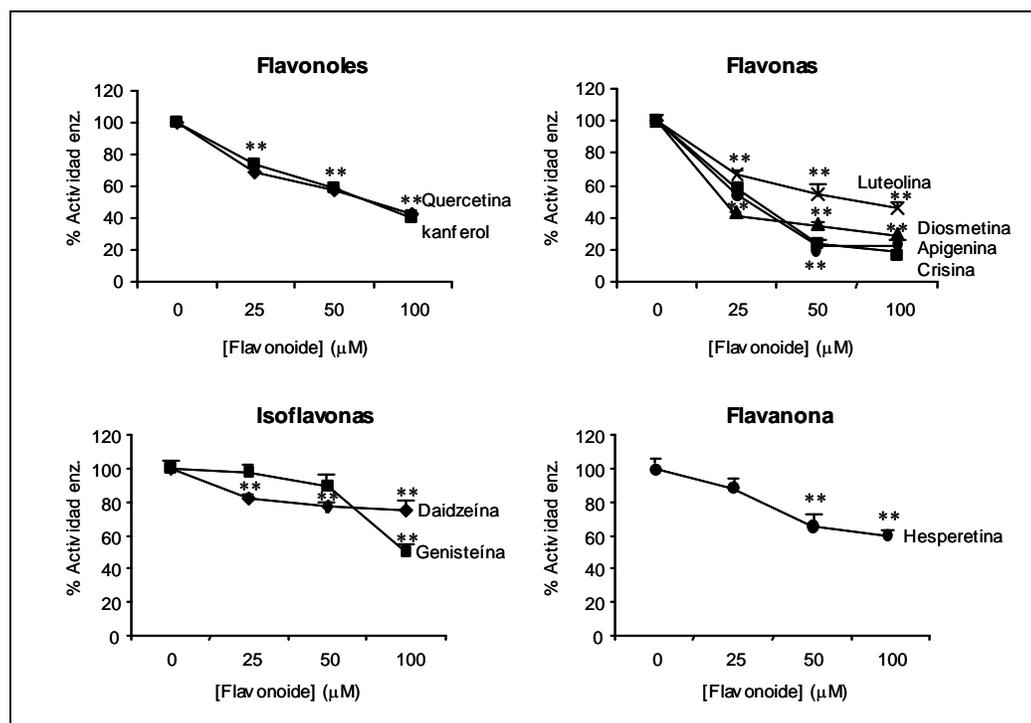
**Figura 13.** Efecto de los flavonoides sobre la secreción de TNF en células THP-1 estimuladas con LPS (1 μg/ml) y PMA (1 μM). Todos los grupos presentan diferencias significativas frente al control sin estimular, \*P<0,05, \*\*P<0,01 frente a LPS.

En el caso de la IL-6, prácticamente todos los flavonoides estudiados, excepto la flavanona hesperetina, se mostraron activos. Los más potentes resultaron ser la apigenina, la diosmetina, la luteolina y la quercetina, que a 25 μM inhiben la secreción de IL-6 entre el 90 y el 100%, seguidos de la genisteína, con un porcentaje de inhibición del 82,8% a 25 μM (Figura 14). El control sulfasalazina inhibió la producción de IL-6 en un 31,6 % a 100 μM. Esto demuestra que los flavonoides no inhiben de forma general la liberación de mediadores inflamatorios, sino que existe cierta especificidad.



**Figura 14.** Efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL6 en células THP-1 estimuladas con LPS (1 µg/ml) y PMA (1 µM). Todos los grupos presentan diferencias significativas frente al control sin estimular, \*\*P<0,01 frente a LPS.

A diferencia de lo que ocurre con las células epiteliales, los monocitos, incluyendo las células THP-1, presentan un comportamiento característico al ser activados en virtud del cual dejan de proliferar y desarrollan una capacidad muy aumentada para producir citoquinas proinflamatorias y para fagocitar microorganismos y otras partículas, entre otras propiedades. Así, la estimulación con LPS/PMA dio lugar a una reducción del 73% en la actividad de la succinato-tetrazolio reductasa, que es la enzima que reduce el WST-1 y que se encuentra presente únicamente en células viables, esto es, metabólicamente activas. Este dato puede reflejar toxicidad celular, inhibición de la proliferación, o ambas cosas.



**Figura 15.** Efecto de los flavonoides sobre la actividad de la succinato-tetrazolio reductasa en células THP-1. \*\*P<0,01 con respecto al control sin tratar.

Todos los flavonoides ensayados redujeron el nivel de actividad metabólica en igual o menor medida que los estímulos aplicados (Figura 15). Las flavonas mostraron en general una inhibición más pronunciada, siendo la de la apigenina, crisina y diosmetina superior a un 70% a 100 μM.

Para diferenciar si el efecto de los flavonoides es sobre la proliferación, o solamente afecta a la viabilidad de las células, determinamos los valores de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo de células en contacto con los polifenoles, con y sin estímulos (LPS/PMA). La LDH aparece en el medio de cultivo como consecuencia de la lisis celular. Esta técnica no es tan sensible pero, junto a la determinación de WST-1,

puede dar una idea más precisa de la toxicidad de los flavonoides a las concentraciones utilizadas.

**Tabla 8.** Efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de las células THP-1. Actividad LDH.

	Concentración ( $\mu$ M)	LDH (mU/ml) Flavonoides estímulos	LDH (mU/ml) con Flavonoides sin estímulos
Controles		284,6 $\pm$ 2,4	258,7 $\pm$ 2,3
DMSO		265,7 $\pm$ 30,2	232,1 $\pm$ 4,5
LPS + PMA		305,7 $\pm$ 56,5	272,6 $\pm$ 11,2
Kanferol	50	272,7 $\pm$ 38,9	256,1 $\pm$ 5,3
	100	289,2 $\pm$ 20,2	253,4 $\pm$ 2,6
Quercetina	50	257,9 $\pm$ 33,4	258,0 $\pm$ 2,8
	100	327,1 $\pm$ 70,7	264,2 $\pm$ 2,7
Apigenina	50	267,9 $\pm$ 3,9	279,9 $\pm$ 1,6
	100	254,1 $\pm$ 55,9	274,5 $\pm$ 10,3
Crisina	50	283,7 $\pm$ 56,8	268,6 $\pm$ 6,3
	100	296,7 $\pm$ 23,4	265,3 $\pm$ 12,1
Diosmetina	50	289,4 $\pm$ 24,1	271,1 $\pm$ 12,5
	100	272,2 $\pm$ 21,0	273,3 $\pm$ 2,0
Luteolina	50	329,7 $\pm$ 57,5	279,0 $\pm$ 3,4
	100	317,9 $\pm$ 24,1	267,7 $\pm$ 10,1
Daidzeína	50	271,6 $\pm$ 18,6	251,1 $\pm$ 6,3
	100	240,9 $\pm$ 1,6	252,9 $\pm$ 1,9
Genisteína	50	301,3 $\pm$ 94,8	251,8 $\pm$ 14,6
	100	286,5 $\pm$ 30,3	260,8 $\pm$ 1,5
Hesperetina	50	221,1 $\pm$ 13,4	251,1 $\pm$ 11,1
	100	287,0 $\pm$ 32,7	267,8 $\pm$ 4,1
Sulfasalazina	50	274,9 $\pm$ 5,3	254,6 $\pm$ 5,2
	100	336,5 $\pm$ 9,8	250,3 $\pm$ 6,2

Los resultados se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. No existen diferencias significativas.

Los valores de LDH no se vieron modificados de manera significativa en las células incubadas con los flavonoides en presencia o no de LPS/PMA, en comparación con las células sin estimular (Tabla 8). En resumen, debemos concluir que si bien algunos de los flavonoides producen una inhibición de la actividad mitocondrial de las células (Figura 15), este efecto no se asocia a una disminución significativa de la viabilidad celular.

Analizando los resultados obtenidos sobre la inhibición de la producción de mediadores inflamatorios en monocitos humanos podemos decir que la estructura de flavona es la que en general resulta más activa. No obstante, se debe señalar que en algunos casos, la isoflavona genisteína y el flavonol quercetina han mostrado ser potentes inhibidores de la secreción de estas citoquinas. La flavanona hesperetina fue la menos activa en todos los casos.

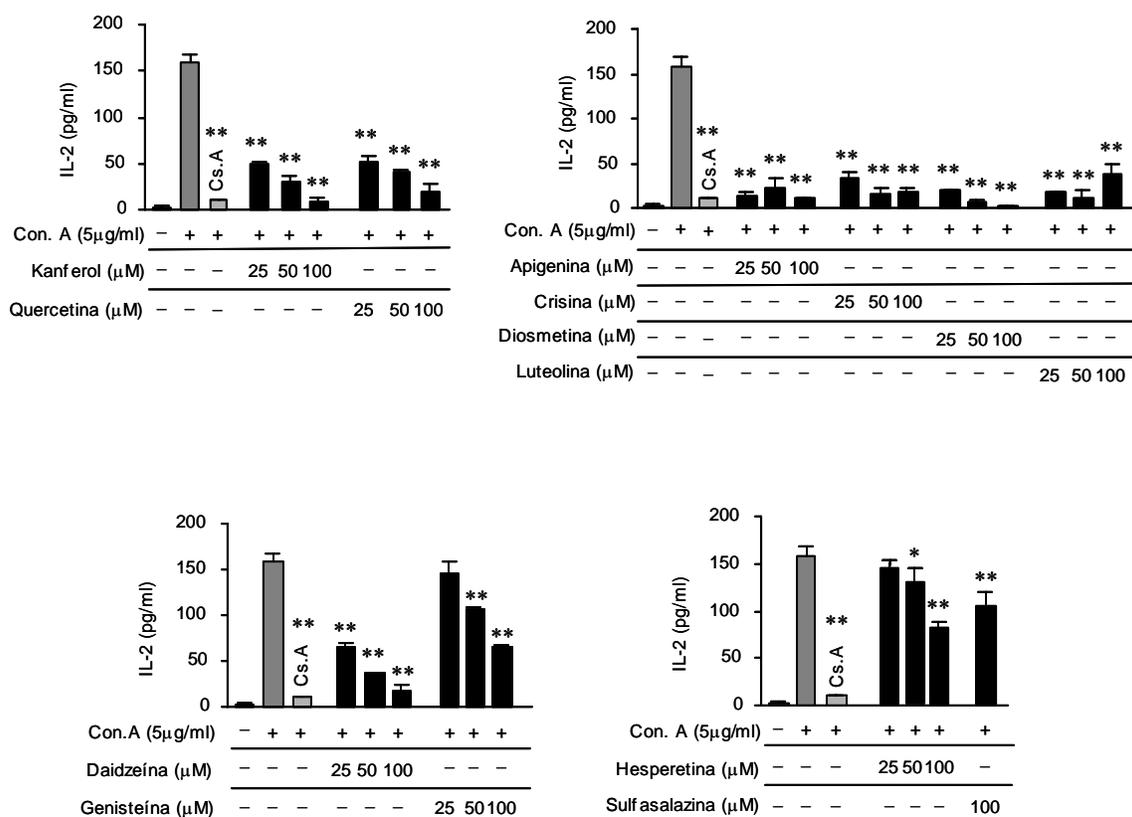
## 1. 2. Ensayos en cultivos primarios

### 1. 2. 1. Efecto de los flavonoides sobre linfocitos aislados de bazo de ratón

Los linfocitos T activan la respuesta inmune específica e intervienen en el proceso inflamatorio intestinal de manera muy activa, de forma que se sabe que bloqueando su receptor (TCR) se previene la aparición de colitis (Okamoto et al., 1999). Nos hemos propuesto evaluar el efecto de los flavonoides sobre la producción de IL-2, la principal citoquina que constituye un factor de crecimiento autocrino de estas células, y sobre la proliferación de las mismas.

#### *Efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL-2 en linfocito de bazo*

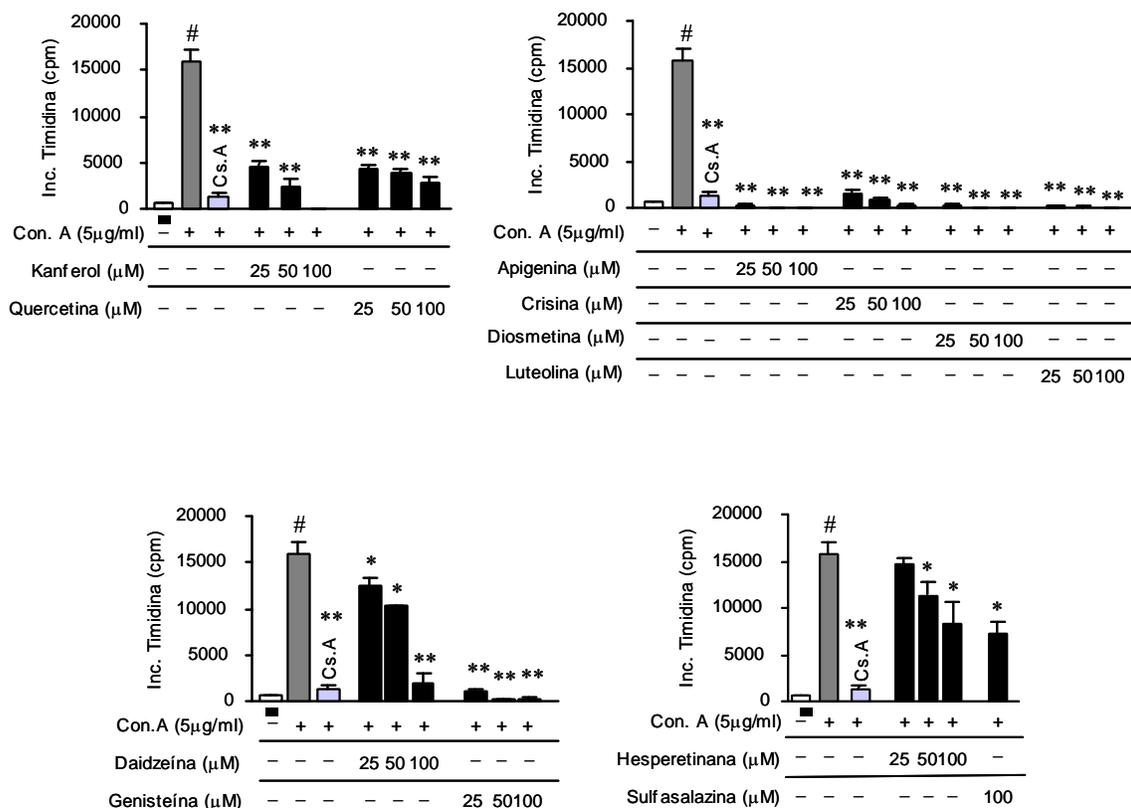
Los linfocitos, a diferencia de los macrófagos, se encuentran en reposo en condiciones normales y comienzan a proliferar y a activarse únicamente cuando existe estimulación, produciendo principalmente IL-2 como factor de crecimiento autocrino. La estimulación fue realizada con concanavalina A, un activador inespecífico del complejo TCR. A diferencia de lo que se observó en otros tipos celulares, casi todos los flavonoides fueron muy eficaces, dando lugar a una fuerte inhibición de la secreción de IL-2 (Figura 16).



**Figura 16.** Efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL-2 en linfocitos de bazo. Todos los flavonoides y la sulfasalazina inhibieron de forma significativa la secreción de IL-2 (\*\*P<0,01 frente al control (Con. A). Con. A : concanavalina A (5 μg/ml), Cs. A: ciclosporina A (0,1 μg/ml).

*Efecto de los flavonoides sobre la proliferación de linfocitos de bazo*

Los flavonoides estudiados ocasionaron una fuerte inhibición, que en muchos casos es virtualmente completa, de la proliferación de estas células inducida por concanavalina A, exceptuando el caso de la isoflavona daidzeína a 50 μM (pero no a 100 μM) y la hesperetina a 100 μM (Figura 17). El control positivo utilizado, la sulfasalazina, originó una inhibición de la proliferación de aproximadamente un 50% a la concentración de 100 μM.

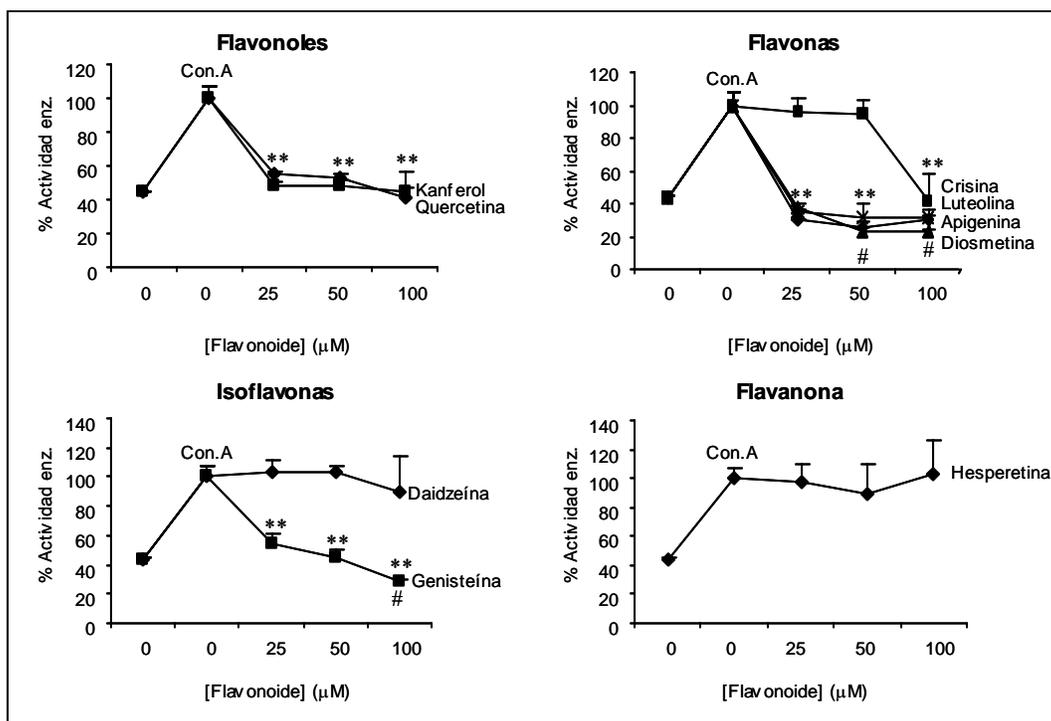


**Figura 17.** Efecto de los flavonoides sobre la proliferación de linfocitos inducida con concanavalina A. Medida de incorporación de  $^3\text{H}$ timidina marcada. En todos los casos  $P < 0,05$  frente a control (Con.A). Con. A : concanavalina A (5 µg/ml), Cs. A : ciclosporina A (0,1 µg/ml).

El ensayo de reducción metabólica del WST-1 mostró un incremento significativo como resultado de la estimulación con concanavalina A, pero en mucha menor medida que el efecto proliferativo. La ciclosporina A tuvo un efecto inhibitorio significativo, pero nuevamente menos marcado que la inhibición casi total que se observa en la captación de timidina tritiada.

Todos los flavonoides reducen la actividad metabólica hasta el mismo nivel o inferior al que presentan las células control (sin concanavalina A), excepto la daidzeína, la hesperetina, y la crisina a las concentraciones de 25 y 50 µM (Figura 18). Las flavonas mostraron en general una inhibición más pronunciada, a excepción de la crisina, que

solo inhibió a 100  $\mu$ M. Sólo la apigenina, la diosmetina y la genisteína redujeron la actividad de la enzima hasta niveles inferiores que el control.



**Figura 18.** Efecto de los flavonoides sobre la actividad de la succinato-tetrazolio reductasa en linfocitos murinos. \*\* $P < 0,01$  frente al control estimulado con Con. A (concanavalina A). # $P < 0,05$  frente al control sin estimular.

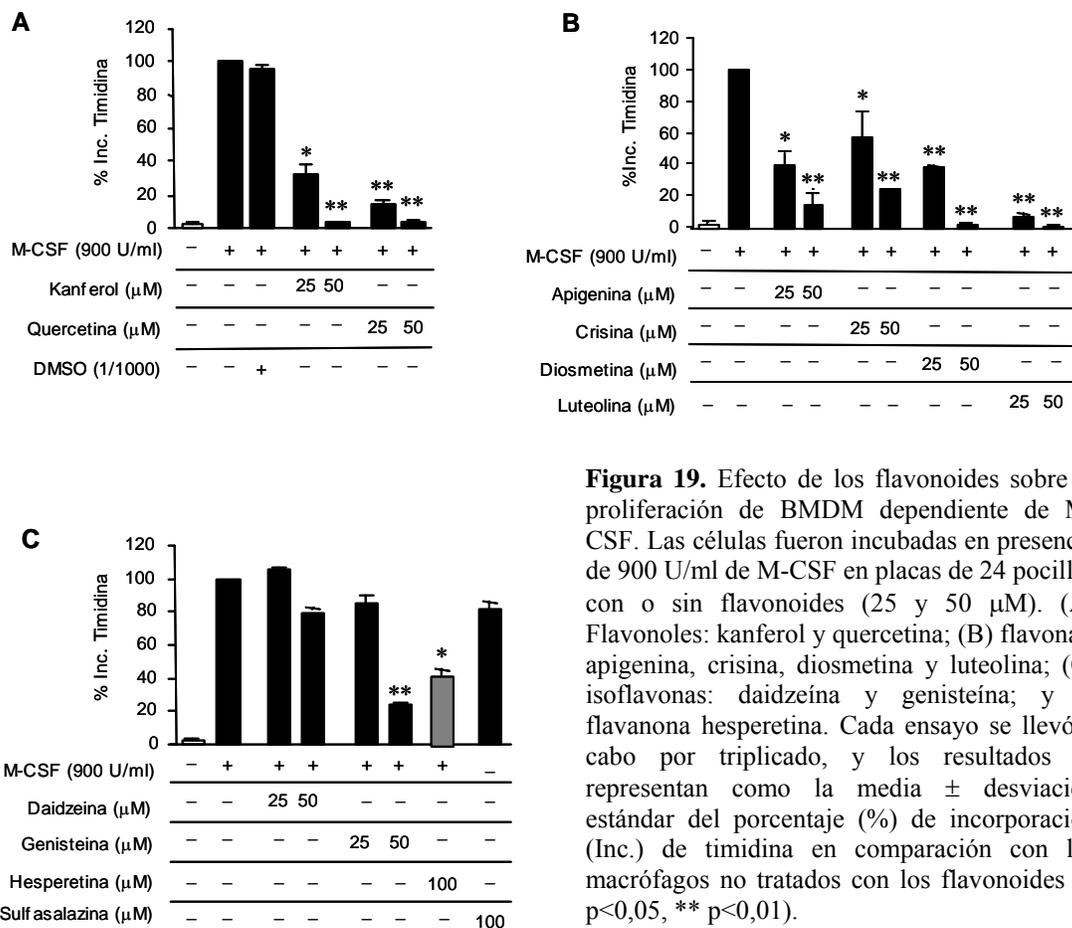
### 1. 2. 2. Efecto de los flavonoides sobre macrófagos derivados de la médula ósea

Los resultados obtenidos en células HT29, HT29-MTX y THP-1 demuestran el potencial antiinflamatorio de los flavonoides. A continuación abordamos el estudio de su efecto y mecanismo de acción en un modelo de cultivo primario de macrófagos derivados de la médula ósea de ratón, los cuales presentan la ventaja de mantener intactos los mecanismos del ciclo celular y por tanto representan un modelo más fisiológico que las líneas celulares tumorales utilizadas hasta el momento.

#### *Efecto de los flavonoides sobre la viabilidad y proliferación de los macrófagos dependiente de M-CSF*

Los macrófagos proliferan en presencia del M-CSF. Para determinar el efecto de los flavonoides sobre la respuesta a este factor utilizamos la medida de la incorporación de timidina marcada como indicador de la proliferación celular, puesto que se ha demostrado previamente que éste es un método válido que se corresponde con el aumento del número de células (Comalada et al., 2003). Basándonos en estos estudios previos se seleccionó la concentración de 900 U/ml de M-CSF (correspondiente a 30% del medio condicionado) para inducir la proliferación de los macrófagos. La adición de los flavonoles (kanferol y quercetina) al medio de cultivo inhibió significativamente la proliferación de los macrófagos (Figura 19A). Este efecto fue concentración-dependiente, y la proliferación se inhibió completamente a 50  $\mu$ M. Además, se evaluó el efecto del vehículo (DMSO 0.1%) sobre la proliferación, no observándose ningún efecto inhibitorio (Figura 19 A).

La proliferación en respuesta al M-CSF se redujo de forma concentración-dependiente en presencia de las flavonas (25 y 50  $\mu$ M), siendo la diosmetina y la luteolina las más eficaces (Figura 19B). Por otro lado, el efecto de las isoflavonas fue menos importante (Figura 19C): sólo la genisteína mostró una inhibición significativa a 50  $\mu$ M.



**Figura 19.** Efecto de los flavonoides sobre la proliferación de BMDM dependiente de M-CSF. Las células fueron incubadas en presencia de 900 U/ml de M-CSF en placas de 24 pocillos con o sin flavonoides (25 y 50 μM). (A) Flavonoles: kanferol y quercetina; (B) flavonas: apigenina, crisina, diosmetina y luteolina; (C) isoflavonas: daidzeina y genisteina; y la flavanona hesperetina. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado, y los resultados se representan como la media ± desviación estándar del porcentaje (%) de incorporación (Inc.) de timidina en comparación con los macrófagos no tratados con los flavonoides (\* p<0,05, \*\* p<0,01).

Finalmente, la incubación de los macrófagos con la flavanona hesperetina solamente inhibió la proliferación a la concentración de 100 μM (50% de la respuesta del control, Figura 19C). Estos resultados sugieren que las flavonas y los flavonoles son más eficientes que las isoflavonas o flavanonas como inhibidores de la proliferación de macrófagos.

Existen estudios que indican un posible papel de los flavonoides como inductores de apoptosis en diferentes cultivos celulares (Chen et al., 2005a; Chowdhury et al., 2005a; Chowdhury et al., 2005b; Cui et al., 2005). Por ello decidimos examinar la influencia de

los flavonoides sobre la viabilidad celular mediante la tinción de las células con cristal violeta (Tabla 9).

**Tabla 9.** Efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de los macrófagos. Técnica del cristal violeta.

	Concentración ( $\mu$ M)	% Viabilidad con respecto al control
Controles		100
Kanferol	25	106,4 $\pm$ 2,3
	50	89,4 $\pm$ 10,7
	100	100,6 $\pm$ 0,1
Quercetina	25	94,4 $\pm$ 10,7
	50	84,6 $\pm$ 2,1
	100	79,0 $\pm$ 5,5*
Apigenina	25	93,7 $\pm$ 0,2
	50	82,1 $\pm$ 6,2
	100	84,7 $\pm$ 13,0
Crisina	25	100,2 $\pm$ 7,3
	50	94,2 $\pm$ 16,2
	100	75,9 $\pm$ 3,4
Diosmetina	25	85,0 $\pm$ 7,7
	50	97,6 $\pm$ 3,6
	100	89,7 $\pm$ 12,3
Luteolina	25	87,1 $\pm$ 5,2
	50	84,0 $\pm$ 4,2
	100	78,3 $\pm$ 1,0*
Daidzeína	25	109,9 $\pm$ 1,5
	50	101,7 $\pm$ 3,9
	100	99,4 $\pm$ 12,3
Genisteína	25	95,6 $\pm$ 7,7
	50	90,6 $\pm$ 9,6
	100	88,6 $\pm$ 1,1
Hesperetina	25	109,6 $\pm$ 12,0
	50	100,6 $\pm$ 11,8
	100	109,7 $\pm$ 1,4
Sulfasalazina	25	99,6 $\pm$ 3,2
	50	102,3 $\pm$ 6,5
	100	112,7 $\pm$ 28,2

Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. \*p<0,05 frente al control

Transcurridas 24 horas de cultivo de los macrófagos en presencia de varias concentraciones de flavonoides (25-100  $\mu\text{M}$ ), se determinó la viabilidad espectrofotométricamente. Ninguno de los flavonoides ensayados redujo significativamente la viabilidad de los macrófagos a 25 o 50  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, la quercetina, crisina y luteolina mostraron una ligera reducción de la viabilidad a 100  $\mu\text{M}$ , que en ningún caso superó el 30%.

#### *Efecto de los flavonoides sobre la liberación de TNF en macrófagos activados con LPS*

A continuación decidimos determinar el efecto de los flavonoides en la activación de los macrófagos inducida por LPS. Para ello los macrófagos se incubaron con los flavonoides (25-50  $\mu\text{M}$ ) durante una hora y se midió por ELISA la presencia de TNF en el medio de cultivo. Se observa un comportamiento similar a lo que ocurre en la línea monocítica THP-1; sin embargo, parece existir una menor especificidad, ya que la mayoría de los flavonoides inhibieron la secreción de TNF, si bien en distinta medida (Tabla 10).

**Tabla 10.** Efecto de los flavonoides sobre la liberación de TNF en BMDM.

Flavonoide	TNF (% Inhibición)	
	25	50
Kanferol	17,1 $\pm$ 1,3	53,3 $\pm$ 3,1*
Quercetina	76,1 $\pm$ 4,6**	97,5 $\pm$ 3,7**
Apigenina	11,4 $\pm$ 0,8	41,6 $\pm$ 1,5*
Crisina	23,6 $\pm$ 4,6	32,7 $\pm$ 2,9*
Diosmetina	37,5 $\pm$ 3,5*	48,6 $\pm$ 2,5**
Luteolina	85,9 $\pm$ 0,9**	97,8 $\pm$ 1,2**
Daidzeína	14,1 $\pm$ 1,8	15,5 $\pm$ 3,8
Genisteína	48,8 $\pm$ 5,3*	63,2 $\pm$ 1,5**
Hesperetina	24,1 $\pm$ 1,3	41,6 $\pm$ 0,9*

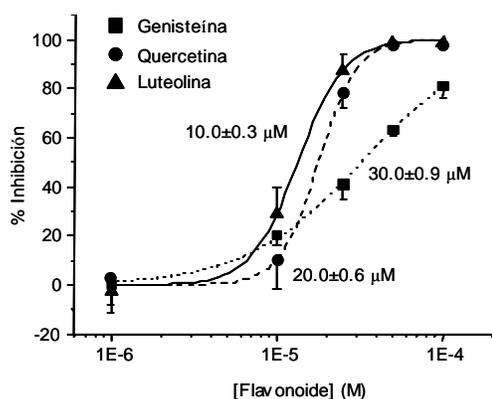
Los resultados se expresan como % de inhibición  $\pm$  desviación estándar (\*  $p < 0,05$ ,

\*\*  $p < 0,01$ ; con respecto a las células no tratadas con flavonoides).

Así, la daidzeína y la crisina mostraron sólo un ligero efecto inhibitor (<35%) que sólo fue significativo en el caso de la segunda, mientras que el kanferol, la apigenina, la diosmetina y la hesperetina redujeron la secreción de TNF en aproximadamente un 40-

55% a 50  $\mu\text{M}$ . La quercetina, luteolina y genisteína fueron los inhibidores más eficaces (>60% de inhibición). El efecto inhibitor de la secreción de TNF por parte de los tres inhibidores más activos (quercetina, luteolina y genisteína) se analizó empleando concentraciones más bajas (Figura 20).

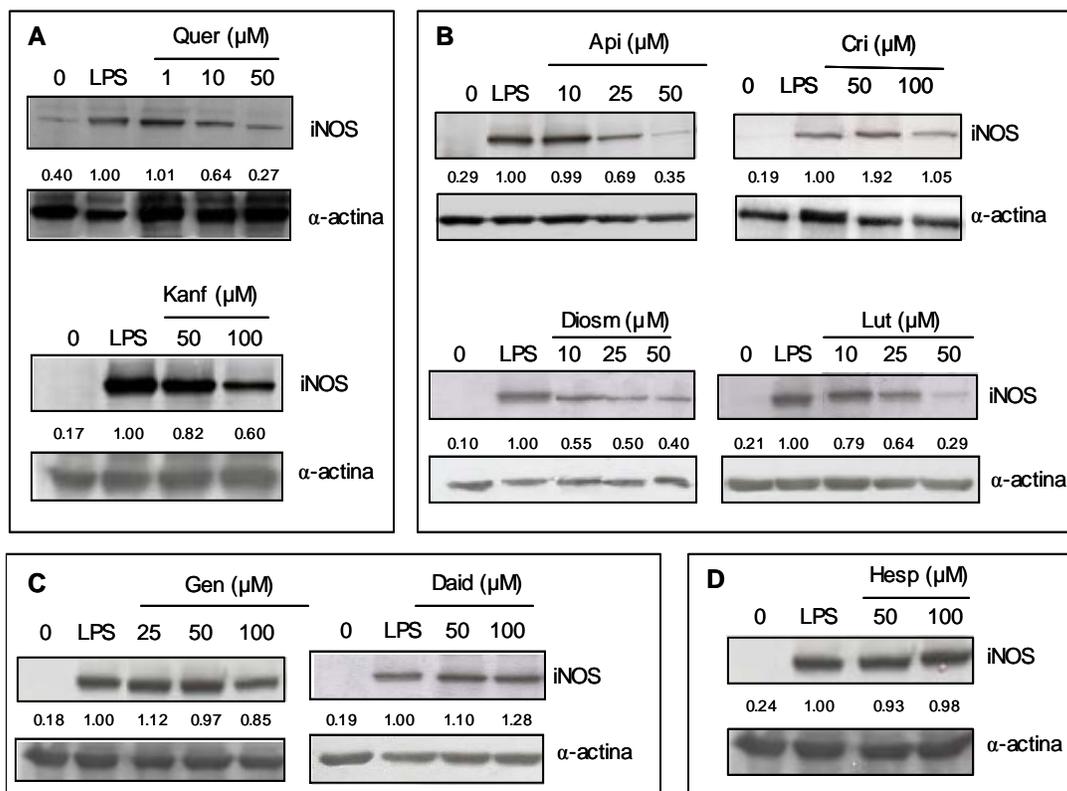
La genisteína inhibe progresivamente la secreción de TNF sin conseguir un bloqueo total, mientras que la quercetina y la luteolina mostraron saturación en la respuesta. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  para la luteolina y la quercetina fueron  $10,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$  y  $20,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$ , respectivamente, y para la genisteína fue  $30,0 \pm 0,9 \mu\text{M}$ . Estos resultados confirman que luteolina, quercetina y genisteína inhiben la secreción de TNF de forma concentración-dependiente, siendo las dos primeras más potentes (Figura 20).



**Figura 20.** Efecto de los flavonoides genisteína, quercetina y luteolina sobre la liberación de TNF inducida por LPS en BMDM. Las células recibieron el tratamiento con el vehículo (DMSO 0,1%) o los flavonoides (1, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora previa a la estimulación con LPS (10 ng/ml). A las 24 horas se determinó por ELISA la presencia de TNF en el medio de cultivo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de secreción de TNF en comparación con las células que no se trataron con los compuestos, (n=3). Los valores de  $\text{IC}_{50}$  son  $10,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$  para la luteolina,  $20,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$  para la quercetina y  $30,0 \pm 0,9 \mu\text{M}$  para la genisteína.

#### *Efecto de los flavonoides sobre la expresión de iNOS en macrófagos activados con LPS*

El óxido nítrico (NO) está involucrado en varios procesos biológicos, entre ellos la inflamación (Korhonen et al., 2005; Reinders et al., 2005a; Reinders et al., 2005b). El LPS induce la expresión de iNOS en macrófagos y ésta se relaciona con la producción de NO (Xaus et al., 2000). Hemos analizado el efecto de los flavonoides sobre la expresión de iNOS inducida por la incubación de las células con LPS (10 ng/ml) durante 6 horas (Figura 21).

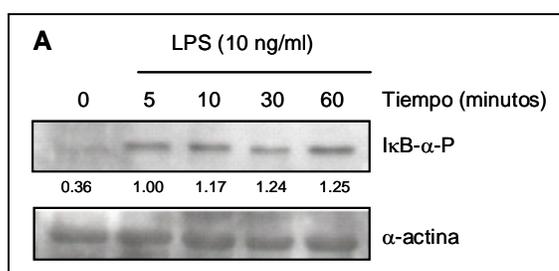


**Figura 21.** Efecto de (A) flavonoles, (B) flavonas, (C) isoflavonas y (D) flavanonas, sobre la expresión de iNOS inducida por LPS en BMDM. Las células se trataron durante 1 hora con los flavonoides y después se incubaron durante 6 horas con LPS (10 ng/ml). Los lisados celulares se procesaron para determinar la expresión de iNOS por Western blot. La densidad relativa de las bandas se representa entre paneles, siendo 1.00 el valor de referencia que corresponde al control (LPS). Estos experimentos se realizaron al menos 3 veces. Quer (quercetina), Kanf (kanferol), Api (apigenina), Cri (crisina), Diosm (diosmetina), Lut (luteolina), Gen (genisteína), Daid (daidzeína), Hesp (hesperetina).

Nuestros resultados muestran que el flavonol quercetina y las flavonas apigenina, luteolina y diosmetina inhiben la expresión de iNOS a concentraciones bajas ( $\leq 50 \mu\text{M}$ ), mientras que fueron necesarias concentraciones más elevadas ( $100 \mu\text{M}$ ) del flavonol kanferol o de la flavona crisina para obtener dicho efecto (Figura 21A y B). La flavanona hesperetina y las isoflavonas genisteína y daidzeína no ejercieron inhibición alguna sobre la expresión de iNOS, ni siquiera a  $100 \mu\text{M}$  (Figura 21C y D).

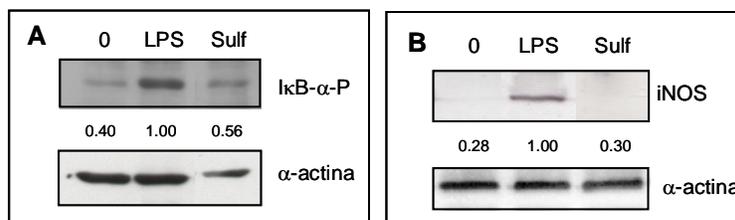
### *Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de IκB-α inducida por LPS*

Puesto que iNOS y TNF son dos genes regulados, entre otros, por el factor de transcripción NFκB (Beinke y Ley, 2004; Neurath et al., 1998) decidimos estudiar la posible implicación de dicho factor en el mecanismo de acción de los flavonoides. En condiciones de reposo, el NF-κB permanece en el citoplasma de la célula unido a la proteína inhibidora IκB-α. La exposición de las células a estimulantes como el LPS provoca la puesta en marcha de cascadas de señalización intracelular que producen la fosforilación y posterior degradación de dicha proteína. Una vez que IκB-α se disocia del complejo, el NF-κB se traslada al núcleo, donde se une a secuencias diana de DNA específicas, promoviendo la transcripción de diversos genes. En primer lugar se estudió el intervalo temporal en el que podemos detectar la proteína fosforilada (Figura 22).



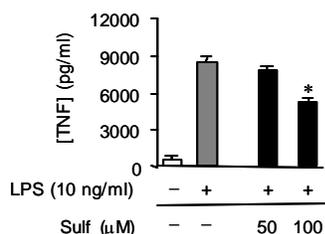
**Figura 22.** Determinación de IκBα-P. Western blot. Los macrófagos se incubaron con LPS (10 ng/ml) durante los tiempos indicados. A continuación se procedió a la electroforesis de las muestras en gel de agarosa. La densidad relativa de las bandas se representa entre paneles, siendo 1.00 el valor de referencia que corresponde al control (LPS)

Para determinar el papel de la fosforilación de IκB-α en la activación de los macrófagos utilizamos la sulfasalazina, que es un inhibidor de NF-κB (Wahl et al., 1998; Yin et al., 1998). La incubación de los macrófagos con LPS (10 ng/ml) induce la fosforilación de IκB-α en la serina 32, como hemos determinado por Western blot (Figura 23A).



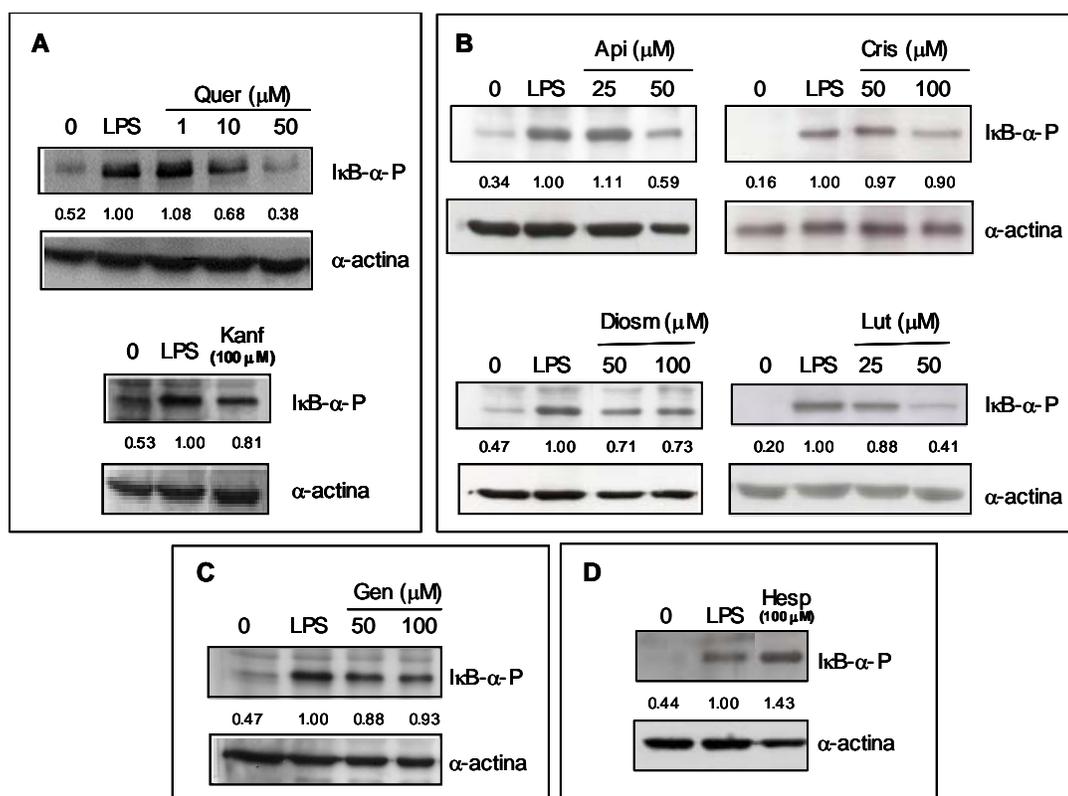
**Figura 23.** Efecto de la sulfasalazina sobre la fosforilación de IκBα (A) y la expresión de iNOS (B) en BMDM. Western blot. La densidad relativa de las bandas se representa entre paneles, siendo 1.00 el valor de referencia que corresponde al control (LPS).

La sulfasalazina inhibe parcialmente este proceso a 100 μM. Además, el tratamiento con este fármaco inhibe también la expresión de iNOS tras 6 horas de estimulación con LPS (Figura 23B). Por otro lado, la sulfasalazina redujo la secreción de TNF en un 30% a la concentración más alta (Figura 24).



**Figura 24.** Efecto de la sulfasalazina (50 y 100 μM) sobre la expresión de TNF en BMDM. ELISA

La quercetina redujo la fosforilación de IκB-α de manera significativa a 10 μM y especialmente a 50 μM (Figura 25A). De la misma forma, la apigenina, la diosmetina y la luteolina produjeron inhibición a 50 μM (Figura 25B), mientras que el kanferol y la crisina mostraron un efecto menor. Las isoflavonas genisteína (Figura 25C) y daidzeína (datos no mostrados) y la flavanona hesperetina (100 μM) no modificaron significativamente la fosforilación de IκB-α.

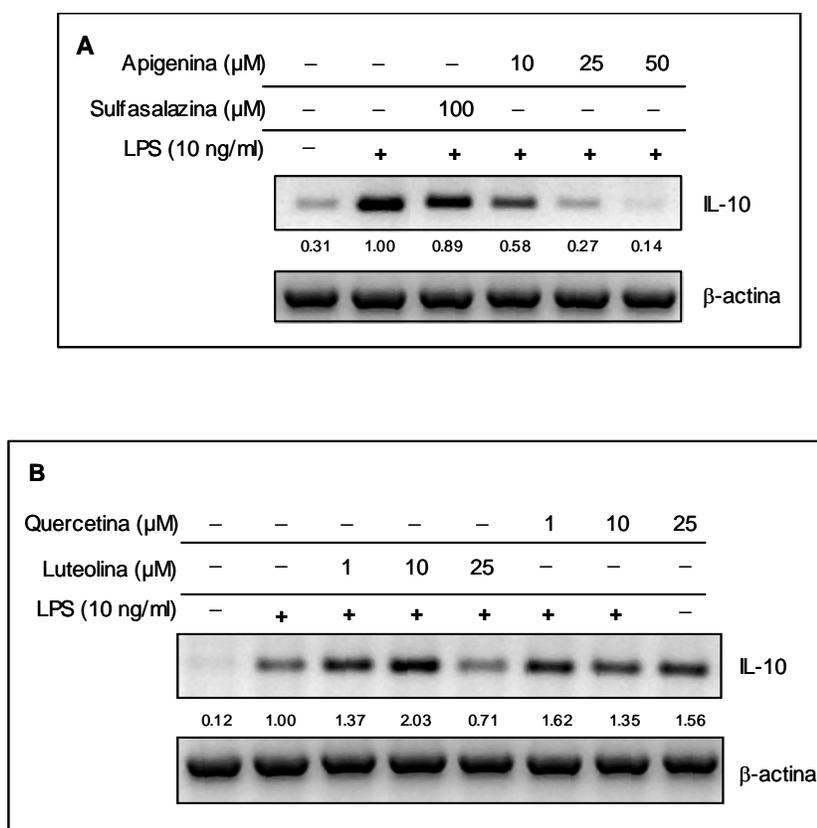


**Figura 25.** Efecto de (A) flavonoles, (B) flavonas, (C) isoflavonas y (D) flavanonas sobre la fosforilación de IκB $\alpha$  inducida por LPS en BMDM. Las células se trataron durante 1 hora con los flavonoides y después se incubaron durante 10 minutos con LPS (10 ng/ml). Los lisados celulares se procesaron para determinar IκB $\alpha$ -P por Western blot. La densidad relativa de las bandas se representa entre paneles, siendo 1.00 el valor de referencia que corresponde al control (LPS). Estos experimentos se realizaron al menos 3 veces. Quer (quercetina), Kanf (kanferol), Api (apigenina), Cris (crisina), Diosm (diosmetina), Lut (luteolina), Gen (genisteína), Hesp (hesperetina).

Reuniendo los datos de los apartados anteriores podemos decir que existe una correlación entre la inhibición de iNOS y la inhibición de la fosforilación de IκB- $\alpha$ . Esto sugiere que la ruta de activación del NF- $\kappa$ B podría ser el mecanismo empleado por algunos de los flavonoides para ejercer su efecto antiinflamatorio, a través de la inhibición directa de la fosforilación de la proteína inhibidora IκB- $\alpha$  o de algún proceso de señalización anterior.

*Efecto de la luteolina y la quercetina sobre la secreción de IL-10 inducida por LPS*

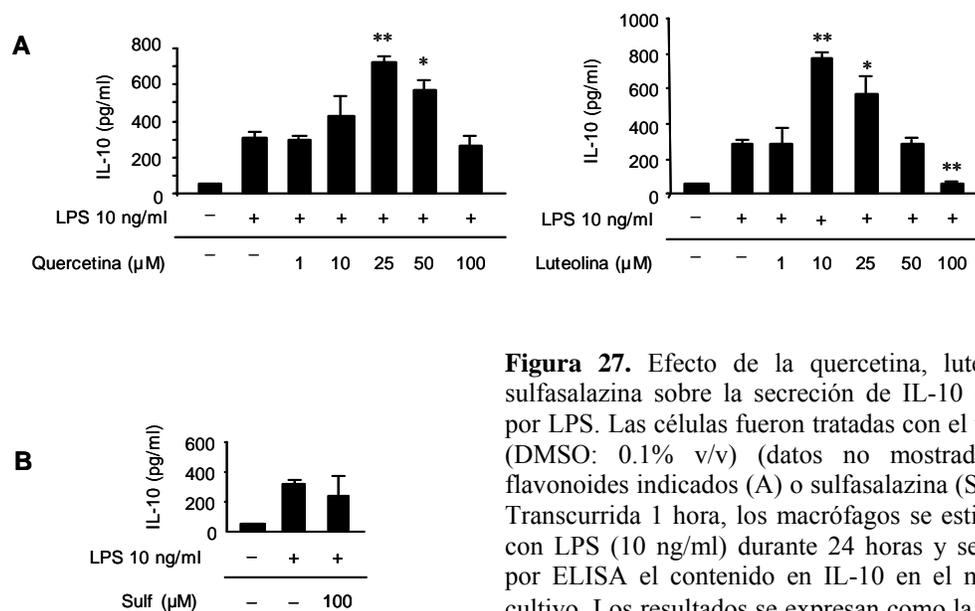
La respuesta inflamatoria puede ser suprimida por la producción de citoquinas inmunomoduladoras como la IL-10 y el TGF- $\beta$  (Coombes et al., 2005; Kishore et al., 1999). Por ello, y dado que los macrófagos son importantes secretores de IL-10 (de Waal Malefyt et al., 1991), decidimos investigar el efecto de los flavonoides más activos sobre la expresión de esta citoquina. Para ello, se llevó a cabo el pretratamiento de las células con los flavonoides antes de ser activadas con LPS (10 ng/ml). La sulfasalazina se utilizó como fármaco de referencia (Figura 26A).



**Figura 26.** Expresión del mRNA para la IL-10 en macrófagos tratados con apigenina, sulfasalazina (A), quercetina o luteolina (B). La expresión se determinó por RT-PCR semicuantitativa. Los geles que se muestran son representativos de tres experimentos independientes. La densidad relativa de las bandas se representa entre paneles, siendo 1.00 el valor de referencia que corresponde al control (LPS).

Los macrófagos expresan IL-10 mRNA transcurridas 6 horas de la estimulación con LPS. La IL-10 también se detectó en los sobrenadantes celulares a las 24 horas de la estimulación (Figura 27). La adición de apigenina (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) al medio de cultivo previamente a la estimulación con LPS inhibió la expresión de IL-10 mRNA de forma concentración-dependiente, mientras que el fármaco control no produjo ningún cambio en la expresión de IL-10 a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 26A).

Los demás flavonoides presentaron en general un cierto efecto inhibitorio o bien una ausencia total de cambios, según el caso (datos no mostrados). Por el contrario, la quercetina y la luteolina incrementaron los niveles de IL-10 mRNA a 1 y 10  $\mu\text{M}$  (Figura 26B). Este incremento se observó también a nivel proteico (Figura 27). Es importante señalar que el efecto de ambos flavonoides desaparece a medida que aumentan las concentraciones, produciéndose incluso una inhibición de la secreción de IL-10 por parte de la luteolina a 100  $\mu\text{M}$ .

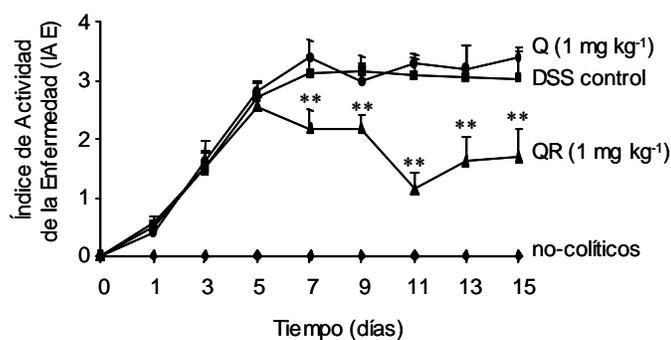


**Figura 27.** Efecto de la quercetina, luteolina y sulfasalazina sobre la secreción de IL-10 inducida por LPS. Las células fueron tratadas con el vehículo (DMSO: 0.1% v/v) (datos no mostrados), los flavonoides indicados (A) o sulfasalazina (Sulf) (B). Transcurrida 1 hora, los macrófagos se estimularon con LPS (10 ng/ml) durante 24 horas y se analizó por ELISA el contenido en IL-10 en el medio de cultivo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar de la secreción de IL-10. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  con respecto al control estimulado con LPS.

## **2. Efecto de la administración de quercitrina en un modelo de colitis experimental *in vivo***

Una vez establecida la actividad de varios flavonoides *in vitro*, se seleccionaron la quercetina, la luteolina y la genisteína para su ensayo *in vivo*. En primer lugar se llevó a cabo el estudio del efecto de estos tres compuestos en un modelo de colitis experimental inducido por la administración intrarrectal del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) en ratas. Sin embargo, el tratamiento de los animales con dosis de estos flavonoides comprendidas entre 1 y 5 mg/kg por día vía oral no produjo mejora significativa del daño inflamatorio en ningún caso (datos no mostrados). Nuestro grupo de investigación ha realizado anteriormente tratamientos de ratas con colitis inducida con TNBS utilizando un heterósido de la quercetina, la quercitrina (quercetina-3-L-ramnósido). Este compuesto produjo una mejora de la colitis, lo que sugiere que la biodisponibilidad de la genina puede jugar un papel muy importante (la quercitrina no tiene actividad *in vitro*). Teniendo en cuenta los datos que hoy se conocen sobre la farmacocinética de los flavonoides, es bastante probable que este heterósido permanezca intacto durante el tránsito intestinal hasta su llegada al colon, donde sufriría hidrólisis por parte de las bacterias que constituyen la flora colónica, liberando la quercetina, que presumiblemente es el componente activo. En este trabajo nos hemos propuesto verificar la validez de esta hipótesis, utilizando el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico (DSS).

Los animales expuestos a DSS en el agua de bebida experimentaron un aumento del IAE (índice de actividad de la enfermedad), como se muestra en la Figura 28. Dicho índice consta de una serie de apartados, cada uno de los cuales posee una puntuación y, de acuerdo a la misma, se evalúa la eficacia de los tratamientos (Tabla 3 de material y métodos). En los animales tratados con quercitrina (1 mg/kg/día) se produjo un descenso de este índice a partir del quinto día; sin embargo no ocurrió lo mismo en el caso de la quercetina, cuyos valores permanecieron prácticamente como los de los animales sin tratar.



**Figura 28.** Evolución del IAE durante el tratamiento. (Q) quercetina, (QR) quercitrina (DSS) sulfato de dextrano. \*\*P<0,01 frente a DSS control.

El tratamiento con quercitrina produjo asimismo una reducción de la actividad de la enzima mieloperoxidasa colónica, además de una reducción en los niveles de la enzima iNOS, determinada por western blot, y de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF (Tabla 11). Por el contrario, el tratamiento con quercetina no produjo efecto alguno.

**Tabla 11.** Determinación de parámetros proinflamatorios. Tratamiento con quercitrina *in vivo*

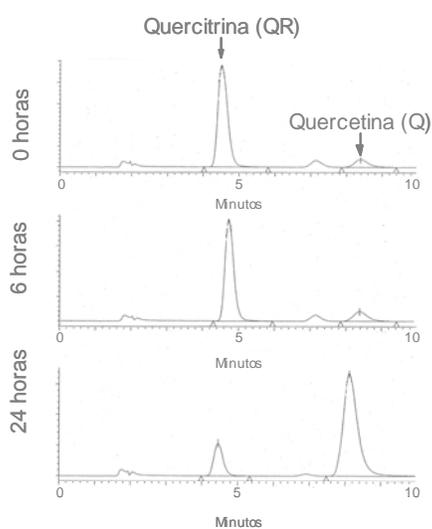
	Blancos	Control DSS	DSS+Quercitrina
MPO(U/g tejido)	15.1 $\pm$ 1.4	131.0 $\pm$ 2.4 #	77.3 $\pm$ 6.1 *
IL-1 $\beta$ (pg/g tejido)	497.4 $\pm$ 63.9	1337.1 $\pm$ 230.4 #	711.4 $\pm$ 62.4 *
TNF (pg/g tejido)	191.1 $\pm$ 27.4	846.1 $\pm$ 93.5 #	241.7 $\pm$ 62.9 *
iNOS (U arbitrarias)	2864.5 $\pm$ 703.6	7477.0 $\pm$ 63.6 #	2791.7 $\pm$ 733.0 *

Los resultados se expresan como valor medio  $\pm$  desviación estándar (n=8) en todos los casos exceptuando la medida de iNOS por WB, donde (n=3). #P < 0.005 frente a Blanco; \* P< 0.005 frente a Control DSS.

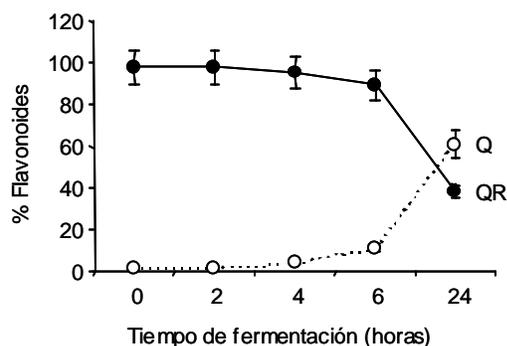
Estos resultados apoyan la hipótesis farmacocinética. Para corroborar esta hipótesis, se sometió el heterósido a una incubación con bacterias del contenido colónico de las ratas

con el fin de comparar *in vitro* los efectos de la quercitrina con los de su genina, la quercetina, y con los del homogenado resultante de la fermentación bacteriana.

Las muestras fecales (50 mg/ml) se incubaron en presencia de 5 mg/ml de quercitrina (QR) durante los tiempos indicados y se analizaron por HPLC (Figura 29). Como se observa en la gráfica de la Figura 30, a partir de las 6 horas se empieza a detectar quercetina (Q) y los niveles del heterósido van descendiendo.



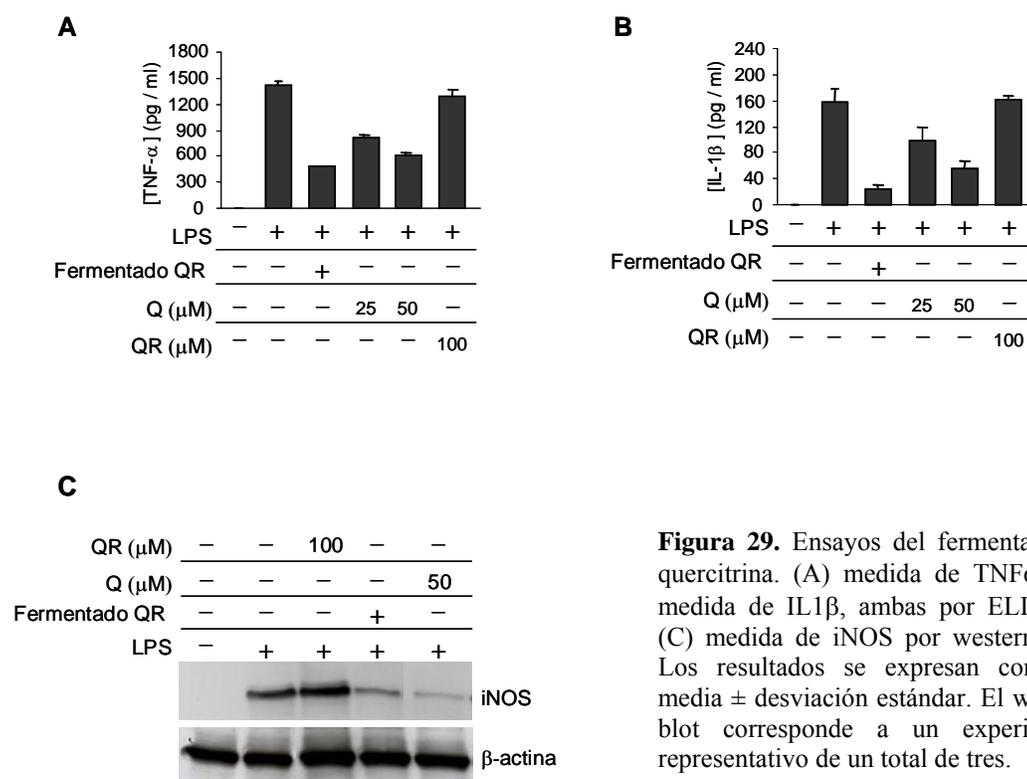
**Figura 29.** Fermentación de quercitrina por parte de la microflora intestinal. Las bacterias del intestino son capaces de hidrolizar la quercitrina dejando libre la genina quercetina. Histogramas de HPLC.



**Figura 30.** Cuantificación del área de los picos del histograma de HPLC. A partir de las 6 horas de fermentación los niveles de quercetina liberada tras la hidrólisis de la quercitrina son ya detectables.

Para comprobar que la quercetina derivada de la fermentación es igualmente activa, se ensayó el efecto del homogenado fecal sobre la producción de TNF, IL-1 $\beta$  e iNOS en

macrófagos estimulados con LPS. Como se observa en la Figura 29A y B, el fermentado de quercitrina, que posee una concentración de la genina de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , es capaz de inhibir la producción de TNF e IL-1 $\beta$  por parte de los macrófagos estimulados con LPS. De igual forma, la quercetina y el fermentado produjeron un descenso en los niveles de la proteína iNOS (Figura 29C).





---

## *Discusión*



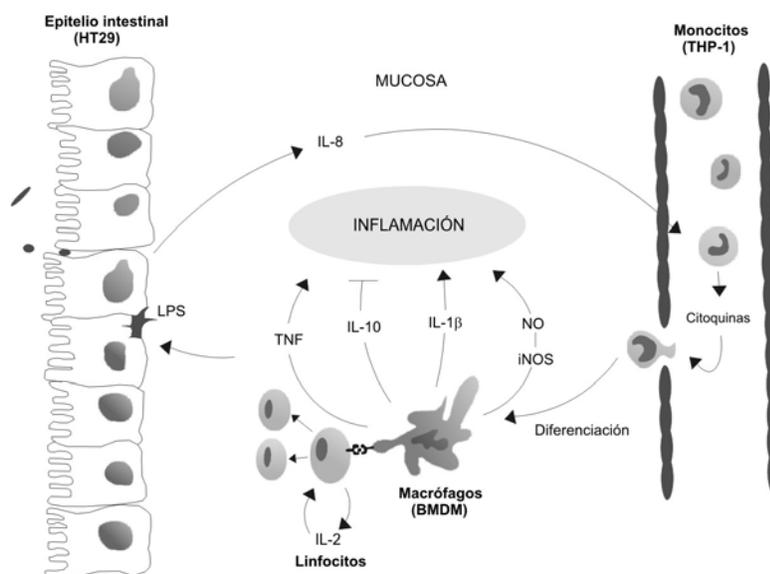
## DISCUSIÓN

La EII engloba a una serie de enfermedades de carácter crónico que afectan al tracto gastrointestinal y cuya causa se desconoce, si bien se observa un consenso general en torno a los factores que determinan la aparición de esta enfermedad. Así, parece que las bacterias que interactúan de forma directa con la superficie epitelial, o que penetran a través de una barrera defectuosa, activan a las células del sistema inmune. Entre ellas, los macrófagos y las células epiteliales tienen un papel clave en la respuesta inflamatoria. Entre sus funciones destaca su capacidad para producir citoquinas y otros mediadores encargados de la defensa del organismo, y que en caso de inflamación crónica, no hacen sino agravar y mantener el proceso.

El objetivo general de esta tesis doctoral es la caracterización de la relación estructura-actividad de los flavonoides como agentes moduladores de la secreción de mediadores inflamatorios, con el objetivo último de identificar los miembros de esta familia de compuestos que puedan ser útiles en el tratamiento de la EII. Nuestra aproximación a este objetivo ha consistido en analizar el efecto diferencial de una serie de flavonoides en varios modelos celulares *in vitro*, a través de la determinación de la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-8, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6) y antiinflamatorias (IL-10), así como la enzima iNOS. Además se ha estudiado el mecanismo molecular implicado, prestando especial interés a la vía de señalización regulada por el factor de transcripción NF $\kappa$ B. La selección de los flavonoides ensayados se ha basado en sus características como antioxidantes y su diversidad química, que nos permite establecer los requerimientos estructurales involucrados en su actividad farmacológica.

Los modelos celulares empleados han sido líneas celulares establecidas, como las células HT29 (colonocitos humanos), HT29-MTX (células caliciformes humanas), THP-1 (monocitos humanos) y dos tipos de cultivos primarios: macrófagos diferenciados a partir de células pluripotenciales de la médula ósea y linfocitos de bazo, ambos

procedentes de ratón. Estos modelos representan los principales tipos celulares involucrados en el proceso inflamatorio del intestino (Figura 30).

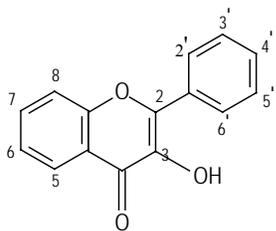
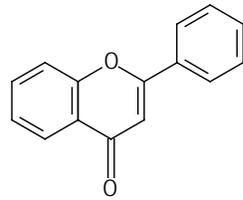
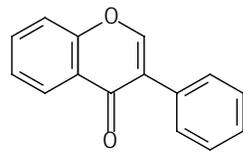
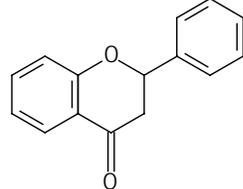


**Figura 30.** Las células de la inflamación. Esquema de las células implicadas en el proceso inflamatorio que han sido utilizadas para los experimentos.

En relación a los flavonoides y para establecer la estructura ideal hemos analizado separadamente, en la medida de lo posible, la contribución de distintos grupos estructurales al efecto antiinflamatorio, principalmente:

- El doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C; presente en flavonoles, flavonas e isoflavonas y ausente en flavanonas.
- El grupo OH en 3 propio de los flavonoles.
- Sustituyentes en las posiciones 3' y 4' del anillo B.
- La posición iso del anillo B, propia de las isoflavonas.

**Tabla 12.** Estructura química de los flavonoides estudiados.

Fórmula química	Nombre	Sustituyentes			
		5	7	3'	4'
<b>Flavonoles</b>					
	Kanferol	OH	OH	H	OH
	Quercetina	OH	OH	OH	OH
<b>Flavonas</b>					
	Apigenina	OH	OH	H	OH
	Crisina	OH	OH	H	H
	Diosmetina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
	Luteolina	OH	OH	OH	OH
<b>Isoflavonas</b>					
	Daidzeína	OH	H	H	OH
	Genisteína	OH	OH	H	OH
<b>Flavanonas</b>					
	Hesperetina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>

### **1. Efecto de los flavonoides sobre células epiteliales**

El epitelio intestinal constituye la primera barrera frente a los antígenos lumbales potencialmente patógenos. Además, estas células tienen la capacidad de producir quimioquinas de manera programada en respuesta a antígenos. Estas sustancias, entre las que se encuentra la IL-8, provocan la extravasación de leucocitos circulantes hacia la mucosa, donde constituirán una línea de defensa importante frente a los patógenos invasores. De hecho, la secreción de citoquinas por el epitelio es suficiente para producir inflamación intestinal *in vivo* (Ohtsuka et al., 2001). Como modelo de células epiteliales colónicas hemos utilizado la línea celular HT29, que produce grandes cantidades de IL-8 en respuesta al LPS.

En un principio la IL-8 (CXCL8) se describió como un importante agente quimiotáctico para neutrófilos, pero también lo es para otros leucocitos, como basófilos y células T. La IL-8 puede ser producida tanto por células leucocíticas como por células endoteliales, epiteliales y fibroblastos. Numerosos ensayos *in vitro* revelan que en el intestino inflamado la migración de neutrófilos desde los vasos depende de la secreción de IL-8 por parte de células epiteliales. Pero la IL-8 por sí sola no induce la penetración de los neutrófilos a través de la barrera epitelial hacia el lumen. Para esto es necesaria la producción de factores quimiotácticos adicionales como el PEEC (Pathogen Elicited Epithelial Chemoattractant) por parte del epitelio (Kucharzik y Williams, 2002-2003). La IL-8 es una quimioquina inducible, de manera que es difícilmente detectable en células sin estimular. Sus niveles se elevan en respuesta a citoquinas proinflamatorias como el TNF, la IL-1 $\beta$ , o estímulos como el LPS. Se une a dos tipos de receptores (CXCR1 y CXCR2), induciendo la síntesis de distintas moléculas de adhesión (Strieter, 2002). Su producción se regula sobre todo a nivel transcripcional, pero también postranscripcional, y de forma distinta dependiendo del tipo celular. El promotor de IL-8 contiene secuencias diana de factores de transcripción como el NF $\kappa$ B, AP-1 y CEBP $\beta$  (también conocido como NFIL6), entre otros. La unión de uno de ellos, dependiendo del

tipo celular, podría resultar suficiente para inducir la síntesis de IL-8, pero la colaboración de estos tres parece imprescindible para conseguir una inducción máxima (Ben-Baruch et al., 1995).

Los flavonoides empleados produjeron un descenso de los niveles de IL-8, y los que resultaron más efectivos fueron la genisteína y la daidzeína, pertenecientes al grupo de las isoflavonas, así como las flavonas apigenina y luteolina. Si bien no hemos examinado los mecanismos implicados en este efecto, podemos decir que no se debe a una acción tóxica sobre las células, ya que los flavonoides no presentaron efecto alguno sobre la viabilidad celular.

Analizando la relación estructura-actividad en este caso podemos decir que el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C es necesario para presentar actividad, puesto que la hesperetina, que carece del mismo, resultó ineficaz. La menor actividad de los flavonoles hace pensar que el OH en 3 propio de este grupo restaría actividad. La presencia de sustituyentes en el anillo B es necesaria para el efecto, ya que la crisina no resultó activa. Los resultados obtenidos apuntan a que un sustituyente es necesario, pero dos no, ya que la apigenina y la luteolina resultaron igualmente activas. Por último, la posición iso del anillo B incrementa la eficacia inhibidora de IL-8, ya que las isoflavonas presentaron más actividad.

Actualmente se están realizando experimentos en nuestro grupo con el fin de dilucidar el mecanismo de acción de los flavonoides estudiados sobre la expresión de IL-8 en las células HT29. En un primer momento, establecimos como hipótesis que los flavonoides podían actuar inhibiendo la vía de activación del factor nuclear  $\kappa$ B. Sin embargo, a pesar de que en bibliografía está descrito que la señal del LPS produce la activación de dicha vía (Abreu et al., 2001), no fuimos capaces de detectar un aumento de fosforilación de  $I\kappa$ B $\alpha$ , ni migración de la subunidad p65 al núcleo. No podemos explicar el porqué de este hecho, aunque es posible que los intervalos temporales utilizados no sean los adecuados. Una aproximación utilizada ha sido el uso de genes informantes "reporter".

Las células HT29 presentan muchas dificultades para su transfección, por lo que se ha empleado la línea celular epitelial de intestino delgado de rata IEC-18. En estas células se observa un aumento de la actividad NF $\kappa$ B tras la estimulación con LPS, por lo que constituyen un buen sistema para evaluar el mecanismo de acción de los compuestos objeto de estudio en esta tesis.

Se ha descrito en varios sistemas celulares que la activación por LPS genera la producción de radicales libres que actuarían como segundos mensajeros en el proceso de activación del NF $\kappa$ B ((Park et al., 2004), lo cual nos lleva a plantear la importancia de la actividad antioxidante de los flavonoides como posible causa del efecto observado. Éste es sin embargo un tema algo controvertido, puesto que ha quedado demostrado que productos como la NAC (N-Acetil-L-Cisteína) o el PDTC (Pirrolidin Di-Tio-Carbamato) inhiben la activación de NF $\kappa$ B independientemente de su función antioxidante (Hayakawa et al., 2003). En nuestro caso, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos decir que las propiedades antioxidantes no son las más importantes en el efecto inhibitor, ya que la quercetina, el más potente antioxidante de los compuestos utilizados, tuvo menos actividad que las isoflavonas (daidzeína y genisteína) y las flavonas (apigenina y luteolina).

A continuación, y dentro de los ensayos con células del epitelio intestinal, utilizamos la línea HT29-MTX como modelo de células productoras de moco para analizar el efecto de los flavonoides sobre la secreción de mucinas y factores “trébol”. Estas células crecen formando una monocapa sobre la placa de cultivo, momento a partir del cual aumenta progresivamente la secreción de mucinas y factores “trébol”, alcanzando un máximo en torno a las 2 semanas después de la confluencia. Las mucinas constituyen una barrera de defensa frente a las agresiones procedentes del lumen, de forma que un debilitamiento de la misma podría favorecer la entrada de antígenos luminales hacia la mucosa, provocando una respuesta inflamatoria. Como ya hemos comentado, se ha asociado la EII a una alteración en la producción de mucinas, tanto en la EC (Buisine et al., 2001), como en la CU (Tytgat et al., 1996).

El TFF3 pertenece a una familia de polipéptidos caracterizados por la presencia de al menos una copia del motivo trébol, una estructura formada por tres puentes disulfuro en un segmento de 40 aminoácidos (Faith et al., 2004). Existen tres factores “trébol” distintos: TFF1, TFF2 y TFF3. Este último se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal, concretamente en las células caliciformes, junto con las mucinas. Posee una función protectora, curativa y supresora de tumores, así como de lesiones en la mucosa intestinal, por lo que las alteraciones en su expresión se han relacionado con enfermedades crónicas como la EII. Los ratones que sobreexpresan TFF3 son más resistentes al daño intestinal (Marchbank et al., 2001) y los que carecen del mismo son mucho más susceptibles de padecer la enfermedad (Mashimo et al., 1996).

En los experimentos se han utilizado los flavonoides que presentaron más actividad inhibidora de la IL-8 y, entre ellos, la flavona luteolina es el único compuesto que ha producido un aumento en la expresión del TFF3. El resto de mucinas estudiadas no se modificó por acción de los flavonoides. Se ha demostrado que el TFF3 se encuentra aumentado en la colitis experimental y éste parece tener un papel beneficioso (Daddaoua et al., 2005; Gonzalez et al., 2004; Renes et al., 2002; Vestergaard et al., 2004). Dado que el TFF3 interviene en procesos de mantenimiento y reparación tisular, el aumento de TFF3 que produce la luteolina podría prevenir el agravamiento de las ulceraciones propias de la EII.

## **2. Efecto de los flavonoides sobre monocitos humanos**

En el intestino inflamado se produce un flujo continuo de monocitos desde la sangre a la mucosa, donde se diferencian a macrófagos, pasando por distintos estados de activación. Las células THP-1 se han empleado como modelo de monocitos humanos. Estas células producen diversas citoquinas proinflamatorias al ser estimuladas con LPS y PMA durante 24 horas. El PMA se ha utilizado para promover su maduración (Weiss et al., 2004), si bien no se consigue con ello que adopten el fenotipo de macrófago maduro propiamente dicho.

Los monocitos y macrófagos constituyen la fuente más importante de TNF e IL-1 $\beta$ , ambas implicadas en el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria y cuya síntesis se regula tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Entre los estímulos que aumentan la síntesis de TNF e IL-1 $\beta$  se encuentran los ligandos de los receptores tipo "Toll" (TLRs), como el LPS, que se une al TLR4, además de las propias citoquinas mencionadas, entre otras.

En las células THP-1 el LPS aumenta la secreción de TNF promoviendo la migración nuclear del NF $\kappa$ B, junto con c-Jun y ATF-2, lo que favorece la unión de éstos a su promotor (Joyce et al., 2001). En situación de reposo se puede detectar mRNA de TNF, pero se mantiene de forma inactiva. El control de la degradación del mRNA es un importante mecanismo de regulación postranscripcional, y está influenciado por la producción local de citoquinas como la IL-4 y la IL-10, que desestabilizan el mRNA, o el IFN $\gamma$ , que lo estabiliza (Makhatadze, 1998).

La IL-1 $\beta$  es sintetizada como un precursor que debe sufrir proteólisis por parte de la caspasa 1 para generar la forma madura y activa. Ambos procesos están sujetos a una estricta regulación. En la síntesis del precursor intervienen mecanismos que pueden ser iniciados por la propia IL-1 $\beta$  o por TNF, PMA o ligandos de los receptores Toll, como el LPS, y en los que interviene también el NF $\kappa$ B y otros factores de transcripción como

el AP-1, CREBP, NFIL6 o el NF $\beta$ A. Sin embargo es necesario un segundo estímulo que promueva la degradación del precursor inactivo. De esta regulación post-traducciona se encargan, entre otros, el LPS, toxinas bacterianas o el estrés hipotónico. Así, el LPS actúa a ambos niveles, es decir, la activación de la transcripción del gen de IL-1 $\beta$ , aumentando los niveles del precursor, y la activación moderada de la caspasa 1, sin ser extremadamente eficiente en ninguno de ellos (Schumann et al., 1998). Nuestros resultados muestran que la apigenina, la diosmetina, la luteolina y la quercetina produjeron una inhibición superior al 50% a la concentración mínima ensayada (25  $\mu$ M). El estímulo empleado produce la fosforilación de MAP quinasas y ERK 1/2, culminando en la activación del NF $\kappa$ B (Weiss et al., 2004). Es posible que los flavonoides actúen inhibiendo estos mecanismos de transducción de señal. Comparando los porcentajes de inhibición de la IL-1 $\beta$  con los obtenidos para el TNF, y dado que ambas citoquinas están reguladas por mecanismos comunes, es posible que los flavonoides actúen inhibiendo la caspasa 1, lo que permitiría explicar el hecho de que se observe una mayor inhibición en la secreción de IL-1 $\beta$  que de TNF.

En monocitos humanos (THP-1) los requerimientos estructurales para la actividad inhibidora de la secreción fueron prácticamente idénticos para el TNF y la IL-1 $\beta$ . En el primer caso los flavonoides más eficaces fueron la luteolina y la diosmetina, seguidos de la apigenina y la quercetina. La daidzeína y la hesperetina fueron los menos eficaces, seguidos del kanferol. En la inhibición de la IL-1 $\beta$  los flavonoides más activos fueron las flavonas luteolina, apigenina y diosmetina y el flavonol quercetina. Analizando estos resultados podemos concluir que el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 es necesario, ya que la hesperetina resulta ineficaz. El OH en 3 resta cierta actividad inhibidora, puesto que las flavonas fueron más eficaces que los flavonoles. En cuanto al anillo B, parece que en el caso de los flavonoles es necesaria la presencia de dos sustituyentes; así, la quercetina fue más activa que el kanferol tanto en el caso del TNF como de la IL-1 $\beta$ . En el caso del TNF ocurre lo mismo con las flavonas, ya que la luteolina es más eficaz que la apigenina, y la ausencia de uno de los hidroxilos en B o su sustitución por

un grupo metoxilo (es el caso de la diosmetina) resta eficacia. Sin embargo, para la IL-1 $\beta$ , la ausencia de sustituyente en 3' resulta beneficiosa, dado que la apigenina mostró más actividad que la luteolina o la diosmetina. Finalmente, la posición iso del anillo B reduce la actividad, puesto que la apigenina es más eficaz que la genisteína. Globalmente, la luteolina se comportó como el flavonoide más activo en los dos casos.

La IL-6 juega un importante papel en la inducción de la respuesta de fase aguda. Los niveles de expresión normales son muy bajos, y se induce en caso de infección, trauma u otro tipo de estrés. Se ha demostrado que los niveles de este mediador aparecen elevados en la mucosa inflamada de pacientes con EII (Mitsuyama et al., 1991), por lo que consideramos interesante también evaluar el efecto de los flavonoides en su producción. Su activación está regulada por NF-kB, AP-1, NFIL6 y CREB. En la activación por NF-kB participan ERK 1/2 y p38. Es interesante asimismo destacar que la IL-6 es uno de los mediadores proinflamatorios secretados por las células Th17, recientemente identificadas como subpoblación de linfocitos T implicados en enfermedades autoinmunes y en la EII (Yen et al., 2006). Todos los flavonoides estudiados, a excepción de la flavanona hesperetina, se mostraron activos en la inhibición de la IL-6. Se ha descrito que el LPS activa a Jak2 y Stat5 y que esta activación es necesaria y exclusiva para la producción de IL-6 y no de otras citoquinas (Kimura et al., 2005). Este mecanismo diferencial podría explicar que los flavonoides estudiados sean mucho más activos en la inhibición de IL-6 que en la de las otras citoquinas estudiadas.

En cuanto a los ensayos de toxicidad, ha quedado claro en los experimentos realizados que los estímulos empleados producen cierto efecto nocivo sobre las células, pero este no se ve aumentado en presencia de los flavonoides. Así, el efecto antiinflamatorio es consecuencia de un efecto específico sobre los mecanismos intracelulares.

### **3. Efecto de los flavonoides sobre linfocitos murinos procedentes de bazo**

Los linfocitos se encuentran en reposo en condiciones normales y cuando se activan producen IL-2, el principal factor autocrino de estas células, que estimula su propia proliferación. La IL-2 interacciona con su receptor específico en la superficie del linfocito induciendo la expansión clonal de linfocitos T efectores. Los niveles plasmáticos tanto de la IL-2 como de su receptor soluble se encuentran aumentados en los pacientes de EII. También se ha detectado un aumento de su producción en la mucosa inflamada (Kountouras et al., 2004). Puesto que interviene en el desarrollo de la respuesta inmunológica se podría pensar que una inhibición de su síntesis resultaría beneficioso para impedir el desarrollo del proceso inflamatorio. De hecho, se han obtenido resultados positivos mediante la administración de fármacos como la ciclosporina A a pacientes de CU resistentes a los corticoides (Hanauer, 2004). La ciclosporina A es un fármaco inmunomodulador que se une a la calcineurina, bloqueando su actividad fosfatasa e inhibiendo así las señales calcio-dependientes que intervienen en la activación del linfocito T, particularmente la secreción de IL-2. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la IL-2 tiene un papel fundamental también en la promoción de células T reguladoras, encargadas del mantenimiento de la tolerancia (Malek y Bayer, 2004), por lo que una inhibición descontrolada de su producción podría dar lugar precisamente al efecto contrario al buscado. Se ha comprobado que, *in vivo*, la IL-2 no es absolutamente necesaria para el desarrollo de la respuesta de células T, en tanto que sí es imprescindible para la promoción de células T reguladoras (Malek y Bayer, 2004).

Para evaluar el papel de los flavonoides sobre la secreción de este mediador se obtuvieron linfocitos de bazo de ratones de la cepa Balb/C. Estas células se activan con concanavalina A, que se une directamente al receptor antigénico, y tardan unas 24 horas en comenzar a proliferar. Como resultado, producen grandes cantidades de IL-2 y otras citoquinas. Hemos empleado la ciclosporina A como control positivo y la sulfasalazina como fármaco de referencia. Los flavonoides estudiados produjeron una inhibición casi

total de la expresión de esta citoquina. Como ocurre con la IL-6, existe mucha menos especificidad y lo más destacable es que todos ellos resultaron igual o mucho más eficaces que la sulfasalazina. De hecho, aunque tanto ésta como la daidzeína y la hesperetina inhibieron la producción de IL-2 en torno a un 40% ( $P < 0,001$ ), el porcentaje de inhibición del resto de los flavonoides fue muy superior, cercano al 100% (Figura 16). Dado que no se han ensayado concentraciones inferiores, no es posible realizar una estimación de la potencia relativa de los flavonoides, aunque la eficacia es indudablemente muy grande.

La síntesis de IL-2 está regulada principalmente a nivel transcripcional. La activación del receptor de linfocitos T (TCR) produce la activación de tirosín quinasa que ponen en marcha un mecanismo dependiente de la fosfolipasa  $C\gamma$  ( $PLC\gamma$ ) y de la calcineurina que culmina en la activación de tres factores de transcripción: NFAT (NFATc1 y NFATc2),  $NF\kappa B$  y AP-1. Este proceso, no obstante, no es suficiente para que se consiga la síntesis máxima de IL-2; para ello es necesaria la señal coestimuladora de moléculas accesorias como el CD28.

Los flavonoides inhiben a numerosas quinasa compitiendo con el ATP por su sitio de unión (Hendriks et al., 2004; Middleton et al., 2000). Las quinasa están implicadas en un amplio número de procesos celulares, incluyendo la activación y proliferación, lo que convierte a los flavonoides en compuestos con múltiples dianas potenciales de actuación intracelulares. Como puede observarse, tanto los flavonoides como la sulfasalazina y la ciclosporina A presentan una magnífica correlación entre ambos, y el efecto conseguido es muy significativo.

En relación al ensayo de reducción del reactivo WST-1, si interpretamos el resultado obtenido como representativo del efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de las células, estaríamos ante un hecho sorprendente, ya que cabría esperar un efecto nocivo en su uso *in vivo*. Sin embargo, esto no es así, como hemos demostrado con el éxito del tratamiento con quercitrina de ratas con colitis experimental. Con el objetivo de

profundizar en este punto, se llevarán a cabo estos experimentos con esplenocitos de rata y con linfocitos de *lamina propria* en presencia de IL-2, para determinar si el efecto antiproliferativo es *per se*, o derivado de la inhibición de esta citoquina. Asimismo se propone realizar la determinación de la actividad LDH para obtener más información sobre el efecto nocivo y antiproliferativo.

#### **4. Efecto de los flavonoides sobre macrófagos murinos derivados de médula ósea**

Los macrófagos proliferan en presencia de su factor de crecimiento específico (M-CSF), y cuando son activados por estímulos como el LPS, dejan de proliferar y adoptan un fenotipo activado, caracterizado por cambios morfológicos y por la expresión de citoquinas como TNF, IL-1 $\beta$  y otros mediadores como el NO (Xaus et al., 2001). Además, los macrófagos activados secretan IL-10, una citoquina antiinflamatoria que posee la capacidad de inhibir la respuesta inmunológica *in vivo* (Jung et al., 2004). Hemos decidido utilizar cultivos primarios de macrófagos porque, a diferencia de otras líneas celulares inmortales, éstos constituyen un mejor modelo para caracterizar los mecanismos involucrados en la proliferación, supervivencia y activación celular (Xaus et al., 2001). Para facilitar la discusión, los resultados se presentan en la Tabla 13

**Tabla 13.** Efecto de los flavonoides sobre la fisiología de los macrófagos y análisis de la relación estructura-actividad. Resumen.

Grupo	Flavonoide	Prolif	TNF	iNOS	I $\kappa$ B $\alpha$ -P	IL-10
Flavonoles	Kanfèrol	+++	++	±	±	-
	Quer cetina	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonas	Apigenina	++	++	+++	++	-
	Crisina	++	+	±	±	-
	Diosmetina	+++	++	++	++	-
	Lutteolina	+++	+++	+++	+++	+++
Isoflavonas	Daidzeína	±	±	±	±	-
	Genisteína	+	++	±	±	-
Flavanonas	Hesperetina	+	++	±	±	±
	3 – anillo B	+	±	+	+	+
Grupos estructurales	C <sub>2</sub> =C <sub>3</sub>	+	±	+	+	±
	3',4' – OH	?	+	±	+	+
	3 – OH	±	±	±	±	±

La magnitud del efecto se ha clasificado de forma semicuantitativa. La inhibición se muestra como +/++/+++/-, excepto para la IL-10, donde +++ significa incremento y - significa inhibición. La ausencia de efecto se señala con ±. La contribución de los grupos estructurales se muestra como + (positiva), - (negativa), ± (irrelevante) o ? (desconocida).

Nuestros datos demuestran que la mayoría de los flavonoides empleados poseen un efecto antiproliferativo sobre los macrófagos, en buena medida independiente de un posible efecto tóxico o proapoptótico, dado que en los estudios de citotoxicidad con cristal violeta, la viabilidad celular no se afectó a 50  $\mu$ M ni a concentraciones inferiores. Además, hemos demostrado que diferentes grupos de flavonoides (flavonoles y flavonas) inhiben la producción de TNF e iNOS, mientras que otros grupos (isoflavonas y flavanonas) poseen un efecto inhibitorio mínimo. Estos resultados sugieren la existencia de una relación estructura-actividad en lo referente al efecto de estos compuestos sobre la fisiología de los macrófagos. Hemos demostrado también que el efecto inhibitor sobre la activación de estas células está relacionado, al menos en el caso de la expresión de iNOS, con la inhibición del factor de transcripción NF $\kappa$ B, que se activa como resultado de la estimulación con LPS. Finalmente se ha demostrado que sólo la luteolina y la quercetina son capaces de inducir un aumento en la expresión de IL-10 en los macrófagos, un efecto que puede resultar de gran interés para la actividad antiinflamatoria *in vivo*.

La mayoría de los flavonoides ensayados tiene un efecto antiproliferativo significativo sobre los macrófagos estimulados con M-CSF, pero los flavonoles y las flavonas son claramente más eficaces que las isoflavonas o flavanonas. En este caso, la posición iso del anillo B y la ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 parece estar correlacionada negativamente con la actividad antiproliferativa. El NF $\kappa$ B está implicado en mecanismos antiinflamatorios, pero además interviene en la supervivencia y proliferación celulares (Karin y Lin, 2002). Sin embargo, podemos descartar esta posibilidad en nuestro modelo celular, ya que, si bien los flavonoides inhiben la proliferación inducida por M-CSF, no afectan a la viabilidad de los macrófagos a las concentraciones utilizadas. Además, el NF $\kappa$ B no juega un papel fundamental en la proliferación de los macrófagos, puesto que la sulfasalazina, que inhibe el NF $\kappa$ B, a las concentraciones utilizadas no afecta a la proliferación.

Analizando los efectos de los flavonoides sobre la activación de los macrófagos, observamos diferentes respuestas dependiendo del marcador utilizado (TNF o iNOS). Así, los flavonoides que poseen grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4' (quercetina y luteolina) mostraron el mayor grado de inhibición de la secreción de TNF, seguidos de aquéllos con sólo un hidroxilo en el anillo B (genisteína, kanferol, apigenina, diosmetina y hesperetina), sin tener en cuenta la presencia del doble enlace C2-C3, el grupo hidroxilo en 3 o la posición iso del anillo B. La ausencia de grupos hidroxilo en el anillo B parece acabar con el efecto inhibitorio.

Los requerimientos estructurales con respecto a la iNOS difieren significativamente, puesto que las isoflavonas y la flavanona son esencialmente ineficaces, lo cual sugiere un papel determinante de la posición del anillo B y del doble enlace entre C2 y C3. A pesar de que el western blot es una técnica semicuantitativa, las flavonas parecen resultar más activas que los flavonoles. Entre las flavonas se requieren al menos tres grupos hidroxilo para conseguir un efecto importante (apigenina, luteolina, diosmetina), mientras que en el caso de los flavonoles se requiere un grupo hidroxilo extra (quercetina). Resultados similares se han descrito para la apigenina, la luteolina y la quercetina en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (Kim et al., 1999).

La relación estructura-actividad observada en macrófagos murinos derivados de médula ósea difiere de la relacionada con la inhibición de la proliferación de células T inducida por antígenos, en las que las flavonas son más activas que los flavonoles y las flavanonas (Verbeek et al., 2004). En nuestro modelo experimental no hemos podido hacer esta generalización entre los grupos de flavonoides, dado que el flavonol quercetina y la flavona luteolina fueron igualmente activos. Es importante tener en cuenta que con los resultados obtenidos no podemos dar especial relevancia al grupo hidroxilo en posición 3, que juega, según bibliografía, un importante papel en diversas propiedades de los flavonoides como la actividad antioxidante (ver más abajo) o la inhibición de DNA topoisomerasas descrita por Constantinou et al. (1995).

Una vez descritos los efectos de los flavonoides en la activación (establecida por la producción de TNF e iNOS) y proliferación de los macrófagos, pasamos al estudio de su mecanismo de acción. La activación de los macrófagos producida por la unión del LPS a su receptor TLR4 desencadena una cascada de fosforilaciones que conducen a la activación de factores de transcripción y al aumento de la producción de citoquinas e iNOS. Algunos de los mecanismos implicados incluyen a la familia de las Src tirosín quinasas, serín/treonín quinasas, proteín quinasa A y C (PKA, PKC), MAPKs (mitogen-activated protein kinases), proteín quinasa B/Akt (PI-3K/Akt) y el factor de transcripción NF $\kappa$ B.

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio del efecto de los flavonoides sobre la vía del NF $\kappa$ B, que está implicado en la inmunidad innata y juega un papel importante en la inflamación, regulando la transcripción de numerosos genes proinflamatorios. Por ello, el bloqueo de su activación constituye una diana terapéutica en el tratamiento de la EII. En la última década han aparecido numerosos trabajos en los que se estudia el papel de los flavonoides, de quercetina principalmente, sobre la activación de este factor nuclear. Entre los mecanismos descritos destacan la capacidad de algunos de estos compuestos para inhibir a las quinasas IKK (Chen et al., 2005a; Chen et al., 2005b; Dias et al., 2005), y la translocación nuclear de las subunidades que forman el factor activado (Li et al., 2005; Shukla y Gupta, 2004). En muchos de estos estudios, este efecto se ha traducido en la inhibición de la expresión de iNOS y de citoquinas como el TNF o la IL-1 $\beta$  (Cho et al., 2003).

Nuestros resultados demuestran que sólo la quercetina, la luteolina y la diosmetina inhiben la fosforilación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . Por tanto, la correlación entre la interferencia en la ruta del NF $\kappa$ B y la inhibición de la activación de los macrófagos no es perfecta, y existe una mejor correlación con la expresión de iNOS que con la secreción de TNF. Esto ocurre también con la sulfasalazina, un inhibidor de NF $\kappa$ B, que produce una inhibición total de la expresión de iNOS y sólo modesta en el caso del TNF. Además, algunos de los flavonoides (quercetina, luteolina y genisteína) son más eficaces

que la sulfasalazina en la inhibición del TNF. Esto sugiere que deben existir mecanismos adicionales sobre los que actúan los flavonoides. Las MAP quinasas son un grupo de serín/treonín quinasas que en macrófagos se activan como resultado de la unión del LPS a su receptor TLR4, entre otros estímulos. Muchos estudios han demostrado que la inhibición de la activación de ERK-1/2, JNK y p38 afectan a la producción de TNF en macrófagos estimulados con LPS (Martin et al., 2005; Verbeek et al., 2004) y se ha descrito que la luteolina inhibe su liberación en células RAW 264.7 a través de l bloqueo de ERK, p38 y CK2 (Xagorari et al., 2002).

Finalmente, puesto que está establecido que la respuesta inflamatoria puede controlarse con la eliminación de células inflamatorias o a través de la liberación de mediadores antiinflamatorios endógenos como la IL-10 y el TGF- $\beta$  (Di Giacinto et al., 2005; Torre et al., 2000), decidimos analizar el efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL-10 inducida por LPS en macrófagos. Hemos demostrado que la luteolina y la quercetina estimulan la secreción de esta citoquina. La diferencia del efecto de estos dos flavonoides comparado con el de la apigenina y los otros compuestos constituye una evidencia adicional de que el NF $\kappa$ B no es la única vía afectada por los flavonoides. La expresión de IL-10 se induce a través de la activación de JNK, ERK 1/2, p38 y NF $\kappa$ B (Nemeth et al., 2005). Aunque la IL-10 puede inhibir la secreción de IL-1 $\beta$  y TNF, el efecto ejercido por los flavonoides quercetina y luteolina en este sentido no debe estar relacionado con este mecanismo, dado que la IL-10 en monocitos/macrófagos se induce con posterioridad a las citoquinas mencionadas (Foey et al., 1998).

Como se ha mencionado anteriormente, los flavonoides son ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes y antirradicalarias, las cuales podrían estar relacionadas con su efecto antiinflamatorio y específicamente con la inhibición del NF $\kappa$ B, ya que se trata de un factor sensible al estrés oxidativo (Schoonbroodt y Piette, 2000). Las características estructurales que clásicamente se han considerado determinantes para la capacidad antioxidante son la presencia de un grupo catecol en el anillo B, la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3, y el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (Silva et

al., 2002). No podemos establecer una correlación directa entre la actividad de los flavonoides como inhibidores de iNOS y TNF y la estructura ideal como antioxidantes en BMDM, ya que la quercetina y la luteolina constituyen los compuestos más activos en las dos categorías. Sin embargo, el kanferol es menos activo, a pesar de poseer gran capacidad antioxidante. Por otro lado, la apigenina no posee gran capacidad antioxidante, pero sí importantes efectos antiinflamatorios *in vitro* (Silva et al., 2002). Todo esto apunta a que las propiedades antioxidantes no ejercen un papel esencial en el mecanismo antiinflamatorio de los flavonoides.

Reuniendo todos los datos, podemos decir que la luteolina y la quercetina son los mejores candidatos como agentes antiinflamatorios *in vivo*, por su efecto inhibidor en la expresión de TNF e iNOS, junto con su capacidad para aumentar la liberación de IL-10. Sin embargo, se han de tener en cuenta las características farmacocinéticas de los flavonoides antes de su uso *in vivo*.

## **5. Efecto de la administración de quercitrina en el modelo de colitis inducida con sulfato de dextrano en ratas**

El siguiente paso que nos planteamos fue evaluar la efectividad de estos compuestos sobre la colitis inducida *in vivo*. Para ello existen diversos modelos animales que se pueden clasificar en dos grupos:

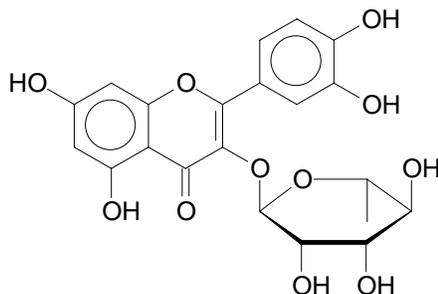
- Modelos de colitis espontánea o inducida por manipulación genética. Dentro de este grupo encontramos los modelos transgénicos y con delección génica (*knock-out*), como los ratones deficientes en alguna citoquina (IL-10, IL-2, TGF- $\beta$ ), o de alguno de sus receptores (IL-2R) (Bhan et al., 1999), las ratas portadoras del gen que codifica el alelo HLA-B27 (Human Leukocyte Antigen B27), etc (Strober et al., 2002).

- Modelos de colitis inducida mediante la administración (intracolónica, oral o intramural en el tejido intestinal) de algún compuesto que pueda ejercer un efecto tóxico directo, o bien una activación de la respuesta inmunológica intestinal. En este grupo encontramos, entre otros: (1) el modelo del TNBS, que consiste en la administración intracolónica de ácido trinitrobencenosulfónico, agente que actúa como un hapteno y provoca una inflamación transmural que se prolonga durante varias semanas con características similares a la enfermedad de Crohn en humanos, y (2) el modelo de colitis inducida mediante la administración de DSS en el agua de bebida. Este agente produce un cambio en la barrera epitelial que provoca alteraciones en la permeabilidad de la misma. Éste último se utilizó para el ensayo de la quercitrina como tratamiento antiinflamatorio.

En líneas generales todos los modelos desembocan en un proceso similar, capitaneado bien por una respuesta inmunitaria del tipo Th1 o bien Th2, o ambas (Dieleman et al., 1998). Es importante señalar que existen más modelos experimentales de colitis que emplean ratones y que en éstos se ha estudiado con más detalle la respuesta inmune que originan. Así, aunque está establecido que en el modelo de colitis inducida con TNBS en

ratones la respuesta inmunológica es primordialmente de tipo Th1, no es tan definido en ratas. De la misma forma, el modelo del DSS en ratones se caracteriza por una combinación de Th1 y Th2 (Dieleman et al., 1998; Egger et al., 2000) y en ratas no está establecido. No existe el modelo perfecto, en tanto que ninguno reproduce con exactitud las características de la EII en humanos. Sin embargo sí se pueden emplear para evaluar aspectos concretos de la enfermedad o del fármaco que se pretende estudiar.

En experimentos iniciales realizados en nuestro laboratorio se utilizó el modelo de colitis inducida por la administración intracolónica de TNBS en etanol al 50%. El etanol provoca la ruptura de la barrera epitelial, permitiendo el acceso del TNBS a la mucosa, donde induce el proceso inflamatorio actuando fundamentalmente como hapteno (Appleyard y Wallace, 1995; Morris et al., 1989). El tratamiento de los animales con las geninas quercetina y luteolina no produjo mejora alguna en la inflamación colónica inducida por el TNBS. Sin embargo, en experimentos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, el tratamiento de animales colíticos con rutina (Cruz et al., 1998) y quercitrina (Sánchez de Medina et al., 1996; Sánchez de Medina et al., 2002b), dos heterósidos de la quercetina, proporcionaron resultados satisfactorios anteriormente. Las discrepancias con los ensayos *in vitro*, donde las geninas sí mostraron un efecto importante, se pueden explicar si consideramos al glucósido como un profármaco que llega intacto al intestino grueso donde, por acción de las bacterias intestinales, libera la molécula activa (la quercetina), la cual ejerce su efecto de forma local. La mayoría de los glucósidos son resistentes a la hidrólisis gástrica y llegan intactos al duodeno (Manach et al., 2004). Solamente las geninas y algunos derivados glucosídicos pueden ser absorbidos en el intestino delgado, mientras que los polifenoles unidos a una molécula de ramosa alcanzan el colon, donde son hidrolizados por acción de las ramosidasas de la flora colónica. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis. Hemos demostrado que la flora bacteriana del colon es capaz de hidrolizar la quercitrina (Figura 31), y que la quercetina resultante es activa *in vitro*, de forma equivalente a la quercetina pura comercial.



**Figura 31.** Estructura de la quercitrina.

Por lo tanto, las características farmacocinéticas de las geninas quercetina y luteolina pueden ser las responsables del fracaso del ensayo *in vivo*. En la actualidad no existen derivados ramnosídicos de la luteolina. Con el fin de superar los obstáculos farmacocinéticos podría intentarse la administración de dosis más elevadas de la genina, para contrarrestar las “pérdidas” que se producen por la absorción intestinal, o bien se podría plantear el diseño de un derivado ramnosídico de la luteolina.

En cuanto al mecanismo de acción antiinflamatorio *in vivo*, se ha demostrado que la quercitrina es capaz de reducir la expresión de iNOS en el tejido colónico a través de la inhibición de la vía del NFκB (Camuesco et al., 2004). Puesto que éste es un factor de transcripción sensible al estrés oxidativo (Schoonbroodt y Piette, 2000), y dadas las propiedades antioxidantes de la quercetina, cabe pensar que éstas sean las responsables de su capacidad antiinflamatoria. Sin embargo, en los experimentos realizados *in vitro* ha quedado demostrado que este no es el único mecanismo implicado en el efecto beneficioso del flavonoide, ya que, como hemos apuntado anteriormente, el kanferol, que posee características antioxidantes resultó menos activo, en tanto que la luteolina, sin poseer el OH en 3, se comportó como un inmunomodulador potente. Esto apoya la existencia de mecanismos alternativos implicados en el efecto antiinflamatorio de la quercetina.

---

## *Conclusiones*



## CONCLUSIONES

1. Los flavonoides tienen efectos inmunomoduladores *in vitro*, concretamente en enterocitos, macrófagos y linfocitos. Existe una relación estructura-actividad definida en los dos primeros casos, en tanto que los linfocitos se ven inhibidos por todos los flavonoides ensayados.

.1. En enterocitos (HT29), el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 es necesario, y la posición iso del anillo B incrementa la actividad inhibidora de la producción de IL-8.

1.2. Los requerimientos estructurales necesarios para el efecto de los flavonoides como moduladores de la secreción de mediadores proinflamatorios en macrófagos murinos derivados de médula ósea son: presencia del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y de grupos OH en 5, 7, 3' y 4'. Además, la quercetina y la luteolina poseen la capacidad única de estimular la producción de IL-10.

2. Un mecanismo de acción implicado en la actividad de los flavonoides, sin descartar otros posibles, es la inhibición de la actividad NF $\kappa$ B a nivel de la fosforilación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ .

3. La quercitrina a la dosis de 1 mg/kg presenta efecto antiinflamatorio en el modelo de colitis inducida con DSS en ratas mediante la liberación en intestino grueso del compuesto activo, la quercetina.



---

*Bibliografia*



## BIBLIOGRAFÍA

Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Sergent O, Cillard P, Morel I (1999) Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Radic Biol Med* **26**:1457-66.

Abdalla S, Zarga MA, Afifi F, al-Khalil S, Mahasneh A, Sabri S (1989) Effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea-pig isolated smooth muscle. *J Pharm Pharmacol* **41**:138-41.

Abreu MT, Fukata M, and Arditi M (2005) TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* **174**:4453-60.

Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M (2001) Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**:1609-16.

Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**:675-80.

Alldrick AJ, Flynn J, Rowland IR (1986) Effects of plant-derived flavonoids and polyphenolic acids on the activity of mutagens from cooked food. *Mutat Res* **163**:225-32.

Amoros M, Simoes CM, Girre L, Sauvager F, Cormier M (1992) Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod* **55**:1732-40.

Appleyard CB Wallace JL (1995) Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am J Physiol* **269**:G119-25.

Aranda R, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, Kronenberg M (1997) Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RB<sup>high</sup> T cells to SCID recipients. *J Immunol* **158**:3464-73.

Asfaha S, MacNaughton WK, Appleyard CB, Chadee K, Wallace JL (2001) Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**:G635-44.

Barnes S (1995) Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr* **125**:777S-783S.

Batista LM, de Almeida AB, de Pietro Magri L, Toma W, Calvo TR, Vilegas W, Souza Brito AR (2004) Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. *Biol Pharm Bull* **27**:328-32.

Beinke S and Ley SC (2004) Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* **382**:393-409.

Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ (1995) Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* **270**:11703-6.

Beretz A ARJ (1996) *Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, Structure-Activity Relationships*, pp 281-296, AR Liss, New York.

Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach MW, Rennick D (1996) Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* **98**:1010-20.

Bertran X, Mane J, Fernandez-Banares F, Castella E, Bartoli R, Ojanguren I, Esteve M, Gassull MA (1996) Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* **38**:899-904.

- Bhan AK, Mizoguchi E, Smith RN, Mizoguchi A (1999) Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* **169**:195-207.
- Bocker U, Nebe T, Herweck F, Holt L, Panja A, Jobin C, Rossol S, Sartor R, Singer MV (2003) Butyrate modulates intestinal epithelial cell-mediated neutrophil migration. *Clin Exp Immunol* **131**:53-60.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* **186**:343-55.
- Boulton DW, Walle UK, Walle T (1998) Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol* **50**:243-9.
- Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP (2000) Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* **60**:1085-9.
- Brandzaeg P (1999) Intestinal Mucosa and its Diseases. Pathophysiology and Clinics, pp 383-400, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht .
- Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT (1993) Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* **78**:127-31.
- Bremner P, Heinrich M (2002) Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol* **54**:453-72.
- Brullet E, Bonfill X, Urrutia G, Ruiz Ochoa V, Cueto M, Clofent J, Martinez Salmeron JF, Riera J, Obrador A (1998) [Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease]. *Med Clin (Barc)* **110**:651-6.

Buening MK, Chang RL, Huang MT, Fortner JG, Wood AW, Conney AH (1981) Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Res* **41**:67-72.

Buisine MP, Desreumaux P, Leteurtre E, Copin MC, Colombel JF, Porchet N, Aubert JP (2001) Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* **49**:544-51.

Camuesco D, Comalada M, Rodriguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, Zarzuelo A, Gálvez J (2004) The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* **143**:908-18.

Capasso A, Pinto A, Sorrentino R, Capasso F (1991) Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contractions of guinea pig isolated ileum. *J Ethnopharmacol* **34**:279-81.

Celada A, Gray PW, Rinderknecht E, Schreiber RD (1984) Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med* **160**:55-74.

Cerqueira F, Cordeiro-da-Silva A, Araujo N, Cidade H, Kijjoa A, Nascimento MS (2003) Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones: artelastin as a potent inhibitor. *Life Sci* **73**:2321-34.

Chan MM, Fong D, Ho CT, Huang HI (1997) Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol* **54**:1281-6.

Chen CC, Chow MP, Huang WC, Lin YC, Chang YJ (2004) Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol Pharmacol* **66**:683-93.

Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP (2005a) Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* **69**:1421-32.

Chen JC, Ho FM, Pei-Dawn Lee Chao, Chen CP, Jeng KC, Hsu HB, Lee ST, Wen Tung Wu, Lin WW (2005b) Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of IkappaB kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol* **521**:9-20.

Cho JH (2004) Advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* **6**:467-73.

Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY, Jeong WI, Ryu SY, Do SH, Lee CS, Song JC, Jeong KS (2003) Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem* **243**:153-60.

Choi YH, Zhang L, Lee WH, Park KY (1998) Genistein-induced G2/M arrest is associated with the inhibition of cyclin B1 and the induction of p21 in human breast carcinoma cells. *Int J Oncol* **13**:391-6.

Chowdhury SA, Kishino K, Satoh R, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Shirataki Y, Sakagami H (2005a) Tumor-specificity and apoptosis-inducing activity of stilbenes and flavonoids. *Anticancer Res* **25**:2055-63.

Chowdhury SA, Kishino K, Satoh R, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Shirataki Y, Sakagami H (2005b) Tumor-specificity and apoptosis-inducing activity of stilbenes and flavonoids. *Anticancer Res* **25**:2055-63.

Cohen S, Hurd E, Cush J, Schiff M, Weinblatt ME, Moreland LW, Kremer J, Bear MB, Rich WJ, McCabe D (2002) Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate:

results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **46**:614-24.

Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A (2005) In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol*.

Comalada M, Cardo M, Xaus J, Valledor AF, Lloberas J, Ventura F, Celada A (2003) Decorin reverses the repressive effect of autocrine-produced TGF-beta on mouse macrophage activation. *J Immunol* **170**:4450-6.

Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R (1995) Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod* **58**:217-25.

Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F (2005a) Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* **204**:184-94.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* **69**:238-49.

Crespo ME, Gálvez J, Cruz T, Ocete MA, Zarzuelo A (1999) Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med* **65**:651-3.

Cruz T, Gálvez J, Crespo E, Ocete MA, and Zarzuelo A (2001) Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med* **67**:94-6.

Cruz T, Gálvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sánchez de Medina L-H F, Zarzuelo A (1998) Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci* **62**:687-95.

Cui YY, Xie H, Qi KB, He YM, Wang JF (2005a) Effects of *Pinus massoniana* bark

extract on cell proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells. *World J Gastroenterol* **11**:5277-82.

Cushman M, Nagarathnam D (1991) Cytotoxicities of some flavonoid analogues. *J Nat Prod* **54**:1656-60.

da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Erdtmann B (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* **40**:941-7.

Daddaoua A, Puerta V, Zarzuelo A, Suarez MD, Sánchez de Medina F, Martinez-Augustin O (2005) Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* **135**:1164-70.

Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W, Berg DJ, Rennick DM (1996) T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* **184**:241-51.

Day AJ, Williamson G (1999) Human metabolism of dietary quercetin glycosides. *Basic Life Sci* **66**:415-34.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* **174**:1209-20.

Di Carlo G, Autore G, Izzo AA, Maiolino P, Mascolo N, Viola P, Diurno MV, Capasso F (1993) Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol* **45**:1054-9.

Di Giacinto C, Marinaro M, Sánchez M, Strober W, Boirivant M (2005) Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* **174**:3237-46.

Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J (2005) Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* **135**:2299-304.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP (1998) Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* **114**:385-91.

Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A (1993a) Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* **24**:857-62.

Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J (1993b) Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **239**:1-7.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH (1995) Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* **102**:448-55.

Edwards JM, Raffauf RF, Le Quesne PW (1979) Antineoplastic activity and cytotoxicity of flavones, isoflavones, and flavanones. *J Nat Prod* **42**:85-91.

Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Buchler MW (2000) Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* **62**:240-8.

Einerhand AW, Renes IB, Makkink MK, van der Sluis M, Buller HA, Dekker J (2002) Role of mucins in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **14**:757-65.

Elliott DE, Summers RW, and Weinstock JV (2005) Helminths and the modulation of mucosal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* **21**:51-8.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **109**:1344-67.

Emim JA, Oliveira AB, Lapa AJ (1994) Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* **46**:118-22.

Faith DA, Isaacs WB, Morgan JD, Fedor HL, Hicks JL, Mangold LA, Walsh PC, Partin AW, Platz EA, Luo J, and De Marzo AM (2004) Trefoil factor 3 overexpression in prostatic carcinoma: prognostic importance using tissue microarrays. *Prostate* **61**:215-27.

Ferriola PC, Cody V, Middleton E Jr (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* **38**:1617-24.

Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM (1998) Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* **160**:920-8.

Formica JV and Regelson W (1995) Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* **33**:1061-80.

Fretland DJ, Widomski D, Tsai BS, Zemaitis JM, Levin S, Djuric SW, Shone RL, Gaginella TS (1990) Effect of the leukotriene B4 receptor antagonist SC-41930 on colonic inflammation in rat, guinea pig and rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* **255**:572-6.

Galeazzi F, Blennerhassett PA, Qiu B, O'Byrne PM, Collins SM (1999) Cigarette smoke aggravates experimental colitis in rats. *Gastroenterology* **117**:877-83.

Galsanov ShB, Tourova AD, Klimenko ED (1976) [Effect of quercitrin on structural changes in the large and small intestines in experimental enterocolitis]. *Biull Eksp Biol Med* **81**:623-5.

Gálvez J, Coelho G, Crespo ME, Cruz T, Rodriguez-Cabezas ME, Concha A, Gonzalez M, Zarzuelo A (2001) Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* **15**:2027-39.

Gálvez J, Cruz T, Crespo E, Ocete MA, Lorente MD, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A (1997) Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Med* **63**:409-14.

Gálvez J, de la Cruz JP, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F Jr, Jimenez J, Sánchez de la Cuesta F (1994) Oral administration of quercitrin modifies intestinal oxidative status in rats. *Gen Pharmacol* **25**:1237-43.

Gálvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, Zarzuelo A (2000) Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br J Pharmacol* **130**:1949-59.

Gassull MA (2004) Review article: the role of nutrition in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 4**:79-83.

Gassull MA, Mane J, Pedrosa E, Cabre E (2005) Macronutrients and bioactive molecules: is there a specific role in the management of inflammatory bowel disease? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **29**:S179-82; discussion S182-3, S184-8.

Gassull MA (1994) Clinical guidelines for the diagnosis of IBD, in *Management of inflammatory bowel disease* pp 7-12, Prous Science, Barcelona.

Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC (2002) Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* **75**:880-6.

González R, de Medina FS, Martinez-Augustin O, Nieto A, Gálvez J, Risco S, Zarzuelo A (2004) Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat. *Br J Pharmacol* **141**:951-60.

Grisham MB, Jour'dHeuil D, Wink DA (1999) Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* **276**:G315-21.

Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J (1987) On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* **36**:317-22.

Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A (1997) Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* **236**:591-3.

Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* **179**:269-77.

Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **12**:3668-72.

Han ZS, Enslin H, Hu X, Meng X, Wu IH, Barrett T, Davis RJ, Ip YT (1998) A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates Drosophila immunity gene expression. *Mol Cell Biol* **18**:3527-39.

Hanauer SB (2004) Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: overview of randomized clinical studies. *Rev Gastroenterol Disord* **4 Suppl 3**:S18-24.

Harris G, KuoLee R, Chen W (2006) Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* **12**:2149-60.

Havsteen B (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* **32**:1141-8.

Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, Karin M,

Kikugawa K (2003) Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *EMBO J* **22**:3356-66.

Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**:2195-224.

Hendriks JJ, Alblas J, van der Pol SM, van Tol EA, Dijkstra CD, de Vries HE (2004) Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. *J Exp Med* **200**:1667-72.

Herencia F, Ferrandiz ML, Ubeda A, Guillen I, Dominguez JN, Charris JE, Lobo GM, Alcaraz MJ (2001) 4-dimethylamino-3',4'-dimethoxychalcone downregulates iNOS expression and exerts anti-inflammatory effects. *Free Radic Biol Med* **30**:43-50.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* **20**:21-9.

Hibi T, Inoue N, Ogata H, Naganuma M (2003) Introduction and overview: recent advances in the immunotherapy of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* **38 Suppl 15**:36-42.

Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **47**:357-62.

Hodnick WF, Milosavljevic EB, Nelson JH, Pardini RS (1988) Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem Pharmacol* **37**:2607-11.

Hollman PC, Katan MB (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* **37**:937-42.

Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S (2002) Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**:7-14.

Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* **52**:144-51.

Hong T, Nakagawa T, Pan W, Kim MY, Kraus WL, Ikehara T, Yasui K, Aihara H, Takebe M, Muramatsu M, Ito T (2004) Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem Biophys Res Commun* **317**:259-64.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:599-603.

Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**:225-36.

Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K (1996) A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* **19**:1518-20.

Ito N (1992) Is quercetin carcinogenic? *Jpn J Cancer Res* **83**:312-3.

Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, Sartor RB (1999) Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol* **163**:3474-83.

Johnson VJ, He Q, Osuchowski MF, Sharma RP (2003) Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. *Planta Med* **69**:44-9.

Joyce DA, Gimblett G, Steer JH (2001) Targets of glucocorticoid action on TNF-alpha release by macrophages. *Inflamm Res* **50**:337-40.

Jung M, Sabat R, Kratzschmar J, Seidel H, Wolk K, Schonbein C, Schutt S, Friedrich M, Docke WD, Asadullah K, Volk HD, Grutz G (2004) Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *Eur J Immunol* **34**:481-93.

Kagnoff MF, Eckmann L (1997) Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* **100**:6-10.

Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ (1996) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* **4**:313-9.

Karin M, Lin A (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**:221-7.

Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**:240-6.

Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP (1999) Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* **58**:759-65.

Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* **96**:229-45.

Kim JA, Kim DK, Kang OH, Choi YA, Park HJ, Choi SC, Kim TH, Yun KJ, Nah YH,

and Lee YM (2005) Inhibitory effect of luteolin on TNF-alpha-induced IL-8 production in human colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol* **5**:209-17.

Kim JS, Jobin C (2005) The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology* **115**:375-87.

Kim YS, Son M, Ko JI, Cho H, Yoo M, Kim WB, Song IS, and Kim CY (1999) Effect of DA-6034, a derivative of flavonoid, on experimental animal models of inflammatory bowel disease. *Arch Pharm Res* **22**:354-60.

Kimura A, Naka T, Muta T, Takeuchi O, Akira S, Kawase I, Kishimoto T (2005) Suppressor of cytokine signaling-1 selectively inhibits LPS-induced IL-6 production by regulating JAK-STAT. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:17089-94.

Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, Hamilton TA (1999) Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *J Immunol* **162**:2457-61.

Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Helleovaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* **146**:223-30.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**:471-9.

Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D (2004) Immunomodulatory benefits of cyclosporine A in inflammatory bowel disease. *J Cell Mol Med* **8**:317-28.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* **87**:1344-50.

Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G (2004) How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* **80**:15-21.

Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW (2003) Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* **201**:28-36.

Kruschewski M, Anderson T, Loddenkemper C, Buhr HJ (2006) Endothelin-1 Receptor Antagonist (LU-135252) Improves the Microcirculation and Course of TNBS Colitis in Rats. *Dig Dis Sci*.

Kucharzik T, Williams IR (2002-2003) Neutrophil migration across the intestinal epithelial barrier--summary of in vitro data and description of a new transgenic mouse model with doxycycline-inducible interleukin-8 expression in intestinal epithelial cells. *Pathobiology* **70**:143-9.

Kuhnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* **24**:117-91.

Kuppusamy UR, Das NP (1992) Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* **44**:1307-15.

Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H (2005) Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* **69**:395-406.

Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Izawa Y, Kanematsu Y, Tamaki T (2004) Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol Sin* **25**:977-85.

Landolfi R, Mower RL, Steiner M (1984) Modification of platelet function and

arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol* **33**:1525-30.

Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR (1989) Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* **38**:2859-65.

Leon F, Smythies LE, Smith PD, Kelsall BL (2006) Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* **579**:117-32.

Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A (1990) Growth adaptation to methotrexate of HT29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* **50**:6334-43.

Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A (2000) Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* **95**:1213-20.

Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH (2005) Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res* **65**:6934-42.

Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* **20**:1945-52.

Loftus EV Jr (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**:1504-17.

Loftus EV Jr, Sandborn WJ (2002) Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **31**:1-20.

Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, del Vecchio Blanco C (1996) Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci* **41**:1204-11.

Lopez Miguel C, Sicilia B, Sierra E, Lopez Zaborras J, Arribas F, and Gomollon F (1999) [Incidence of inflammatory bowel disease in Aragon: outcome of a prospective population-based study]. *Gastroenterol Hepatol* **22**:323-8.

Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M (2005) Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **307**:734-8.

Makhatadze NJ (1998) Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Hum Immunol* **59**:571-9.

Malek TR, Bayer AL (2004) Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* **4**:665-74.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**:727-47.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* **164**:6509-19.

Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N (2001) Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem* **8**:135-53.

Marchbank T, Cox HM, Goodlad RA, Giraud AS, Moss SF, Poulson R, Wright NA, Jankowski J, Playford RJ (2001) Effect of ectopic expression of rat trefoil factor family 3 (intestinal trefoil factor) in the jejunum of transgenic mice. *J Biol Chem* **276**:24088-96.

- Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* **6**:777-84.
- Martinez-Florez S, Gonzalez-Gallego J, Culebras JM, Tunon MJ (2002) [Flavonoids: properties and anti-oxidizing action]. *Nutr Hosp* **17**:271-8.
- Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC (1996) Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* **274** :262-5.
- Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H, Aoike A (1993) Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res* **53**:1328-31.
- McCafferty DM, Rioux KJ, Wallace JL (1992) Granulocyte infiltration in experimental colitis in the rat is interleukin-1 dependent and leukotriene independent. *Eicosanoids* **5**:121-5.
- McGee, D.W. 1999. Inflammation and Mucosal Cytokine Production. En: *Mucosal Immunology*. Eds. P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J. R. McGhee. Academic Press. pp. 559-573.
- Messina M, Bennink M (1998) Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12**:707-28.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* **52**:673-751.
- Mitsuyama K, Sasaki E, Toyonaga A, Ikeda H, Tsuruta O, Irie A, Arima N, Oriishi T, Harada K, Fujisaki K, et al (1991) Colonic mucosal interleukin-6 in inflammatory bowel disease. *Digestion* **50**:104-11.

Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT (2001) Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **108**:601-9.

Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, and Pallone F (2002) Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* **50 Suppl 3**:III60-4.

Morales MA, Tortoriello J, Meckes M, Paz D, Lozoya X (1994) Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Arch Med Res* **25**:17-21.

Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JR (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* **40**:787-92.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* **96**:795-803.

Muller JR, Siebenlist U (2003) Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *J Biol Chem* **278**:12006-12.

Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K (2000) Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* **120**:51-8.

Murota K, Mitsukuni Y, Ichikawa M, Tsushida T, Miyamoto S, Terao J (2004) Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. *J Agric Food*

*Chem* **52**:1907-12.

Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO (2002) Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* **32**:386-93.

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* **3**:667-72.

Nakajima A, Katayama K, Mayumi T (2003) [PPARgamma-gene therapy using an adenovirus vector for inflammatory bowel disease]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **122**:309-16.

Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, Tone M, Pacher P, Vizi ES, Hasko G (2005) Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol* **175**:8260-70.

Neurath MF, Becker C, Barbulescu K (1998) Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* **43**:856-60.

Neurath MF, Fuss I, Kelsall B, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W (1996) Effect of IL-12 and antibodies to IL-12 on established granulomatous colitis in mice. *Ann N Y Acad Sci* **795**:368-70.

Nikaido T, Ohmoto T, Sankawa U, Hamanaka T, Totsuka K (1982) Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by flavonoids. *Planta Med* **46**:162-6.

Noroozi M, Burns J, Crozier A, Kelly IE, Lean ME (2000) Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur J Clin Nutr* **54**:143-9.

Obrador A RJ (1994) Definitions, in *Management of Inflammatory Bowel Disease* pp 1-6, Prous Science, Barcelona.

Ocete MA, Gálvez J, Crespo ME, Cruz T, Gonzalez M, Torres MI, Zarzuelo A (1998) Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. *Pharmacology* **57**:261-70.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:603-6.

Ohtsuka Y, Lee J, Stamm DS, Sanderson IR (2001) MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. *Gut* **49**:526-33.

Okamoto S, Watanabe M, Yamazaki M, Yajima T, Hayashi T, Ishii H, Mukai M, Yamada T, Watanabe N, Jameson BA, Hibi T (1999) A synthetic mimetic of CD4 is able to suppress disease in a rodent model of immune colitis. *Eur J Immunol* **29**:355-66.

Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO (2000) Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* **35**:1075-81.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM (1995) The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* **235**:207-19.

Palsson-McDermott EM, O'Neill LA (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**:153-62.

Pan MH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JH, Lin JK (2000) Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB activity by theaflavin-3,3'-digallate

from black tea and other polyphenols through down-regulation of IkappaB kinase activity in macrophages. *Biochem Pharmacol* **59**:357-67.

Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS (2004) Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* **173**:3589-93.

Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Brandner G, Hess RD (1996) Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* **13**:1605-14.

Podolsky DK (2002) The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16**:933-43.

Rao VS, Santos FA, Sobreira TT, Souza MF, Melo CL, Silveira ER (1997) Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med* **63**:146-9.

Rask-Madsen J, Bukhave K, Laursen LS, Lauritsen K (1994) 5-Lipoxygenase inhibitors in the treatment of inflammatory bowel disease. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **22**:113-24.

Regueiro M, Kip KE, Cheung O, Hegazi RA, Plevy S (2005) Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**:42-7.

Reinders CI, Herulf M, Ljung T, Hollenberg J, Weitzberg E, Lundberg JO, Hellstrom PM (2005a) Rectal mucosal nitric oxide in differentiation of inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**:777-83.

Reinders CI, Herulf M, Ljung T, Hollenberg J, Weitzberg E, Lundberg JO, Hellstrom PM (2005b) Rectal mucosal nitric oxide in differentiation of inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**:777-83.

Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT (1999) Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* **354**:635-9.

Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Taminiau JA, Buller HA, Dekker J, Einerhand AW (2002) Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *Int J Colorectal Dis* **17**:317-26.

Rennick D, Davidson N, Berg D (1995) Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation. *Clin Immunol Immunopathol* **76**:S174-8.

Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC (1996) Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* **125**:384-9.

Rogler G (2003) Inhibition on NF $\kappa$ B-mediated trans-activation as a central target of IBD therapy, in *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside* (Shanahan F TS ed) pp 535-540, Kluwer Academic Publishers, Great Britain.

Rogler G (2004) Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* **20**:311-7.

Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:320-44.

Rowland M TT (1995) Clinical pharmacokinetics. Concepts and applicatrions. Williams & Wilkins, Baltimore.

Royero HA (2003) Enfermedad Inflamatoria Intestinal, pp 24-41, Rev Colomb Gastroenterol.

Sánchez de Medina F, Gálvez J, Gonzalez M, Zarzuelo A, Barrett KE (1997) Effects of

quercetin on epithelial chloride secretion. *Life Sci* **61** :2049-55.

Sánchez de Medina F, Gálvez J, Romero JA, Zarzuelo A (1996) Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **278**:771-9.

Sánchez de Medina F, Perez R, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Lorente MD, Gálvez J, Zarzuelo A (2002a) Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. *Pflugers Arch* **444** :378-88.

Sánchez de Medina F, Vera B, Gálvez J, Zarzuelo A (2002b) Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci* **70**:3097-108.

Sanchez-Hidalgo M, Martin AR, Villegas I, Alarcon De La Lastra C (2005) Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* **69**:1733-44.

Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ (2004) Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* **350**:876-85.

Saro Gismera C, Lacort Fernandez M, Arguelles Fernandez G, Anton Magarzo J, Garcia Lopez R, Navascues CA, Suarez Gonzalez A, Diaz Alvarez G, Gonzalez Bernal A, Palacios Galan A, Altadill Arregui A, Vizoso F (2000) [Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Gijon, Asturias, Spain]. *Gastroenterol Hepatol* **23**:322-7.

Sartor RB (1994) Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* **106**:533-9.

Saskia ABE, van Acceker, Bast AALT (1998) *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*. En : *Flavonoids in health and disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 9 : 221-51.

Schmitz ML, Baeuerle PA (1991) The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J* **10**:3805-17.

Schoonbroodt S, Piette J (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem Pharmacol* **60**:1075-83.

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J (1998) Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* **42**:477-84.

Schumann RR, Belka C, Reuter D, Lamping N, Kirschning CJ, Weber JR, Pfeil D (1998) Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood* **91**:577-84.

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**:1429-31.

Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP (2000) Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**:397-403.

Shukla S, Gupta S (2004) Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin Cancer Res* **10**:3169-78.

Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AJ, Bonomo RP (1991) In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub>(-). *Free Radic Biol Med* **11**:1-8.

Silva MM, Santos MR, Caroco G, Rocha R, Justino G, Mira L (2002) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic Res* **36**:1219-27.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.

Stefani ED, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Carzoglio JC, Ronco A, Olivera L (1999) Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer* **34**:100-10.

Stowe SP, Redmond SR, Stormont JM, Shah AN, Chessin LN, Segal HL, Chey WY (1990) An epidemiologic study of inflammatory bowel disease in Rochester, New York. Hospital incidence. *Gastroenterology* **98**:104-10.

Strieter RM (2002) Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**:L688-9.

Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* **20**:495-549.

Suetsugi M, Su L, Karlsberg K, Yuan YC, Chen S (2003) Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res* **1**:981-91.

Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, Summers R, Mekhjian H, Greenberger N, Kelly M, and et al (1991) Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* **32**:1071-5.

Sykes AP, Brampton C, Klee S, Chander CL, Whelan C, Parsons ME (2000) An investigation into the effect and mechanisms of action of nicotine in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* **49**:311-9.

te Velde AA, van Kooyk Y, Braat H, Hommes DW, DelleMijn TA, Slors JF, van Deventer SJ, Vyth-Dreese FA (2003) Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Eur J Immunol* **33**:143-51.

Ten Hove T, Corbaz A, Amitai H, Aloni S, Belzer I, Graber P, Drillenburger P, van Deventer SJ, Chvatchko Y, Te Velde AA (2001) Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology* **121**:1372-9.

Terao J, Yamaguchi S, Shirai M, Miyoshi M, Moon JH, Oshima S, Inakuma T, Tsushida T, Kato Y (2001) Protection by quercetin and quercetin 3-O-beta-D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radic Res* **35**:925-31.

Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F, Hofmann M, Stremmel W, Thiele H, Ziegler R, Nawroth PP (1999) Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaB/p65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* **45**:693-704.

Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**:171-4.

Torre D, Tambini R, Aristodemo S, Gavazzeni G, Goglio A, Cantamessa C, Pugliese A, Biondi G (2000) Anti-inflammatory response of IL-4, IL-10 and TGF-beta in patients systemic inflammatory response syndrome. *Mediators Inflamm* **9**:193-5.

Turunen UM, Farkkila MA, Hakala K, Seppala K, Sivonen A, Ogren M, Vuoristo M, Valtonen VV, Miettinen TA (1998) Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* **115**:1072-8.

Tytgat KM, van der Wal JW, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J (1996) Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochem Biophys Res Commun* **224**:397-405.

- Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M (2004) A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**:119-25.
- Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A, Pifferi G (1994) A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med* **16**:547-53.
- Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R (1989) Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med* **55**:420-2.
- van Klinken BJ, Einerhand AW, Duits LA, Makkink MK, Tytgat KM, Renes IB, Verburg M, Buller HA, Dekker J (1999) Gastrointestinal expression and partial cDNA cloning of murine Muc2. *Am J Physiol* **276**:G115-24.
- van Montfrans C, Peppelenbosch M, te Velde AA, van Deventer S (2002) Inflammatory signal transduction in Crohn's disease and novel therapeutic approaches. *Biochem Pharmacol* **64**:789-95.
- Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sánchez B, Chan K, Guglietta A (1995) BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **272**:417-22.
- Verbeek R, Plomp AC, van Tol EA, van Noort JM (2004) The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon- $\gamma$  production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem Pharmacol* **68**:621-9.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S (1995) Rel/NF- $\kappa$ B/I  $\kappa$ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* **9**:2723-35.
- Vestergaard EM, Brynskov J, Ejlskjær K, Clausen JT, Thim L, Nexø E, Poulsen SS (2004) Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients

with inflammatory bowel disease. *Scand J Clin Lab Invest* **64** :146-56.

Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Orjales A, La Casa C (2003a) A new flavonoid derivative, dosmalfate, attenuates the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Int Immunopharmacol* **3**:1731-41.

Villegas I, La Casa C, Orjales A, Alarcon de la Lastra C (2003b) Effects of dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* **460**:209-18.

Virgili F, Acconcia F, Ambra R, Rinna A, Totta P, Marino M (2004) Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor alpha signaling. *IUBMB Life* **56**:145-51.

Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* **101**:1163-74.

Wallace JL, Reuter B, Cicala C, McKnight W, Grisham MB, Cirino G (1994) Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterology* **107**:173-9.

Wang J, Mazza G (2002) Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* **50**:4183-9.

Wang L, Walia B, Evans J, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV (2003) IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol* **171**:3194-201.

Wang W, Liu LQ, Higuchi CM, Chen H (1998) Induction of NADPH:quinone reductase by dietary phytoestrogens in colonic Colo205 cells. *Biochem Pharmacol* **56**:189-95.

Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W (2004) NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **5**:800-8.

Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM (2000) Suppression of NF-kappaB

activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* **119**:1209-18.

Weiss T, Shalit I, Blau H, Werber S, Halperin D, Levitov A, Fabian I (2004) Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1974-82.

Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C (2001) Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:181-7.

Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A (2002) Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the luteolin. *Br J Pharmacol* **136**:1058-64.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardo M, Herrero C, Soler C, Lloberas J, Celada A (2001) Molecular mechanisms involved in macrophage survival, activation or apoptosis. *Immunobiology* **204**:543-50.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, Bogdan C, Celada A (2000) LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood* **95**:3823-31.

Yamada T, Grisham MB (1991) Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr* **69**:988-94.

Yamada T, Grisham MB (1994) Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen, in *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside* (Shanahan F TS ed) pp 133-150, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.

Yamamoto Y, Gaynor RB (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* **107**:135-42.

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D (2006) IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* **116**:1310-6.

Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**:77-80.

Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Horie T, Watanabe-Kohno S (1983) Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **116**:612-8.

Yue G, Sun FF, Dunn C, Yin K, Wong PY (1996) The 21-aminosteroid tirilazad mesylate can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **276**:265-70.

---

*Anexos*



## ANEXOS

**Abreviaturas**

AP-1	proteína de activación 1
APC	célula presentadora de antígenos
BAFF	factor activador de células B
BMDM	macrófagos derivados de médula ósea "Bone Marrow Derived Macrophages"
CD14, 28	"cluster of differentiation 14, 28 "
CK2	caseína quinasa 2
CRE	elemento de respuesta al AMPc
CREB	proteína de unión al CRE
COX	ciclooxigenasa
CsA	ciclosporina A
CU	colitis ulcerosa
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
EC	enfermedad de Crohn
EII	enfermedad inflamatoria intestinal
ERK	quinasa regulada por estímulos extracelulares
DSS	sulfato de dextrano sódico
IAE	índice de actividad de la enfermedad
ICAM	molécula de adhesión intercelular
IFN $\gamma$	interferón gamma
I $\kappa$ B	inhibidor de NF $\kappa$ B
IKK	quinasa de I $\kappa$ B
IL	interleuquina
INOS	óxido nítrico sintasa inducible
IRAK	quinasa asociada al receptor de IL1
JAK	quinasa jano
JNK	c-jun, N-terminal kinase
LBP	proteína de unión al LPS
LDH	lactado deshidrogenasa
LOX	lipooxigenasa
LPS	lipopolisacárido
LT	linfotóxina
LTB $_4$	leucotrieno B $_4$
MAP	proteína activada por mitógenos
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos

MDA	malonildialdehído
MDP	muramil dipéptido
MEKK3	quinasa de la quinasa de MAP y ERK
MPO	mieloperoxidasa
NFAT	factor nuclear activador de linfocitos T
NFκB	factor nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
PAF	factor activador de plaquetas
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PMA	12-miristato, 13-acetato de forbol
PPARγ	receptor activado por proliferadores peroxisomales-gamma
RANKL	ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B
ROS	especies reactivas del oxígeno
STAT	transductor de señal y activador de la transcripción
TAK-1	"TGFβ activated kinase 1"
TCR	receptor de linfocitos T
TGFβ	factor transformador de crecimiento β
TLR	Receptor tipo toll
TNBS	ácido trinitrobenceno sulfónico
TNF	factor de necrosis tumoral
TRAF-6	factor asociado al receptor de TNF, 6
VCAM	molécula de adhesión al endotelio vascular

**Índice de tablas**

Tabla 1. Oligonucleótidos HT29-MTX	56
Tabla 2. Oligonucleótidos BMDM	57
Tabla 3. Criterio de asignación del Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) en el modelo de colitis inducida por DSS.	59
Tabla 4. Flavonoides seleccionados	66
Tabla 5. Efecto de los flavonoides más activos sobre la viabilidad de las células HT29. Técnica de tinción con cristal violeta.	68
Tabla 6. Efecto de los flavonoides (50 $\mu$ M) sobre la viabilidad de las células HT29-MTX. Técnica de tinción con cristal violeta.	70
Tabla 7. Efecto de la quercetina, apigenina, diosmetina y luteolina sobre la secreción de IL-1 $\beta$ y TNF en THP-1	72
Tabla 8. Efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de las células THP-1. Actividad LDH.	76
Tabla 9. Efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de los macrófagos. Técnica del cristal violeta.	83
Tabla 10. Efecto de los flavonoides sobre la liberación de TNF en macrófagos murinos derivados de la médula ósea	84
Tabla 11. Determinación de parámetros proinflamatorios. Tratamiento con quercitrina <i>in vivo</i>	93
Tabla 12. Estructura química de los flavonoides estudiados.	101
Tabla 13. Efecto de los flavonoides sobre la fisiología de los macrófagos y análisis de la relación estructura-actividad. Resumen.	112

## **Índice de figuras**

Figura 1. Factores desencadenantes de la EII.	3
Figura 2. Inflamación de la mucosa. Reconocimiento del antígeno e inmunoregulación. Respuestas inflamatoria y antiinflamatoria.	7
Figura 3. Vías clásica y no clásica de activación del NFκB.	14
Figura 4. Transducción de señal del LPS a través del receptor TLR4.	17
Figura 5. Estructura y numeración de los flavonoides	20
Figura 6. Clasificación de los flavonoides.	21
Figura 7. La acción de la Succinato Tetrazolio-reductasa	48
Figura 8. Diseño experimental.	58
Figura 9. Secreción de IL8 en células HT29 estimuladas con LPS.	67
Figura 10. Efecto de los flavonoides más activos sobre la secreción de IL-8 en células HT29 estimuladas con LPS (1 µg/ml) durante 24 horas. .	67
Figura 11. Efecto de los flavonoides (50 µM) sobre la expresión de TFF-3 en células HT29 MTX.	70
Figura 12. Efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL-1β en células THP-1 estimuladas con LPS (1 µg/ml) y PMA (1 µM).	72
Figura 13. Efecto de los flavonoides sobre la secreción de TNF en células THP-1 estimuladas con LPS (1 µg/ml) y PMA (1 µM).	73
Figura 14. Efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL6 en células THP-1 estimuladas con LPS (1 µg/ml) y PMA (1 µM).	74
Figura 15. Efecto de los flavonoides sobre la actividad de la succinato-tetrazolio reductasa en células THP-1.	75
Figura 16. Efecto de los flavonoides sobre la secreción de IL-2 en linfocitos de bazo.	78

---

Figura 17. Efecto de los flavonoides sobre la proliferación de linfocitos inducida con concanavalina A.	79
Figura 18. Efecto de los flavonoides sobre la actividad de la succinato-tetrazolio reductasa en linfocitos murinos.	80
Figura 19. Efecto de los flavonoides sobre la proliferación de BMDM dependiente de M-CSF.	82
Figura 20. Efecto de los flavonoides genisteína, quercetina y luteolina sobre la liberación de TNF inducida por LPS en BMDM.	85
Figura 21. Efecto de (A) flavonoles, (B) flavonas, (C) isoflavonas y (D) flavanonas, sobre la expresión de iNOS inducida por LPS en BMDM.	86
Figura 22. Determinación de I $\kappa$ B $\alpha$ -P. Western blot.	87
Figura 23. Efecto de la sulfasalazina sobre la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ (A) y la expresión de iNOS (B) en BMDM. Western blot.	88
Figura 24. Efecto de la sulfasalazina (50 y 100 $\mu$ M) sobre la expresión de TNF en BMDM. ELISA	88
Figura 25. Efecto de (A) flavonoles, (B) flavonas, (C) isoflavonas y (D) flavanonas sobre la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ inducida por LPS en BMDM.	89
Figura 26. Expresión del mRNA para la IL-10 en macrófagos tratados con apigenina, sulfasalazina (A), quercetina o luteolina (B).	90
Figura 27. Efecto de la quercetina, luteolina y sulfasalazina sobre la secreción de IL-10 inducida por LPS.	91
Figura 28. Evolución del IAE durante el tratamiento.	93
Figura 29. Fermentación de quercitrina por parte de la microflora intestinal.	94
Figura 30. Cuantificación del área de los picos del histograma de HPLC.	94
Figura 31. Ensayos del fermentado de quercitrina.	95
Figura 32. Las células de la inflamación.	100
Figura 33. Estructura de la quercitrina.	120

Publicaciones derivadas del trabajo realizado en el período de tesis

1. Hardwick, J.C., Van Den Brink, G.R., Bleuming, S.A., Ballester, I., Van Den Brande, J.M., Keller, J.J., Offerhaus, G.J., Van Deventer, S.J., Peppelenbosch, M.P. (2004) Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 126, 111-121.
2. Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O., González, R., Ballester, I., Nieto, A., Gálvez, J., Zarzuelo, A. (2004) Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 68, 2317-2326
3. Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., Zarzuelo, A. (2005) In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NFkB pathway. *Eur J immunol* 35, 584-592
4. Pérez-Navarro, R., Ballester, I., Zarzuelo, A., Sánchez de Medina, F. (2004) Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis. *Life Sci* 76, 1489-1501.
5. Pérez-Navarro, R.; Martínez-Augustin, O.; Ballester, I.; Zarzuelo, A.; Sánchez de Medina, F. Experimental inflammation of the rat distal colon inhibits ionic secretion in the proximal colon through alterations in the enteric nervous system. (2005) *Naunyn Schmiedebergs Arch of Pharmacol* 371, 114-121.
6. Ballester, I., González, R., Nieto, A., Zarzuelo, A., Sánchez de Medina, F. (2005) Monochloramine induces acute and protracted colitis in the rat. Response to pharmacological treatment. *Life Sci* 76, 2965-2980.

7. Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., Sánchez de Medina, F., Zarzuelo, A. (2006) Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol*, Aug 23; [Epub ahead of print].