

# Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal

## *Flavonoides and Inflammatory bowel disease*

BALLESTER I, CAMUESCO D, GÁLVEZ J, SÁNCHEZ DE MEDINA F, ZARZUELO A

Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus Universitario  
'La Cartuja' s/n, 18071 Granada (España). e-mail: zarzuelo@ugr.es

### RESUMEN

Estudios epidemiológicos han puesto en evidencia el papel que tienen los alimentos de origen vegetal en la prevención de numerosas enfermedades. Los antioxidantes naturales presentes en estos alimentos, entre los que destacan los flavonoides, pueden ser responsables de esta actividad. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Pueden mejorar los estados de diarrea aguda y crónica a través de la inhibición de la secreción y motilidad intestinal y también ser muy útiles en la reducción del daño inflamatorio crónico en el intestino, protegiéndolo del estrés oxidativo y preservando la función de la mucosa. Por ello, se proponen como agentes terapéuticos en el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, en la que factores diversos promueven una reacción inmunológica exacerbada que conduce a una inflamación crónica del intestino.

PALABRAS CLAVE: Antioxidante. Citocina. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Flavonoide. Leucotrieno B<sub>4</sub>. NFκB. Óxido nítrico.

### ABSTRACT

*Epidemiological studies have revealed the important role that foodstuffs of vegetable origin have to play in the prevention of numerous illnesses. The natural antioxidants present in such foodstuffs, among which the flavonoids are widely present, may be responsible for such an activity. Flavonoids are compounds that are low in molecular weight and widely distributed throughout the vegetable kingdom. They may be of great utility in states of acute or chronic diarrhoea through the inhibition of intestinal secretion and motility, and may also be beneficial in the reduction of chronic inflammatory damage in the intestine, by affording protection against oxidative stress and by preserving mucosal function. For this reason, the use of these agents is recommended in the treatment of inflammatory bowel disease, in which various factors are involved in extreme immunological reactions, which lead to chronic intestinal inflammation.*

KEY WORDS: Antioxidant. Cytocine. Intestinal Inflammatory disease. Flavonoids. Leukotriene B<sub>4</sub>. NFκB. Nitric acid.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos que aparecen de forma espontánea en casi todas las plantas superiores. Poseen un origen biosintético común y, por ese motivo, un mismo elemento estructural básico con diferentes grados de oxidación, dando lugar a las distintas familias estructurales: flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas (o flavanoles), antocianos, isoflavonas, chalconas y auronas (Figura 1).

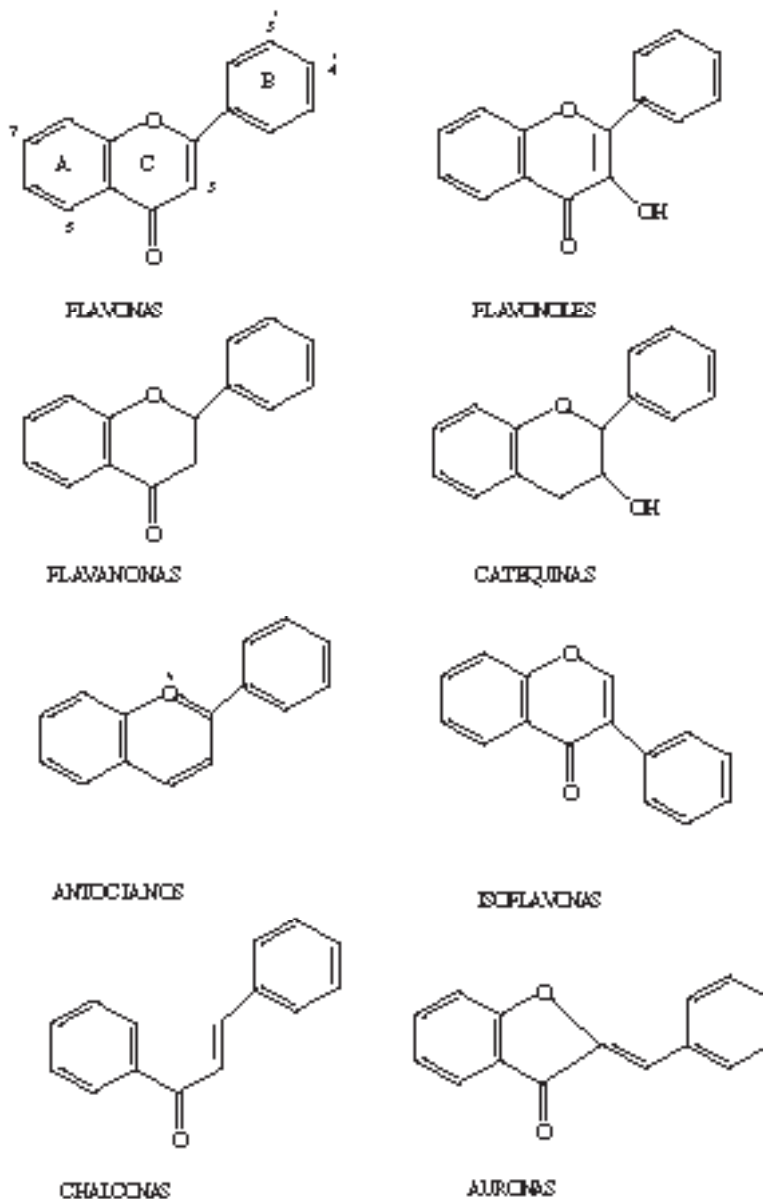
## 1. INTRODUCTION

The flavonoids represent a large group of polyphenolic compounds that appear spontaneously in almost all superior plant species. They possess a common biosynthetic origin and for this reason, sharing a basic structural element with different degrees of oxidation, giving rise to different family structures: flavones, flavonols, flavanones, catechins (or flavanols), antocyanins, isoflavones, chalcones and aurones (Figure 1). The different

ra 1). Las diferentes modificaciones químicas que tienen lugar dentro de cada una de estas clases, tales como hidrogenaciones, hidroxilaciones, sulfuraciones, metilaciones y acetilaciones, así como la incorporación de distintos restos azucarados, dan lugar a la gran diversidad de flavonoides que se pueden encontrar en la naturaleza. La mayoría de los flavonoides se encuentran en forma de heterósidos, y entre los azúcares que entran a formar 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<sup>1,2</sup>, aunque varía la cantidad diaria dependiendo de los hábitos dietéticos de una población determinada. Uno de los primeros estudios que intentaron determinar el contenido en flavonoides de la dieta humana fue llevado a cabo por Kuhnau<sup>1</sup>, que estableció que el consumo total de flavonoides en los Estados Unidos era de aproximadamente 1 gramo diario, expresados en forma de heterósidos, o de unos 650 mg por día cuando se consideraba el consumo de geninas libres de la parte glucídica. La utilización de una metodología más precisa en el análisis de alimentos ha permitido establecer que esta primera estimación puede ser exagerada y que el consumo real de flavonoides es bastante menor. En este sentido, Hertog y col.<sup>3</sup> realizaron un estudio en siete países, incluyendo Finlandia, Estados Unidos, Serbia/Croacia, Grecia, Italia, Holanda y Japón, comprobando que la ingesta media diaria de flavonoles y flavonas se encontraba en un margen comprendido entre los 6 mg diarios para Finlandia y los 64 mg diarios para Japón. Posteriores estudios llevados a cabo en otros dos países europeos, Dinamarca y Alemania, ratificaron estos datos puesto que el consumo de flavonoides en estos países fue de 56 y 11 mg diarios, respectivamente<sup>4,5</sup>. Recientemente, Noroozi y col.<sup>6</sup> han establecido que la ingesta media de flavonoles es de aproximadamente 35 mg por día, de los que el 91% está constituido por la quercetina. De hecho, la quercitrina y la rutina, heterósidos de la quercetina, el flavonoide mayoritario en alimentos vegetales<sup>2</sup>, son los flavonoides más comunes en la dieta.

chemical modification processes that take place within each of these types, such as hydrogenation, hydroxylation sulphuration, methylation and acetylation, as well as the incorporation of different sugar traces, all give rise to a great diversity of naturally occurring flavonoids. Most flavonoids are found in the form of a heteroside, and among the sugars that form part of their structures are D-glucose, L-rhamnose, glucoramnose, galactose and arabinose. The widespread presence of the flavonoids in foodstuffs leads to its regular consumption in a normal diet<sup>1,2</sup>. However, the quantity consumed is subject to the dietary habits of a determined population group. One of the first studies which attempted to determine flavanoid content in human diet was carried out by Kuhnau<sup>1</sup>, who established that total flavonoid consumption in the United States was approximately 1 gram per day, expressed in terms of heterosides, or about 650 mg per day expressed as genin in the absence of the glucidic fraction. The use of a more precise methodology in the analysis of foodstuffs<sup>2</sup> has enabled us to determine that these initial estimations of consumption may have been overestimated and that real flavonoid consumption is considerably less. Hertog & col.<sup>3</sup> carried out a seven country study in Finland, the United States, Serbia/Croacia, Greece, Italy, Holand and Japan. They determined that the average daily intake of flavonoles and flavons to be at between 6 mg in Finland and 64 mg in Japan. Subsequent studies carried out in another two European countries served to ratify these results with daily consumption levels in Denmark and Germany being determined at 56 and 11 mg respectively<sup>4,5</sup>. More recently, Noroozi & col.<sup>6</sup> established average intake at approximately 35 mg per day, 91% of which was composed of quercetin. In fact, quercitrin and rutin, heterosides of quercetin, are the most commonly found flavonoid in vegetable foodstuffs, as well as the most commonly encountered flavonoids in diet.

**FIGURA 1.** Estructuras químicas generales de los distintos grupos de flavonoides.  
**FIGURE 1.** General chemical structures of the different groups of flavonoids.



Además de estar presentes en los alimentos, los flavonoides constituyen los principios activos de numerosas plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de distintas patologías que afectan a numerosos sistemas orgánicos, como el aparato digestivo, el aparato urinario, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central o la piel<sup>7</sup>. Los flavonoides se utilizan sobre todo en patologías que afectan al terreno capilar-venoso; solos o asociados, son constituyentes habituales de preparaciones vasculoprotectoras y venotónicas y de formulaciones tópicas utilizadas en flebología. Además, numerosos estudios describen los

In addition to being present in foodstuffs, the flavonoids constitute the active principles of numerous medicinal plants used in the treatment of different pathologies affecting numerous organ systems, such as the digestive and urinary apparatus, the cardiovascular and central nervous system or the skin<sup>7</sup>. The flavonoids are used above all in pathologies that affect capillary-venous areas. Whether used alone or in conjunction with others, they are frequently used as ingredients in vascular protective preparations and venous tonics, as well as in topical formulations used in flebology. Additionally, numerous studies describe

distintos efectos biológicos atribuidos a los flavonoides, incluyendo la actividad antibacteriana<sup>8</sup>, antiviral<sup>9,10</sup>, antiinflamatoria<sup>11,12</sup>, espasmolítica<sup>13,14</sup>, antiulcerosa<sup>15</sup>, vasodilatadora<sup>16,17</sup>, inhibición de la agregación plaquetaria<sup>18,19</sup>, citotóxica<sup>20,21</sup>, antitumoral<sup>22</sup> y estrogénica<sup>23</sup>, entre otras. Estudios más recientes han propuesto la posible aplicación de los flavonoides en el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

## 2. FLAVONOIDES Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

### 2.1. Introducción

La denominación Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) engloba fundamentalmente a dos entidades patológicas: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Ambas se caracterizan por una inflamación crónica del intestino, con períodos de exacerbación seguidos de intervalos más o menos prolongados de remisión de los síntomas. La EC es una enfermedad que puede afectar a cualquier segmento del tubo digestivo, si bien las zonas más comúnmente afectadas son el íleon terminal y el colon proximal. Se caracteriza por un daño inflamatorio que se extiende a través de toda la pared intestinal, lo que predispone a la aparición de perforaciones, estenosis y fístulas con órganos adyacentes<sup>24</sup>. Por el contrario, la CU es una enfermedad específica del colon que afecta generalmente a la porción distal y se extiende progresivamente en dirección proximal. La inflamación en este caso se circunscribe a la mucosa y submucosa<sup>25</sup>.

Aunque la etiología de la enfermedad no se conoce con exactitud, está establecido que antígenos presentes en el lumen originan una respuesta inmune exagerada<sup>26</sup>, la cual no es controlada de forma conveniente por los mecanismos encargados de desactivarla una vez que ha ejercido su cometido<sup>27</sup>.

La activación mantenida de la respuesta inmune origina un daño en la mucosa del intestino que se acompaña de la ruptura del epitelio intestinal, el cual, al perder su integridad, da lugar a un aumento de la permeabilidad, lo que se traduce en un incremento en el flujo de los contenidos luminales hacia la lamina propia, y en la exacerbación de la respuesta inmune descontrolada<sup>28</sup>. La consecuencia es una alteración de la funciona-

the different biological effects that are attributed to flavonoids. These include antibacterial<sup>8</sup>, antiviral<sup>9,10</sup>, antiinflammatory<sup>11,12</sup>, spasmolytic<sup>13,14</sup>, antiulcer<sup>15</sup>, and vasodilatory activity<sup>16,17</sup>, as well as having antithrombotic<sup>18,19</sup>, cytotoxic<sup>20,21</sup>, antitumoral<sup>22</sup> and estrogenic<sup>23</sup>, properties, among others. More recent studies have proposed the possible application of flavonoids in the treatment of inflammatory bowel disease.

## 2. FLAVONOIDS AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

### 2.1. Introduction

The term inflammatory bowel disease (IBD) encompasses two different pathological areas: Crohn's disease (CD) and ulcerous colitis (UC). Both disorders are characterised by chronic inflammation of the bowel, with periods of worsening of the symptoms followed by a more or less prolonged remission. CD is an illness that may affect any segment of the digestive tract. However, the most commonly affected areas are the terminal ileum and the proximal colon. This is characterised by inflammatory damage which spreads throughout the entire intestinal wall, leading to the appearance of perforations, stenosis, and fistulas in adjacent organs<sup>24</sup>. On the other hand, UC is a specific disorder of the colon which generally affects the distal portion and spreads progressively in a proximal direction. Inflammation in this case is restricted to the intestinal mucous and submucous<sup>25</sup>.

Although the exact ethiology of the disease is not yet known, it has been established that the antigens present in the lumen cause an exaggerated immune response<sup>26</sup>, which is not controlled appropriately by the mechanisms responsible for its deactivation, once its mission has been carried out<sup>27</sup>.

The continued immune response causes damage to the mucous in the intestine, which is accompanied by the rupture of the intestinal epithelium. On losing its integrity, an increase in permeability occurs, which results in an increase in luminal flow content towards the lamina propria, and a worsening of the uncontrolled immune response<sup>28</sup>. The consequence of such is an alteration in intestinal functionality, both in terms of motility, as in the absorption of water

lidad intestinal, tanto en la motilidad como en la absorción de agua y electrolitos, responsable de algunos de los síntomas característicos de estas patologías<sup>29,30</sup>, como diarrea, dolor abdominal, malnutrición, etc.

La presencia de antígenos luminales en el interior de la mucosa promueve el acceso masivo de leucocitos hacia la zona del intestino lesionada<sup>31,32</sup>. Estos leucocitos van a originar, tanto por sí mismos como indirectamente, por su actuación sobre otros elementos celulares del tejido intestinal, la liberación de diversos mediadores de carácter proinflamatorio, como interleucina (IL) 1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF), eicosanoides como el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), factor activador de plaquetas (PAF) y metabolitos reactivos derivados del oxígeno y del nitrógeno, encargados todos ellos de la amplificación y cronificación del proceso inflamatorio<sup>33</sup>.

Aunque estas enfermedades inflamatorias crónicas han sido objeto de intenso estudio por parte de la comunidad científica en los últimos años, 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 adversos, con la consiguiente mejora en la calidad de vida del enfermo. Éste puede ser el caso de los flavonoides, compuestos que además de estar dotados de una baja toxicidad<sup>34</sup>, presentan unas características idóneas para ser considerados como compuestos antiinflamatorios aplicables en la EII:

- a) inhiben distintas enzimas cuya expresión y/o actividad se encuentran incrementadas en los procesos inflamatorios<sup>7</sup>.
- b) disminuyen la actividad de diversas células del sistema inmune, tal y como se ha podido comprobar en distintos ensayos *in vitro*<sup>34,35</sup>.
- c) son compuestos que presentan propiedades antioxidantes y/o antirradicalarias *in vitro*<sup>36</sup>; habiéndose incluso demostrado para algunos de ellos la capacidad 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<sup>37,38</sup>.

and electrolytes, which are responsible for some of the characteristic symptoms of these pathologies<sup>29,30</sup>, such as diarrhoea, abdominal pain, and malnutrition, etc.

The presence of luminal antigens within the mucous allows the leukocytes to gain access on a massive scale within the area of damaged intestine<sup>31,32</sup>. Due to their action upon other cellular elements in intestinal tissue, the leukocytes either directly or indirectly promote the release of various mediators of a proinflammatory nature, such as interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumoral necrosis factor (TNF), eicosanoids, such as leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), platelet activating factor (PAF) and reactive metabolites derived from oxygen and nitrogen. All of these agents are responsible for the deterioration and long term persistence of the inflammatory process<sup>33</sup>.

Although over recent years a great deal of intense research has been carried out by the scientific community on these chronic inflammatory diseases, therapy continues to be unsatisfactory, and is associated with a high degree of adverse reactions. Consequently, there is considerable interest in the development of new treatments that are capable of combining effectiveness with a reduction in adverse effects, and the consequent improvement in patient quality of life. The fact that flavonoids are anti-inflammatory compounds of low toxicity<sup>34</sup>, indicates that they may provide an ideal treatment for IBD, for the following reasons:

- a) they inhibit enzymes whose expression and/or activity increase in inflammatory processes<sup>7</sup>.
- b) as demonstrated in different *in vitro* tests<sup>34,35</sup>, they reduce the activity of numerous immune system cells.
- c) they have been found to possess antioxidant properties and/or *in vitro*<sup>36</sup> antiradical effects. Some flavonoid compounds have even been demonstrated to have the capacity to increase intestinal glutathione content, when orally administered to normal rats. In such cases, they were found to protect the intestine from lipoperoxidative damage, which can occur when a super production of free radicals takes place<sup>37,38</sup>.

The first study to indicate the potential beneficial effect of flavanoids on IBD was carried out by Galsanov y col.<sup>39</sup> In this study the anti-

El primer estudio que apuntó el potencial efecto beneficioso de los flavonoides en la EII fue realizado por Galsanov y col.<sup>39</sup> 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<sup>40</sup>. Distintos flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria intestinal en estos modelos, incluyendo heterósidos como la quercitrina<sup>41,42</sup>, la rutina<sup>43,44</sup> la diosmina y la hesperidina<sup>45</sup>, y geninas como la morina o la silimarina<sup>46,47,48</sup>. 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 del proceso inflamatorio cuando se administran una vez inducido el daño. Es difícil establecer una relación estructura-actividad, ya que el número de flavonoides ensayado hasta el momento es bajo. No obstante, diferentes tipos de flavonoides, incluyendo flavonoles (en forma de heterósidos como la quercitrina y la rutina o geninas como la morina), un heterósido de flavona (la diosmina), un heterósido de flavanona (la hesperidina) y un flavanolignano (la silimarina) han mostrado actividad. De todos los flavonoides ensayados hasta el momento, la quercitrina es el más potente, al ejercer su actividad 'preventiva' o 'curativa' 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 cuando se estudiaron las geninas. Recientemente el dosmalfato, un compuesto derivado de la diosmina, ha mostrado ser efectivo en los modelos de colitis inducida por DSS<sup>49</sup> y TNBS<sup>50</sup> en ratones. El estudio del efecto terapéutico de la administración oral de un flavonoide sintético, el DA-6034, 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

inflammatory activity of quercitrin, administered at dosages of 25 and 100 mg/kg, in an allergic type intestinal inflammation rat model was described. More recently, the activity of flavonoids in numerous well established rat intestine inflammation models have been assessed, such as in colitis models induced by acetic acid, trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) and dextrane sulphate sodium (DSS). These models presented some similarities with IBD in humans<sup>40</sup>. Different flavonoids have been observed to show anti-inflammatory activity in these models, including some heterosides such as quercitrin<sup>41,42</sup>, rutin<sup>43,44</sup>, diosmin and hesperidin<sup>45</sup>, and some genins, such as morin or silymarin<sup>46,47,48</sup>. The effects of the different flavonoid compounds were observed at acute and semi-chronic stages of intestinal inflammation. These were observed to prevent damage to the colon when administered prior to harmful agent administration (acetic acid or TNBS), and to aid damaged colon tissue recovery at semi-chronic stages of inflammation, when administered after damage had been induced. It is difficult to establish a structure-activity relationship, given that the number of flavonoids tested up until now has been very low. However, different types of flavonoids, including the flavonoles (in the form of heterosides, such as quercitrin and rutin, or genins, such as morin), a flavon heteroside (diosmin), a flavanone heteroside (hesperidin) and a flavanolignan (silymarin) have all shown activity. Of all the flavonoids tested up to the present, quercitrin has been found to be the most potent, showing preventative or curative properties at dosage levels of 1 and 5 mg/kg. Other flavonoids have shown intestinal anti-inflammatory activity at varying dosage levels, with heterosides at between 10 and 25 mg/kg, and with genins at between 10 and 200 mg/kg. In recent tests, dosmalphate, a compound derived from diosmin, has been shown to be effective in DSS<sup>49</sup> and TNBS<sup>50</sup>-induced colitis models in rats. The study of the therapeutic effect of DA-6034, an orally administered synthetic flavonoid, in experimentally colitis models induced by TNBS and acetic acid and in spontaneous colitis in HLA-B27 transgenic rats, showed that this flavonoid was as equally effective as other widely used IBD drugs, such as prednisolone y sulphasalazine<sup>51</sup>.

flavonoide resultó ser igualmente eficaz que otros fármacos ampliamente utilizados en la EII, como son prednisolona y sulfasalazina<sup>51</sup>.

## 2.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA INTESTINAL

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

2.2.1. Propiedades antioxidantes y/o anti-radicalarias. Todos los flavonoides estudiados mejoran el estado de estrés oxidativo asociado al proceso inflamatorio intestinal inducido experimentalmente<sup>52,53</sup>, 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 peroxidación lipídica 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, desempeñan un papel importante en la etiopatogénesis de la EII en humanos<sup>54</sup>.

2.2.2. Actuación sobre el metabolismo 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<sup>55</sup>. En condiciones fisiológicas se generan pequeñas cantidades de NO por parte de la isoforma constitutiva de la óxido nítrico sintasa (cNOS), que ejerce un efecto protector directo en las fases iniciales del proceso inflamatorio intestinal, principalmente al inhibir la interacción entre el leucocito y el endotelio vascular así como al reducir la permeabilidad epitelial<sup>56,57</sup>. Por el contrario, la síntesis de NO se incrementa en situaciones de inflamación crónica, principalmente como consecuencia de la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS). La producción de NO da lugar a un efecto lesivo como consecuencia de su interacción con el anión superóxido, generando especies reactivas como el peroxinitrito, que ocasiona una situación de estrés oxidativo y daño tisular<sup>58</sup>. 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

## 2.2. MECHANISMS INVOLVED IN INTESTINAL ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

The participation of different mechanisms in the intestinal anti-inflammatory activity of the flavonoids have been proposed:

2.2.1. Antioxidant and/or antiradical properties. All of the flavonoids studied have been observed to improve the oxidative stress associated with experimentally induced intestinal inflammatory processes<sup>52,53</sup>, given that they either reduce glutathione depletion or reduce malonyldialdehyde (MDA) content in the colon. Both processes are biochemical markers that indicate the level of lipid peroxidation in intestinal tissue. This effect may be considered of great interest, given that free radicals, including oxygen and nitrogen derivatives, play an important role in the ethio-pathogenesis of IBD in humans<sup>54</sup>.

2.2.2. The effect of nitric oxide (NO) on the metabolism. An important consideration to be taken into account is the growing interest over the past decade in the pathogenesis of NO in IBD<sup>55</sup>. Under physiological conditions small quantities of NO are generated by the isoform of constitutive nitric oxide synthase (cNOS), which has a direct protective effect throughout the initial phases of the intestinal inflammatory process. This is mainly brought about by the interaction between the leukocyte and the vascular endothelium, as well as the reduction in epithelial permeability<sup>56,57</sup>. On the other hand, NO synthesis increases in situations of chronic inflammation, mainly as a consequence of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS). The production of NO gives rise to a lesion effect as a consequence of its interaction with the super oxide anion, generating reactive species, such as peroxynitrite, which produces oxidative stress and tissue damage<sup>58</sup>. There is a possibility that the pharmacological effects of the flavonoids are related to the metabolism of NO. Firstly, the flavonoids may preserve the beneficial functions of NO, through the direct capture of super oxide anions<sup>59</sup>, which will consequently prevent interaction with generated NO. Secondly, flavonoids are capable of inhibiting the expression of iNOS<sup>60,42</sup>, and finally, can act as powerful captors of peroxynitrite radicals<sup>61</sup>. Flavonoids are capable

NO, al captar directamente aniones superóxido<sup>59</sup> y por tanto impedir la interacción con el NO generado; en segundo lugar, los flavonoides son capaces de inhibir la expresión de la iNOS<sup>60,42</sup>; y, por último, actúan como potentes captadores de radicales peroxinitrito<sup>61</sup>. 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 con morina en animales con inflamación intestinal inducida con TNBS se traduce en una disminución de la actividad de la NOS en explantes intestinales procedentes de animales colícticos<sup>47</sup>.

2.2.3. Inhibición de la actividad lipoxigenasa y reducción en la producción de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). 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<sup>62</sup> o el bloqueo de su receptor<sup>63</sup> 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 establecer una relación directa entre la reducción en los niveles colónicos del eicosanoide y el efecto antiinflamatorio intestinal<sup>41,46</sup>. 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<sup>63</sup>. 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<sup>54</sup>. De hecho, en la mayoría de los estudios con los 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<sup>64</sup>. En cualquier caso es conveniente resaltar que la inhibición de la lipoxigenasa no constituye, por sí sola, una diana terapéutica útil en la EII<sup>65</sup>.

2.2.4. Inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias. Esta actuación se deriva

therefore, of preventing the detrimental effects generated by NO in intestinal inflammation. In fact, it has been established that morin treatment in TNBS-induced intestinal inflammation, results in a decrease in NOS activity in intestinal explants from colitic animals<sup>47</sup>.

2.2.3. The inhibition of lipoxigenase and the reduction of leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) production.

Different studies have considered the possibility that in IBD, LTB<sub>4</sub> carries out an important function as an inflammatory mediator. In fact, the inhibition of its synthesis<sup>62</sup>, or the blocking of its receptor<sup>63</sup> produce beneficial results in experimental colitis. Although most of the flavonoids that have been studied reduce LTB<sub>4</sub> production in the colon, no direct relationship between the reduction in levels of colonic eicosanoid and the anti-inflammatory effect in the intestine have been established<sup>41,46</sup>. LTB<sub>4</sub> is involved in the pathology of IBD, given that it facilitates chemotaxis of neutrophils, its adherence and degranulation in the inflamed colon<sup>63</sup>. As a consequence of the activation of the NADPH oxidase system and the subsequent action of mieloperoxidase (MPO), massive quantities of superoxide and hypochlorous acid, which are responsible for direct cytotoxicity in intestinal tissue, are generated. This in turn facilitates the additional release of different proinflammatory mediators<sup>54</sup>. In fact, in most studies of flavonoids in experimental colitis models, a significant reduction of colonic mieloperoxidase activity has been observed. This enzyme is predominantly found in the azurophilic granules of the neutrophils and is considered to be a sensitive marker of leukocyte infiltration<sup>64</sup>. In any case, in the treatment of IBD, it is worth pointing out that the inhibition of lipoxigenase does not in itself constitute a useful therapeutic target<sup>65</sup>.

2.2.4. Inhibition of proinflammatory cytokine production.

The information available on this subject is mainly derived from the results obtained from in vitro tests. Manthey and col.<sup>66</sup> studied the capacity of the different flavonoids present in citric fruits to inhibit the expression of TNF- $\alpha$  cytokin in human monocytes. The activity of different polymethoxyflavones, kaempferol, apigenin and quercetin were studied. Heptamethoxyflavone was found to be the most effective inhibitor, but although it was capable of inhibiting IL-10 production, it could not inhibit IL-1 $\beta$ , IL-6 or



fundamentalmente de los resultados obtenidos con ensayos *in vitro*. En este sentido, Manthey y col.<sup>66</sup> revisaron la capacidad de distintos flavonoides presentes en los cítricos de inhibir la expresión de la citocina TNF- $\alpha$  en monocitos humanos, como distintas polimetoxiflavonas, el kanferol, la apigenina y la quercetina, siendo la más potente la heptametoxiflavona, la cual era capaz de inhibir la producción de IL-10 pero no la de IL-1 $\beta$ , IL-6 o IL-8. Estos autores formularon la hipótesis de que, entre otros mecanismos, la capacidad manifestada por estos flavonoides de inhibir la actividad fosfodiesterasa podría estar relacionada con la inhibición en la producción de citocinas. Xagorari y col.<sup>67</sup> describieron que los flavonoides luteolina, 7-glucósido de luteolina, quercetina y genisteína inhibían la liberación de TNF- $\alpha$  y de IL-6 en células RAW 267.4 estimuladas con LPS, mientras que el eriodictiol y la hesperetina sólo inhibían la producción de TNF- $\alpha$ . Estos mismos autores concluyeron que el compuesto más potente fue la luteolina, y que en su acción estaba involucrada su capacidad de inhibir la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas, la expresión génica mediada por el factor de transcripción NF $\kappa$ B y la subsiguiente producción de citocinas proinflamatorias. De hecho, existen numerosos compuestos fenólicos con actividad antiinflamatoria mediada por la inhibición de NF $\kappa$ B en varios tipos celulares<sup>68</sup>, efecto que se ha demostrado también en estudios *in vivo*<sup>42, 69</sup>. Existen estudios que demuestran que la activación del NF $\kappa$ B es sensible al estrés oxidativo, como por ejemplo la exposición a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y que esta activación puede ser modulada por compuestos antioxidantes<sup>70</sup>. Esto resulta interesante desde el punto de vista de la inflamación intestinal puesto que está demostrado que los radicales libres juegan un papel muy importante en esta enfermedad tanto en humanos<sup>71,72</sup> como en modelos experimentales de colitis<sup>73</sup>. Sin embargo, existen muchas discrepancias en este aspecto debido a que los sistemas experimentales utilizados para inducir estrés celular en muchas ocasiones no son adecuados. Por ejemplo, muchos de los agentes que inducen genotoxicidad ocasionan cambios en la fisiología de la célula y podrían, de forma indirecta, activar al NF $\kappa$ B a través de múltiples mecanismos<sup>74</sup>. Los flavonoides a menudo poseen actividad antioxidante, reduciendo el número de especies reactivas del oxígeno, de forma que

IL-8. These authors formulated the hypothesis that, among other mechanisms, the inhibitory capacity of these flavonoids on phosphodiesterase could be related to their capacity to inhibit cytokine production. Xagorari and col.<sup>67</sup> claim that luteolin flavonoids, (luteolin 7-glucoside, quercetin and genistein), inhibit the release of both TNF- $\alpha$  and IL-6 in LPS-stimulated RAW 267.4 cells, while eriodictiol and hesperetin only inhibited the production of TNF- $\alpha$ . These same authors concluded that the most potent compound was luteolin, and that its action was attributable to its capacity to inhibit phosphorylation of tyrosine residues in proteins, gene expression mediated by NF $\kappa$ B transcription factor and the subsequent production of proinflammatory cytokines. In fact, numerous phenolic compounds possessing anti-inflammatory activity mediated through NF $\kappa$ B inhibition in various types of cells are known to exist<sup>68</sup>. This effect has also been demonstrated in *in vivo* studies<sup>42, 69</sup>. Other studies show that NF $\kappa$ B activation is oxidative stress sensitive, as for example, in exposure to hydrogen peroxide. This type of activation can be modulated by antioxidant compounds<sup>70</sup>. From an intestinal inflammation point of view, this is of interest, given that it has been demonstrated that free radicals play a very important role, as much in the human variety of the disease<sup>71,72</sup>, as in experimental colitis models<sup>73</sup>. However, many discrepancies have arisen on this aspect, due to the fact that the experimental systems used to induce cellular stress have not been appropriate in many cases. For example, many of the agents that induce genotoxicity cause physiological changes in the cell and through multiple mechanisms could indirectly activate NF $\kappa$ B<sup>74</sup>. Flavonoids often present antioxidant activity, by reducing the number of reactive species of oxygen. In such cases, they would be unspecific inhibitors of this transcription factor, such as quercetin<sup>75</sup> and resveratrol<sup>76</sup>. The role of reactive oxygen species in the activation of NF $\kappa$ B has been studied in various cell lines but has only been properly characterised in lymphocytes<sup>77,78</sup>. However, the experimental demonstration that antioxidant compounds, such as vitamin C<sup>79</sup>, inhibit NF $\kappa$ B activation in human endothelial cells, independently of its antioxidant action, has led to a questioning of the role of these types of antioxidants in this process<sup>80</sup>. The classical and predominate NF $\kappa$ B type is a heterodimer made up of the sub-units

constituirían inhibidores inespecíficos de dicho factor de transcripción, como la quercetina<sup>75</sup> y el resveratrol<sup>76</sup>. El papel de las especies reactivas del oxígeno en la activación del NFκB ha sido estudiado en varias líneas celulares y sólo bien caracterizado en linfocitos<sup>77,78</sup>. Por otra parte, la demostración experimental de que compuestos antioxidantes como la vitamina C<sup>79</sup> inhiben la activación de NFκB en células endoteliales humanas independientemente de la acción antioxidante ha llevado recientemente a cuestionar el papel de estos antioxidantes en este sentido<sup>80</sup>. La forma clásica y predominante del NFκB consiste en un heterodímero formado por las subunidades p65 (RelA) y p50 (NFκB 1). Sin embargo existen múltiples variantes que se presentan como homo 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)<sup>81</sup>. La capacidad de interferir con la vía de activación del NFκB fue previamente descrita para la quercetina, a través de un mecanismo de inhibición de la actividad de las kinasas. Estas proteínas promueven la degradación de las proteínas IκB, normalmente unidas al NFκB en situación basal, permitiendo al NFκB liberado dirigirse al núcleo y modular la transcripción de los correspondientes genes diana, que promueven la síntesis de citocinas proinflamatorias como el TNF-α<sup>82</sup>. La actividad de las IκB kinasas, IKK1 e IKK2, está regulada por la fosforilación de miembros de las kinasas de la familia de las proteínas activadas por mitógenos (MAPKKK). Algunos flavonoides poseen también actividad inhibidora del NFκB; éstos incluyen la genisteína (isoflavona de la soja que actúa como potente inhibidor de tirosín kinasa) a 100 μM en células Jurkat estimuladas con un éster del forbol (PMA), la catequina (344 μM), epicatequina (344 μM) y taxifolina (164 μM, tóxica a 328 μM) en RAW 264.7 estimuladas con TNF-α<sup>83</sup>. La genisteína, junto con la quercetina, también inhibidor de tirosín kinasas, inhibe la activación de este factor de transcripción interrumpiendo la degradación de IκB<sup>84</sup>. La vía del NFκB proporciona desafíos muy importantes desde el punto de vista del desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos. Existen dos grupos de dianas farmacológicas potenciales a este respecto: el complejo IKK, donde convergen muchas vías de activación celular, y la ubiquitinación y posterior degradación del IκB. Se han citado anteriormente numerosos flavonoides que modulan

p65 (RelA) and p50 (NFκB 1). However, multiple variants exist, such as the homo or heterodimers from the five known members of the Rel protein family (p65/RelA, c-Rel, RelB, p50/NFκB 1 y p52/ NFκB 2)<sup>81</sup>. The capacity of quercetin to interfere with NFκB activation, through a mechanism that inhibits kinase activity, has been previously described. These proteins promote the degradation of the IκB proteins, which are usually linked to NFκB in basal state, allowing released NFκB to migrate towards the nucleus and to modulate the transcription of the diana genes, and stimulate the sythesis of proinflammatory cytokins, such as TNF-α<sup>82</sup>. The activity of IκB kinase, IKK1 and IKK2, is regulated by the phosphorylation of members of the kinase family of proteins that are activated by the mitogens (MAPKKK). Some flavonoids also posses NFκB inhibitory activity. These include genistein (a soya isoflavone which acts as a powerful tyrosine kinase inhibitor) at 100 μM in Jurkat cells, stimulated with a phorbol ester (PMA), catechin (344 μM), epicatechin (344 μM) and taxipholin (164 μM, toxic at 328 μM) in RAW 264.7 cells stimulated with TNF-α<sup>83</sup>. Genistein, together with quercetin, which is also a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the activation of this transcription factor, interrupting the degradation of IκB<sup>84</sup>. The NFκB pathway constitutes major challenges in the development of new pharmacological treatments. There are two groups of potential pharmacological targets with regard to this aspect: the IKK complex, where many cellular activation pathways converge, and the ubiquitination and subsequent degradation of IκB. As previously quoted, numerous flavonoids modulate the NFκB pathway. However, an exhaustive study on the specificity of its activation in cell lines is necessary, before any useful clinical drug development can take place.

In addition to reducing the production and release of previously mentioned inflammatory mediators, flavanoids such as apigenin, luteolin and quercetin can inhibit the action that cytokins exert over different types of cell, by acting upon their corresponding receptors<sup>85,86,87</sup>.

With regard to in vivo studies, morin treatments have been shown to inhibit IL-1β production in semi-chronic phases of TNBS-induced intestinal inflammation<sup>47</sup>. Such an inhibition has been observed with quercitrin in the treatment of experimental DSS induced colitis<sup>69</sup>. IL-1β is a cytokin that is mainly produced by activated

la vía del NF $\kappa$ B, pero es necesario un estudio exhaustivo de la especificidad de su activación en líneas celulares antes del desarrollo de fármacos clínicamente útiles en este sentido.

Además de reducir la producción y liberación de los mediadores inflamatorios citados, se ha descrito que flavonoides como la apigenina, la luteolina y la quercetina son capaces de inhibir las acciones que las citocinas ejercen sobre los distintos tipos celulares actuando sobre sus correspondientes receptores<sup>85,86,87</sup>.

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<sup>47</sup>. También se observó esta inhibición con la quercitrina en el tratamiento de la colitis experimental inducida por DSS<sup>69</sup>. La IL-1 $\beta$  es una citocina producida principalmente por los macrófagos activados, y que se ha implicado en la patogénesis de la EII, tanto en humanos<sup>88</sup> como en modelos experimentales<sup>89,90</sup>.

**2.2.5. Preservación de la función absorptiva colónica.** La función absorptiva colónica se encuentra profundamente alterada en la inflamación intestinal<sup>91</sup>, 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. De hecho, se ha propuesto que una alteración de la permeabilidad intestinal puede ser un factor desencadenante del proceso inflamatorio intestinal<sup>92</sup>, ya que un epitelio fácilmente permeable puede permitir la entrada en la lamina propia 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<sup>41</sup>. Se ha descrito que se encuentra incluso alterada cuando la recuperación histológica es prácticamente completa<sup>93</sup>. De los distintos flavonoides estudiados, la quercitrina<sup>41</sup>, la rutina<sup>43</sup>, la hesperidina<sup>45</sup> y la morina<sup>46</sup> han demostrado su capacidad de promover la mejora de la funcionalidad absorptiva colónica en los

macrófagos, and has been found to be involved in the pathogenesis of IBD, in both humans<sup>88</sup> and in experimental models<sup>89,90</sup>.

**2.2.5. Preservation of colonic absorptive function.** In intestinal inflammation, colonic absorptive function is profoundly altered<sup>91</sup>, so its recovery may contribute, together with the previously mentioned action, to the beneficial effects produced by flavonoids in experimental colitis models. In fact, it has been proposed that an alteration of intestinal permeability could be a factor that is responsible for the onset of intestinal inflammatory processes<sup>92</sup>. An easily permeable epithelium may allow bacterial or dietary antigens that have not been properly annulled by the intestinal mucosal immune system, to enter into the lamina propria. This may cause the onset of an uncontrolled inflammatory response. The colonic absorption of fluids *in vivo* has been found to be a difficult aspect of intestinal inflammation, given that it is one of the functions that requires the most time to achieve recovery<sup>41</sup>. A continued alteration to this function has even been detected after almost complete histological recovery<sup>93</sup> has occurred. Of the different flavonoids studied, quercitrin<sup>41</sup>, rutin<sup>43</sup>, hesperidin<sup>45</sup> and morin<sup>46</sup> have been found to improve colonic absorptive function in colitic animals. However, in comparison with control (no flavonoid treatment), quercitrin was the only flavonoid to have completely restored colonic hydroelectrolytic transport, leading to a reduction in the incidence of diarrhoea, one of the characteristic symptoms of intestinal inflammation. It is important to take into account that the improvement of colonic function may also be the consequence, rather than the cause, of the faster recovery of the mucosa subjected to inflammation. The capacity of flavonoids to act upon hydroelectrolytic transport alteration justifies their use in antidiarrhoea treatments. Diarrhoea in IBD may be attributable to hydro-electrolytic transport disorders through the mucous and/or a motility disturbances. Consequently, the study of the antidiarrhoea effect of flavonoids has been centred on discovering how they affect these so closely related intestinal functions. Different *in vivo* tests have demonstrated that flavonoids inhibit intestinal secretion and motility, delaying therefore, intestinal transit and counteracting the accumulation of fluids in the lumen, generated in the presence of secretagogue compounds, such as ricinic acid<sup>94,95,96</sup>.

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). Es importante tener en cuenta que la mejora en esta funcionalidad colónica pudiera también ser una consecuencia, más que una causa, de la recuperación más rápida de la mucosa sometida al proceso inflamatorio. 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 evidentemente se encuentran íntimamente relacionadas. Distintos ensayos in vivo han demostrado que los flavonoides inhiben la secreción y la motilidad intestinal, retrasando en consecuencia el tránsito intestinal y contrarrestando la acumulación de fluidos en el lumen generada en presencia de compuestos secretagogos como el aceite de ricino<sup>94,95,96</sup>.

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<sup>97,98,99</sup>, otros mecanismos pueden también contribuir al efecto espasmolítico de la quercetina. 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<sup>100,101,102</sup>. Otro mecanismo que puede estar involucrado es la inhibición de la actividad de la protein kinasa C (PKC)<sup>103</sup>, que se ha postulado que contribuye al efecto relajante de los flavonoides en otros tejidos, como el músculo liso vascular<sup>17</sup>.

La mayoría de los ensayos encaminados a estudiar el mecanismo de la acción antisecretora de los flavonoides se han realizado utilizando segmentos intestinales procedentes de animales de experimentación o líneas celulares epiteliales humanas (células  $T_{84}$ ) montadas en cámara de

It is important to point out that the majority of in vitro motility studies have been carried out with quercetin, the most commonly found flavonoid in nature. In addition to its effects on the intracellular pathways mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  in the smooth muscle cell<sup>97,98,99</sup>, other mechanisms may also contribute to the spasmolytic effect of quercetin. In such a way, as demonstrated in other tissues<sup>100,101,102</sup>, quercetin has the capacity to inhibit AMPc phosphodiesterase, generating an increase in intracellular levels of AMPc. Another mechanism that may be involved is the inhibition of the protein kinase C (PKC)<sup>103</sup>. The possibility that flavonoids contribute to producing a relaxing effect in other tissues, such as the vascular smooth muscle<sup>17</sup>, have also been considered.

Most of the tests carried out to study the anti-secretion mechanisms of the flavonoids have been carried out using intestinal segments taken from experimental animals or human epithelial cell lines ( $T_{84}$  cells) set up in Ussing chambers<sup>104</sup>. This device allows continuous monitoring of the electrolytic transport through the epithelial cells. These studies revealed that quercetin exerts a secretagogue effect<sup>105,106,107</sup>, which was initially attributed to its capacity to act as an inhibitor of phosphodiesterase and to generate an increase in intracellular AMPc, as occurring with other secretagogue agents, such as forskolin<sup>108</sup>. However, later studies have proposed that the increase in electrogenic secretion of chloride generated by quercetin in the small and large intestine in rats, occurs independently of the increase in intracellular AMPc<sup>102</sup> production. This action can also be differentiated from that shown by genistein (an isoflavon that acts as a tyrosine kinase inhibitor), which induces the secretion of chlorides, both in preparations from rat colons<sup>105</sup> and in  $T_{84}$  cells<sup>109,110</sup>. In this case, the process occurs through the direct stimulation of the CFTR channel<sup>111,112</sup>. Other flavonoids, such as tangeretin or nobiletin, have also been shown to stimulate the electrogenic secretion of chloride ions in  $T_{84}$  cells<sup>113</sup>. Other in vitro studies have demonstrated that the incorporation of sugar into the flavonoid structure generates a loss of secretory activity<sup>101,102,109</sup>. The effect of quercetin on secretagogue activity may be considered as a paradox with regard to its previously mentioned antidiarrhoea activity. Tests carried out in Ussing chambers have observed that quercetin inhibits carbachol-induced secretagogue response in both

Ussing<sup>104</sup>, dispositivo que permite la monitorización continua del transporte electrolítico a través de las células epiteliales. Estos estudios revelaron que la quercetina ejercía un efecto secretagogo<sup>105,106,107</sup>, efecto inicialmente atribuido a la capacidad de este flavonoide de actuar como inhibidor de la fosfodiesterasa y generar un incremento de los niveles intracelulares de AMPc<sup>102</sup>, análogamente a como actúan otros agentes secretagogos como la forskolina<sup>108</sup>. Sin embargo, estudios posteriores han propuesto que el incremento de la secreción electrogénica de cloruros generado por la quercetina en el intestino delgado y grueso de la rata es independiente del aumento en la producción intracelular de AMPc, y diferente del mostrado por la genisteína, una isoflavona que actúa como inhibidor de la tirosín kinasa y que induce la secreción de cloruros tanto en preparaciones de colon de rata<sup>105</sup> como en células T<sub>84</sub><sup>109,110</sup>, mediante la estimulación directa del canal CFTR<sup>111,112</sup>. Otros flavonoides, como la tangeretina o la nobiletina, estimulan también la secreción electrogénica de ion cloruro en células T<sub>84</sub><sup>113</sup>. Análogamente a lo demostrado en otros estudios in vitro, la introducción de un azúcar en la estructura del flavonoide genera una pérdida en la actividad<sup>101,102,109</sup>. La actividad secretagoga manifestada por la quercetina puede ser considerada paradójica con relación a su actividad antidiarreica anteriormente comentada. En este sentido, en ensayos realizados en cámara de Ussing se ha comprobado que la quercetina inhibe la respuesta secretagoga inducida con carbacol tanto en células T<sub>84</sub><sup>107</sup> como en el colon de la rata<sup>101</sup>; sin embargo, no mostró efecto alguno cuando la respuesta secretora era inducida con péptido intestinal vasoactivo (VIP)<sup>107</sup>. Estos resultados sugieren que la quercetina puede inhibir la vía intracelular mediada por calcio en el enterocito, de forma similar al mecanismo propuesto anteriormente para explicar su efecto espasmolítico. No obstante, no se pueden descartar otros mecanismos; como la inhibición de la secreción de cloruros inducida por el éster del forbol PMA<sup>107</sup>, un efecto que puede estar relacionado con la capacidad de este flavonoide de inhibir la actividad de la enzima PKC<sup>103</sup>.

En resumen, las múltiples propiedades que presentan los flavonoides sobre la respuesta inflamatoria permiten que puedan ser considerados para el diseño de nuevos fármacos útiles en el tratamiento de la enfermedad crónica del

T<sub>84</sub> cells<sup>107</sup> and in rat colon<sup>101</sup>. However, no effect was observed when secretory response was induced by vasoactive intestinal peptide (VIP)<sup>107</sup>. These results suggest that quercetin may inhibit the intracellular calcium-mediated pathway in the enterocyte, in a similar way as the previously proposed mechanism used to explain its spasmolytic effect. However, other possible mechanism cannot be disregarded, such as the phorbol ester-induced (PMA<sup>107</sup>) inhibition of chloride secretion. This effect may be related to the capacity of this flavonoid to inhibit the activity of PKC enzyme<sup>103</sup>.

In summary, the multiple properties presented by the flavonoid with regard to inflammatory response allow them to be considered for use in new treatments for chronic intestinal disease, or even to be used in conjunction with drugs that are currently being used.

intestino, o incluso para su asociación con los que actualmente se utilizan.

### BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976; 24: 117-91.
2. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 1993; 20: 21-29.
3. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995; 155: 381-86.
4. Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett* 1997; 117: 165-67.
5. Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke AZ. Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernährungswiss* 1998; 37: 147-63.
6. Noroozi M, Burns J, Crozier A, Kelly LE, Lean ME. Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54: 143-49.
7. Wollenweber E. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties*. Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A (Eds.). A.R. Liss, New York. 1988: 45-55.
8. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 1141-48.
9. Amoros M, Simoes CM, Girre L, Sauvager F, Cormier M. 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* 1992; 55: 1732-40.
10. Ohnishi E, Bannai H. Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity. *Antiviral Res* 1993; 22: 327-31.
11. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Holt RS. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 1988; 40: 787-92.
12. Emim JA, Oliveira AB, Lapa AJ. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and dauriquinone, in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 118-22.
13. Capasso A, Pinto A, Sorrentino R, Capasso F. Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contractions of guinea pig isolated ileum. *J Ethnopharmacol* 1991a; 34: 279-81.
14. Capasso A, Pinto A, Mascolo N, Autore G, Capasso F. Reduction of agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother Res* 1991b; 5: 85-87.
15. Batista LM, de Almeida AB, de Pietro Magri L, Toma W, Calvo TR, Vilegas W et al. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(3): 328-32
16. Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 1993a; 24: 857-82.
17. Duarte J, Perez Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1993b; 239: 1-7.
18. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1525-30.
19. Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 317-22.
20. Edwards JM, Raffauf RF, Le Quesne PW. Antineoplastic activity and cytotoxicity of flavones, isoflavones, and flavanones. *J Nat Prod* 1979; 42: 85-91.
21. Cushman M, Nagarathnam D. Cytotoxicities of some flavonoid analogues. *J Nat Prod* 1991; 54: 1656-60.
22. Virgili F, Acconcia F, Ambra R, Rinna A, Totta P, Marino M. Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor alpha signalling. *IUBMB Life* 2004; 56(3): 145-51.
23. Hong T, Nakagawa T, Pan W, Kim MY, Kraus WL, Ikehara T, et al. Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 317(1): 259-64.
24. Gassul M A, Cabré E. Management of inflammatory Bowel disease. Gassull MA, Obrador A, Chantar C (Eds.). Prous Science, Barcelona 1994: 7-12.
25. Obrador A, Riera J. Definitions. Management of Inflammatory Bowel Disease. Gassull MA, Obrador A, Chantar C (Eds.). Prous Science, Barcelona 1994: 1-6.
26. Shanahan F, Targan SR. Inflammatory bowel disease: from bench to bedside. En: Targan SR y Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to BedSide*. Baltimore (Maryland): Williams & Wilkins, 1994: 2-4.
27. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: aetiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.
28. MacDermott RP. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 1996; 31: 907-16.

29. McKay DM. Intestinal inflammation and the gut microflora. *Can J Gastroenterol* 1999; 13(6): 509-16.
30. Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors. *HepatoGastroenterology* 2000; 47: 29-43.
31. Kappeler A, Mueller C. The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease. *Histol Histopathol* 2000; 15: 167-172.
32. Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 12-16.
33. Katz JA, Itoh J, Fiocchi C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1999; 15: 291-97.
34. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 673-51.
35. Middleton E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998; 439: 175-82.
36. Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1990; 36: 317-22.
37. Valenzuela A, Aspigalla M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med* 1989; 55: 420-22.
38. Galvez J, de la Cruz JP, Zarzuelo A, Sanchez de Medina F, Sanchez de la Cuesta F. Oral administration of quercitrin modifies intestinal oxidative status in rats. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 1237-43.
39. Galsanov SB, Turova AD, Klimenko ED. Effect of quercitrin on structural changes in the large and small intestines during experimental enterocolitis. *Byull Eksp Biol Med* 1976; 81: 623-25.
40. Elson CO, Sartor B, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 1344-57.
41. Sanchez de Medina F, Galvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effects of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharm Exp Ther* 1996; 278: 771-79.
42. Camuesco D, Comalada M, Rodriguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2004; 143(7): 908-18.
43. Galvez J, Cruz T, Crespo ME, Ocete MA, Lorente MD, Sanchez de Medina F et al. Rutoside as mucosal protective in acetic-acid induced rat colitis. *Planta Med* 1997; 63: 409-14.
44. Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina F, Zarzuelo A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci* 1998; 62: 687-95.
45. Crespo ME, Galvez J, Cruz T, Ocete MA, Zarzuelo A. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med* 1999; 65: 651-53.
46. Ocete MA, Galvez J, Crespo ME, Cruz T, Gonzalez M, Torres MI et al. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. *Planta Med* 1998; 63: 261-70.
47. Galvez J, Coelho G, Crespo ME, Cruz T, Rodríguez-Cabezas ME, Concha A, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 2027-39.
48. Cruz T, Galvez J, Crespo ME, Ocete MA, Zarzuelo A. Effects of sylimarin on the acute stage of the trinitrobenzene-sulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med* 2001; 67: 94-96.
49. Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Orjales A, La Casa C. A new flavonoid derivative, dosmalfate, attenuates the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Int Immunopharmacol* 2003; 3(13-14): 1731-41.
50. Villegas I, La Casa C, Orjales A, Alarcón de la Lastra C. Effects of Dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzenesulfonic-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 460: 209-18.
51. Kim YS, Son M, Ko JI, Cho H, Yoo M, Kim WB et al. Effect of DA-6034, a derivative of flavonoid, on experimental animal models of inflammatory bowel disease. *Arch Pharm Res* 1999; 22(4): 354-60.
52. Loguercio C, D'Argenio G, Dell Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G et al. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1204-11.
53. Galvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, Zarzuelo A. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1949-59.
54. Yamada T, Grisham MB. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Targan SR, Shanahan F (Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland 1994: 133-50.
55. Grisham MB, Jourdeuil D, Wink DA. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G315-G320.
56. Lefer AM, Lefer DJ. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G572-G575.
57. Lefer AM, Lefer DJ. Nitric oxide II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G572-G575.
58. Miller MJS, Sandoval M. Nitric oxide III. A molecular to intestinal prelude inflammatory. *Am J Physiol* 1999; 276: G795-G799.
59. Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AJ, Bonomo RP. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub>(·). *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 1-8.
60. Chan MM, Fong D, Ho CT, Huang HI. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1281-86.

61. Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer EM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 591-93.
62. Bertran X, Mañe J, Fernandez-Bañares E, Castella R, Bartoli I, Ojanguren M et al. Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 1996; 38: 899-904.
63. Fretland DJ, Widomski D, Tsai D-S, Zemaitis JM, Levin S, Djuric SW, Shone RL et al. Effect of the leukotriene B4 receptor antagonist SC-41930 on colonic inflammation in rat, guinea pig and rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 572-76.
64. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulphonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 417-22.
65. Rask-Madsen J, Bukhave K, Laursen LS, Lauritsen K. 5-Lipoxygenase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease. *Agents Actions* 1992; Spec No: C37-46.
66. Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem* 2001; 8(2): 135-53.
67. Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharm Exp Ther* 2001; 296: 181-87.
68. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals: downregulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat Res* 2001; 480-481: 243-68.
69. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through the downregulation of NF- $\kappa$ B pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35: 584-92.
70. Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, et al. Effects of idoxifene and estradiol on NF-kappaB activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver*, 2001; 21(3): 183-91.
71. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996; 98(1): 136-41.
72. Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrier J, Steinhart AH, Wolman SL, Baron D, Allard JP. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(2): 259-64.
73. Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD, et al. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Dig Dis Sci* 2000; 45(9): 1820-7.
74. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004; 18(18): 2195-224.
75. Musonda CA, Chipman JK. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced NF $\kappa$ B, degradation of I $\kappa$ B DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1583-89.
76. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. 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* 2000; 164: 6509-19.
77. Ginn-Pease, ME, Whisler, RL. Redox signals and NF $\kappa$ B activation in T cells. *Free Rad Biol Med* 1998; 25: 346-61.
78. Schoonbroodt S, Piette J. Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem Pharmacol* 2000; 60(8): 1075-83.
79. Bowie A, O'Neill LAJ. Vitamin C inhibits NF $\kappa$ B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 2000; 165: 7180-88.
80. Bowie A, O'Neill LAJ. Oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B activation. A reassessment of the evidence of the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 13-23.
81. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; 9(22): 2723-35.
82. Peet GW, Li J. I $\kappa$ B kinases  $\gamma$  and  $\delta$  show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J Biol Chem* 1999; 274: 32655-61.
83. Park Y C, Rimbach G, Saliou C, Valacchi G, Packer L. Activity of monomeric, dimeric and trimeric flavonoids on NO production, TNF $\alpha$  secretion, and NF $\kappa$ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett* 2000; 465: 93-97.
84. Natarajan K, Manna S K, Chaturvedi M M, Aggarwal B B. Protein tyrosine kinase inhibitors block tumor necrosis factor-induced activation of NF $\kappa$ B, degradation of I- $\kappa$ B $\alpha$ , nuclear translocation of p65, and subsequent gene expression. *Arch Biochem Biophys* 1998; 352: 59-70.
85. Panes J, Gerritsen ME, Anderson DC, Miyasaka M, Granger DN. Apigenin inhibits tumor necrosis factor-induced intercellular adhesion molecule-1 upregulation in vivo. *Microcirculation* 1996; 3: 279-86.
86. Habtemariam S. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- $\alpha$  in L-929 tumor cells. *J Nat Prod* 1997; 60: 775-78.
87. Ishikawa Y, Sugiyama H, Stylianou E, Kitamura M. Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2290-96.
88. Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D. Role of interleukin-1 in inflammatory bowel disease-enhanced production during active disease. *Gut* 1990; 31: 686-89.



89. Rachmilewitz D, Simon PL, Schawartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in the rats. *Gastroenterology* 1989; 97: 326-37.
90. Van Dijk APM, Keuskamp ZJ, Wilson JHP, Zijlstra FJ. Sequential release of cytokines, lipid mediators and nitric oxide in experimental colitis. *Mediators of Inflammation* 1995; 4: 186-90.
91. Sánchez de Medina F, Perez R, Martínez-Augustin O, Gonzalez R, Lorente MD, Galvez J, et al. Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of enteric nervous system and cAMP. *Pflug Arch Eur J Physiol* 2002; 444: 378-88.
92. Brandzaeg P, Haraldsen L, Baekkevold ES, Jahnsen FL, Nilsen EM. *Intestinal Mucosa and its Diseases. Pathophysiology and Clinics.* Domschke W, Stoll R, Brasitus TA, Kagnoff MF (Eds.). Kluwer Academic Publishers BV, Dordrecht 1999: 383-400.
93. Asfaha S, Macnaughton WK, Appleyard CB, Chadee K, Wallace JL. Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol* 2001; 281: G635-G644.
94. Rao VS, Santos FA, Sobreira TT, Souza MF, Melo CL, Silveira ER. Investigations on the gastroprotective and anti-diarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med* 1997; 63: 146-49.
95. Di Carlo G, Autore G, Izzo AA, Maiolino P, Mascolo N, Viola P et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45: 1054-59.
96. Meli R, Autore G, Di Carlo G, Capasso F. Inhibitory action of quercetin on intestinal transit time. *Phytother Res* 1990; 4: 201-02.
97. Galvez J, Duarte J, Sanchez de Medina F, Jiménez J, Zarzuelo A. Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions. *Phytother Res* 1996; 10: 66-69.
98. Abdalla S, Zarga MA, Afifi F, Al-Khalil S, Mahasneh A, Sabri S. Effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea-pig isolated smooth muscle. *J Pharm Pharmacol* 1989; 41: 138-41.
99. Morales MA, Tortoriello J, Meckes M, Paz D, Lozoya X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Arch Med Res* 1994; 25: 17-21.
100. Beretz A, Anton R, Cazenave JP. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships.* Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A (Eds.). AR Liss, New York 1996: 281-96.
101. Kuppusamy UR, Das NP. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1307-15.
102. Nikaido T, Ohmoto T, Sankawa U, Hamanka T, Totsuka K. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by flavonoids. *Planta Med* 1982; 46: 162-66.
103. Ferriola PC, Cody V, Middleton E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1617-24.
104. Dharmasathaphorn K, Madara JL. Established intestinal cell lines as model systems for electrolyte transport studies. *Methods Enzymol* 1990; 192: 354-89.
105. Cermak R, Föllmer U, Wolfram S. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am J Physiol* 1998; 274: G1166-G1172.
106. Nguyen TD, Canada AT, Heintz GG, Gettys TW, Cohn JA. Stimulation of secretion by the T84 colonic epithelial cell line with dietary flavonols. *Biochem Pharmacol* 1991; 21: 1879-86.
107. Sanchez de Medina F, Galvez J, Gonzalez M, Zarzuelo A, Barrett K. Effects of quercetin on epithelial chloride secretion. *Life Sci* 1997; 61: 2049-55.
108. Diener M, Hug F. Modulation of Cl<sup>-</sup> secretion in rat distal colon by genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Pharmacol* 1996; 299: 161-70.
109. Sears CL, Firoozmand F, Mellander A, Cahmbers FG, Eromar IG, Bot AG, et al. Genistein and tyrphostin 47 stimulate CFTR-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in T84 cell monolayers. *Am J Physiol* 1995; 269: G874-G882.
110. Illek B, Fischer H, Machen TE. Alternate stimulation of apical CFTR by genistein in epithelia. *Am J Physiol* 1996; 270: C265-C275.
111. Wang F, Zeltwanger S, Yang IC, Nairn AC, Hwang TC. Actions of genistein on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. Evidence for two binding sites with opposite effects. *J Gen Physiol* 1998; 111: 477-90.
112. Randak C, Auerswald EA, Assfalg-Machleidt I, Reenstra WW, Machleidt W. Inhibition of ATPase, GTPase and adenylate kinase activities of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by genistein. *Biochem J* 1999; 340: 227-35.
113. Nguyen TD, Canada AT. Citrus flavonoids stimulate secretion by human colonic T84 cells. *J Nutr* 1993; 123: 259-68.