



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

**EFFECTOS DE LA GRANADA (*PUNICA
GRANATUM L.*) EN LAS ENFERMEDADES
INFLAMATORIAS AUTOINMUNES**



M^a Carmen Martínez Carmona



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

- Facultad de Farmacia
- Trabajo Fin de Grado
- Grado en Farmacia
- Efectos de la granada (*Punica granatum L.*) en las enfermedades inflamatorias autoinmunes

- Realizado por: M^a Carmen Martínez Carmona
- Tutorizado por: Dra. Marina Sánchez Hidalgo
Dra. M^a Ángeles Rosillo Ramírez
- Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacología
- Revisión bibliográfica
- Fecha: 18/06/2018

RESUMEN

Las enfermedades inflamatorias autoinmunes son cada vez más comunes en nuestra sociedad, afectando a un elevado número de personas y empeorando su calidad de vida. La ausencia de tratamientos que conduzcan a la cura de estas enfermedades, así como la agresividad de los tratamientos actuales que permiten controlar los síntomas, ha aumentado el interés por la búsqueda en la naturaleza de nuevos productos eficaces en su tratamiento, como es el caso de la granada (*Punica granatum*). En los últimos años se han llevado a cabo un elevado número de estudios que ponen de manifiesto el potencial terapéutico de la granada y/o sus compuestos bioactivos en la inflamación y sistema inmune. Es por ello, que el objetivo de este trabajo es recopilar las investigaciones científicas más notables del papel que desempeñan *Punica granatum* y sus compuestos en las enfermedades inflamatorias autoinmunes más prevalentes, así como profundizar en los mecanismos moleculares y su posible potencial terapéutico. Tanto la granada como sus compuestos bioactivos han demostrado poseer un potencial terapéutico en los estudios preclínicos de enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y esclerosis múltiple disminuyendo los niveles de múltiples parámetros inflamatorios, con la consiguiente atenuación de la inflamación, característica común en todas estas patologías. Entre los compuestos bioactivos de la granada, cabe destacar la acción del ácido elágico, el ácido púnicico, las urolitinas y las punicalaginas, polifenoles con una alta capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Por otro lado, los ensayos clínicos disponibles son muy limitados, sobretodo en la esclerosis múltiple (EM), pero resultan prometedores. La puesta en marcha de ensayos clínicos adicionales que refuerzan el potencial terapéutico de *Punica granatum* y/o sus compuestos bioactivos descrito en los estudios preclínicos resultan claves para la incorporación de éstos hoy día a la terapia convencional y/o prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), artritis reumatoide (AR) y EM.

Palabras clave: ácido elágico, autoinmune, enfermedades inflamatorias, granada, inflamación, *Punica granatum*.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 PUNICA GRANATUM | 1 |
| 1.1.1. Características botánicas | 1 |
| 1.1.2. Origen geográfico y producción | 1 |
| 1.1.3. Composición química de la granada | 1 |
| 1.1.4. Propiedades farmacológicas | 4 |
| 1.2 ENFERMEDADES INFLAMATORIAS AUTOINMUNES | 5 |
| 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 6 |
| 3. METODOLOGÍA | 7 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 8 |
| 4.1. ARTRITIS REUMATOIDE | 8 |
| 4.1.1 Estudios preclínicos | 9 |
| 4.1.2. Ensayos clínicos | 14 |
| 4.2 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL | 15 |
| 4.2.1 Estudios preclínicos | 16 |
| 4.2.2 Ensayos clínicos | 25 |
| 4.3. ESCLEROSIS MÚLTIPLE. | 26 |
| 4.3.1. Estudios preclínicos | 27 |
| 5. CONCLUSIONES | 29 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 34 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *PUNICA GRANATUM*

La granada (*Punica granatum L.*) es una fruta cuya importancia es conocida desde la antigüedad, no sólo por su valor alimenticio sino por sus propiedades beneficiosas para la salud. Si bien, en los últimos años, se ha visto un aumento en el estudio de esta fruta, lo que ha llevado al conocimiento de muchas propiedades y a su utilización para el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades (Yaniv et al., 2014).

1.1.1. Características botánicas

El granado, de la familia *Punicaceae*, es un arbusto caducifolio de 2-5 metros (m) de altura, ramas espinosas y corteza de color marrón claro, con hojas opuestas, oblongas-lanceoladas, enteras y brillantes, que miden 5 a 8 centímetros (cm) de longitud (del Villar y Melo, 2010). El fruto, la granada, es una baya, que tiene unos 12 cm de diámetro y forma hexagonal, piel rojiza y gruesa y alrededor de 600 semillas, cada una de ellas rodeada por una pulpa cargada de agua astringente, que es lo que conocemos como arilo y que varía de color de blanco a rojo oscuro o morado (Reza et al., 2012).

1.1.2. Origen geográfico y producción

El origen geográfico del granado es Oriente Próximo (Yaniv et al., 2014). Se caracteriza por su capacidad de adaptación al terreno, pudiendo crecer en zonas áridas y semiáridas (Calín et al., 2015), por lo que su cultivo está ampliamente distribuido por todo el mundo.

1.1.3. Composición química de la granada

Recientes ensayos preclínicos han puesto de manifiesto las extraordinarias actividades antioxidantes, anticancerosas y antiinflamatorias de este alimento funcional gracias a sus constituyentes bioactivos fundamentalmente: antocianinas (delfinidina, cianidina y pelargonidina); taninos no hidrolizables como las punicalaginas, ácido elágico y ácido gálico y otros taninos hidrolizables en adición a compuestos flavónicos (quercetina, kanferol, luteonina y miricetina), ácidos grasos

poliinsaturados (ácido púrico) sus derivados y metabolitos entre otros. Esta combinación de compuestos confiere a la granada unas propiedades antioxidantes muy superiores a la de otros antioxidantes (incluido el vino tinto y el té verde) que implican un potencial papel beneficioso en la prevención de patologías relacionadas con el estrés oxidativo, inmunomodulación, inflamación y cáncer (Jurenka, 2008).

En cuanto a la composición química de la granada:

La corteza representa el 60% de la fruta, y es rica en diversos compuestos como los que a continuación se detallan:

- fenoles
- flavonoides (incluyendo punicalaginas)
- proantocianidinas
- polisacáridos complejos
- minerales: calcio, nitrógeno, potasio, magnesio, fósforo y sodio.

A pesar del elevado número de compuestos que presenta la corteza, la mayoría de las propiedades biológicas asociadas a esta parte de la fruta se deben a la presencia de flavonoides y taninos. Se trata de la parte de la fruta con mayor actividad antioxidante, debido a su alto contenido en polifenoles. Los elagitaninos presentes en la corteza incluyen a la punicalgina y la punicalina, conteniendo ambos ácido gálico, que es la unidad básica para la formación de varios taninos. Ambos pueden ser hidrolizados a ácido elágico, un fenol natural con una alta actividad antioxidante. A su vez, la punicalgina está presente en las semillas, corteza y zumo de la granada, y es un compuesto exclusivo de la granada (Viladomu et al., 2013; Danesi et al; 2017).

El zumo de la granada es una fuente de:

- polifenoles
- taninos
- antocianidinas, incluyendo a las vitaminas C y E y coenzima Q10

Sus principales compuestos antioxidantes son las antocianidinas y los derivados del ácido elágico, que son los principales constituyentes del zumo y que le aportan a la fruta su color característico. Además, estas antocianidinas se han asociado a la

prevención de enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes. El zumo de la granada es la principal fuente de ingestión de esta fruta, y sus niveles de antioxidantes son mucho más elevados que los presentes en otros zumos naturales (Viladomiu et al., 2013; Danesi et al., 2017).

Las semillas de la granada, aunque sólo representan un 3% del peso de la fruta, contienen muchos otros compuestos distintos a los polifenoles que pueden contribuir a los beneficios para la salud que aporta la granada. Las semillas son una gran fuente de lípidos, presentando unos niveles altos de ácido linoleico y linolénico, así como ácido oleico, púnico y palmítico. (Viladomiu et al., 2013).

En la tabla 1 se resume la composición química de la granada.

Tabla 1. Composición química de *Punica granatum* (Tomado y adaptado de Viladomiu et al., 2013)

| Familia | Compuesto | Parte de la granada |
|------------------|---------------------------|----------------------------|
| Antocianidinas | Cianidina-3,5-diglucósido | Corteza, semillas y zumo |
| | Delfinidina-3-glucósido | Corteza, semillas y zumo |
| | Cianidina-3-glucósido | Corteza, semillas y zumo |
| | Pelargonidina-3-glucósido | Corteza, semillas y zumo |
| | | |
| Taninos | Punicalina | Corteza, semillas y zumo |
| | Punicalgina | Corteza, semillas y zumo |
| | Ácido elágico glucósido | Semillas y zumo |
| | Ácido elágico | Semillas y zumo |
| Fenoles | Ácido gálico | Zumo |
| | Ácido cafeico | Corteza y zumo |
| | Catequina | Zumo |
| Antioxidantes | Ácido ascórbico | Zumo |
| | Vitamina E | Zumo |
| Ácidos orgánicos | Ácido cítrico | Zumo |

| | | |
|----------|------------------|--------------------------|
| | Ácido málico | Zumo |
| | Ácido tartárico | Zumo |
| | Ácido isocítrico | Zumo |
| Azúcares | Glucosa | Corteza, semillas y zumo |
| | Fructosa | Corteza, semillas y zumo |
| | Sacarosa | Corteza, semillas y zumo |
| | Sorbitol | Corteza, semillas y zumo |

1.1.4. Propiedades farmacológicas

Son muchos los beneficios terapéuticos de la granada, que se atribuyen a distintos mecanismos, de los que destacamos los siguientes:

- **Acción antiinflamatoria.** Esta acción es especialmente interesante en la zona intestinal, debida principalmente a los elagitaninos y antocianidinas (Colombo et al., 2013)
- **Acción preventiva de enfermedad cardiovascular, obesidad y diabetes,** asociada a las antocianidinas (Viladomiu et al., 2013)
- **Acción anticarcinogénica** (Yaniv et al., 2014). La granada tiene acción sobre distintos tipos de cáncer, actuando, por ejemplo, a los siguientes niveles:
 - Inhibiendo la metástasis del cáncer de ovario gracias a la acción del ácido elágico y la luteolina (Liu et al., 2017)
 - Inhibiendo la metástasis del cáncer de próstata gracias a un zumo específico de granada (Wang et al., 2012)
 - Acción antiangiogénica y antiproliferativa del zumo de granada sobre el mieloma múltiple (Tibullo et al., 2016)
- **Acción antioxidante** (Viladomiu et al., 2013)
- **Acción antimicrobiana** (Yaniv et al., 2014) y **antivírica**, con acción de la punicalagina coadministrada con iones de Zinc sobre el virus del Herpes Simple (Houston et al., 2017)

- **Acción preventiva** del extracto sobre la pérdida de densidad ósea (osteoporosis) (Spilmont et al., 2015)

- **Capacidad retentiva** con el consumo del zumo de granada en pacientes de edad media y ancianos con problemas de memoria (Bookheimer et al., 2013). Además, hay estudios en ratones sobre la acción de los polifenoles de la granada en la enfermedad de Alzheimer (Rojanathammanee et al., 2013).

1.2. ENFERMEDADES INFLAMATORIAS AUTOINMUNES

Las enfermedades inflamatorias autoinmunes se caracterizan por una inflamación patológica que a menudo deriva de la activación anormal de las células inmunes innatas por estímulos endógenos o exógenos (Park et al., 2012). Estas patologías afectan aproximadamente al 5-8% de la población causando morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas significativas (Bayry and Radstake, 2013).

Las enfermedades inflamatorias autoinmunes más comunes son: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal (Toussirot et al., 2018).

Pese a los múltiples avances realizados en los últimos años, la etiología de estas enfermedades sigue siendo desconocida. En el origen de estas enfermedades participan múltiples factores que confluyen entre sí para dar origen a cada una de las patologías autoinmunes conocidas. Entre estos elementos se incluyen la pérdida de los mecanismos de tolerancia, factores de susceptibilidad genética (polimorfismos HLA, genes no HLA y mecanismos epigenéticos), factores ambientales (agentes vivos de enfermedad, agentes inorgánicos, hormonas y otros) y factores inmunológicos (linfocitos reguladores, citoquinas y moléculas coestimuladoras, entre otros) (Pollard et al., 2005).

El tratamiento se centra en el control rápido de la inflamación y la prevención del daño tisular, con el objetivo de la remisión a largo plazo de la enfermedad, mejorando así la calidad de vida y previniendo el daño. Los principales fármacos empleados para paliar los síntomas de estas patologías son los glucocorticoides, así como la terapia biológica (Pereira et al., 2015). Aunque estos tratamientos han

mejorado los signos y síntomas de estas enfermedades, solo son efectivos en una fracción de pacientes y poseen otras limitaciones como el requerimiento de su administración por vía parenteral, sus efectos secundarios así como su alto coste económico.

Por ello, en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, hay que destacar la terapia nutricional, que en la actualidad más allá de su soporte dietético, puede ejercer efectos profilácticos carentes de las reacciones adversas que acompañan a la farmacoterapia clásica en estas patologías de base autoinmune (Stuchlik y Zak, 2002).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las terapias alternativas han experimentado un gran auge en los últimos años. Vivimos en una sociedad en la que aumenta cada vez más el número de personas afectadas por enfermedades inflamatorias autoinmunes. Aunque la investigación sobre estas enfermedades ha crecido y se han comercializado fármacos eficaces para el tratamiento de éstas, no existen curas definitivas. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, entre las que destaca la terapia nutricional. En los últimos años, se ha puesto de manifiesto el potencial terapéutico de los alimentos funcionales o aquellos alimentos que, independientemente de sus propiedades nutritivas, poseen un efecto beneficioso para el organismo; es decir, su ingesta diaria, dentro de una dieta equilibrada, contribuye a mantener o mejorar el estado de salud y bienestar; uno de estos alimentos funcionales es la granada.

Dada la relevancia del papel beneficioso de la granada y sus compuestos bioactivos en diversas patologías autoinmunes, estos han sido protagonistas de numerosos estudios en la última década.

Por ello, el **objetivo** del presente trabajo ha sido recopilar las investigaciones científicas más notables del papel que desempeñan *Punica granatum* y sus compuestos bioactivos en las enfermedades inflamatorias autoinmunes más prevalentes, así como profundizar en los mecanismos moleculares y su posible potencial terapéutico.

3. METODOLOGÍA

Para la localización de los documentos bibliográficos se utilizaron varias bases de datos científicas, entre ellas: PubMed, MedlinePlus y Clinical Trials. La combinación de palabras clave y filtros ha resultado vital para la búsqueda bibliográfica. Esta, fue llevada a cabo en marzo-junio de 2018, gracias a la información obtenida de las siguientes fuentes que a continuación se detallan:

Los artículos científicos se han obtenido a partir de bases de datos como *PubMed*, *Web of Science* y *UpToDate*. Para llevar a cabo la búsqueda en estas bases, ha sido necesaria la utilización de palabras clave y de conectores. Además, el acceso a información relativa a ensayos clínicos, se ha visto facilitada por el acceso a la web *Clinical Trials*.

Las palabras clave más utilizadas han sido "*Punica granatum*", "pomegranate" y "autoimmune inflammatory diseases" que han sido la base para la realización de la revisión bibliográfica.

Debido a la gran cantidad de información encontrada, ha sido necesaria la aplicación de una serie de filtros que nos han permitido hacer una selección de la información recopilada y que a continuación se detallan:

- Artículos de libre acceso a texto completo.
- Textos escritos en inglés y español.

Para comenzar, los aspectos generales de la revisión se han obtenido mediante el uso de combinaciones como "*Punica granatum* and properties", "*Punica granatum* and components", "ellagic acid" "punicalgine" "uroлитins" "*Punica granatum* and therapy". Debido al elevado número de artículos encontrados, fue necesaria la aplicación de los citados filtros. Así, la combinación inicial "*Punica granatum* and components" generó 88 resultados, que tras la aplicación del filtro "free full text", se redujo a 28.

Con respecto a las enfermedades inflamatorias autoinmunes desarrolladas en esta revisión, se han utilizado los descriptores "*Punica granatum* and inflammation", generando un total de 111 registros. La problemática planteada, giraba en torno a la

enorme diversidad y número, de manera que fue necesario el uso de los filtros anteriormente citados, obteniéndose 36 citas. De igual manera, se procedió en el estudio individual de cada una de las patologías tratadas en esta revisión, empleándose descriptores como " *Punica granatum* and immunity", "*Punica granatum* and colitis", "*Punica granatum* and lupus", "*Punica granatum* and arthritis", "*Punica granatum* and ibd" o "*Punica granatum* and multiple sclerosis". Para enfocar la búsqueda hacia componentes bioactivos concretos de la granada y su actividad en estas enfermedades, usamos las combinaciones citadas anteriormente, pero sustituyendo *Punica granatum* por: "ellagic acid", "punicalgine" "urolitins" o "delphinidine", buscando individualmente el efecto y mecanismo de acción de cada componente de la granada en el tratamiento y/o prevención de cada enfermedad estudiada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la búsqueda bibliográfica llevada a cabo en el presente trabajo sobre los efectos de *Punica granatum* en las enfermedades inflamatorias autoinmunes, nos centraremos en tres de estas patologías. Concretamente estudiaremos sus efectos en la artritis reumatoide (AR), la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y esclerosis múltiple (EM), al no disponer hasta la fecha de estudios preclínicos ni clínicos que validen los efectos de *Punica granatum* y/o sus componentes bioactivos en la psoriasis ni en lupus eritematoso sistémico

A continuación, se trata en detalle una a una estas patologías, con el correspondiente efecto de *Punica granatum* y/o compuestos bioactivos sobre éstas. Cada uno de los estudios realizados con las distintas enfermedades abarca el análisis de numerosos compuestos bioactivos de la granada y mecanismos de acción, de forma que el presente trabajo es una pequeña representación de los distintos parámetros estudiados en cada ensayo (Ver Anexo I).

4.1. ARTRITIS REUMATOIDE

La AR es una enfermedad crónica inflamatoria, autoinmune y sistémica que se caracteriza por una sinovitis erosiva simétrica, en la cual el tejido de granulación de origen sinovial (*pannus*), invade y erosiona el cartílago y el hueso de las articulaciones

diartrodiales de forma simétrica (Salgado y Maneiro, 2014). Dicha patología tiene, en ocasiones, un componente extraarticular, lesionando diversos órganos y sistemas. El deterioro progresivo, articular o extraarticular, acaba provocando que estos pacientes presenten deformidad, dolor, incapacidad funcional y disminución de la expectativa de vida.

Aunque la patogenia de la AR sigue sin conocerse en su totalidad, actualmente se ha descrito la existencia de un desbalance de las células T cooperadoras Th1/Th2 y Th17/células T reguladoras (McInnes y Schett, 2011). En consecuencia, se produce un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias en las articulaciones artríticas, jugando un papel destacado en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Brennan y McInnes, 2008).

El abordaje terapéutico de la AR es multidisciplinar, y está dirigido principalmente a la supresión inespecífica del proceso inflamatorio con el objetivo de mitigar los síntomas y signos de la enfermedad englobando tratamientos farmacológico, fisioterápico y ocupacional, fundamentalmente. Dado los severos efectos secundarios de la farmacoterapia antirreumática actual, se ha generado en los últimos años, un auge en el uso de otras estrategias, entre las que destaca la terapia nutricional.

La granada es una fuente importante de elagitaninos y ácido eláxico, compuestos a los que se les han atribuido importantes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Es por esto por lo que en los últimos años ha aumentado el interés en este alimento funcional debido a sus posibles aplicaciones terapéuticas (Danesi et al., 2017).

A lo largo de los últimos años, se han llevado a cabo estudios preclínicos (*in vivo* e *in vitro*) y clínicos sobre los efectos de *Punica granatum* en la AR.

4.1.1 Estudios preclínicos

4.1.1.1. *In vitro*

Las metaloproteasas (MMP) son endopeptidasas dependientes de zinc, capaces de degradar todos los componentes de la matriz de colágeno extracelular que requieren calcio para su actividad (Mannello et al., 2006). En condiciones fisiológicas, las MMP están inhibidas por sus inhibidores endógenos denominados inhibidor tisular

de metaloproteasas (TIMP) que bloquean el acceso del sustrato a sus sitios catalíticos a través de interacciones no covalentes 1: 1 (Hijova, 2005), controlando así el recambio y la remodelación de la matriz del cartílago. En la AR existe un desequilibrio entre las MMP y los niveles de TIMP conduciendo a una sobreactivación de las enzimas.

Entre las MMP, se cree que las MMP-1 y MMP-13, están asociadas con la degradación del colágeno tipo II.

Jean-Gilles y colaboradores demostraron los efectos inhibidores de los polifenoles derivados de la granada, punicalagina y ácido elágico, sobre la actividad de MMP-13. Se cree que MMP-13 es un mediador clave en la degradación del cartílago y representa una diana válida para la terapia de artritis. Estos autores mostraron que punicalagina fue capaz de inhibir la degradación de colágeno II mediada por MMP-13 *in vitro*. El ácido elágico también fue capaz de inhibir dicha degradación, pero de forma más modesta que punicalagina. Por otro lado, observaron que punicalagina era capaz de inhibir, de forma dosis-dependiente, la degradación de proteoglicanos y de colágeno II, inducida por IL-1 β en explantes de cartílago nasal. Además punicalagina inhibió la expresión y la actividad de MMP-2, MMP-9. Sin embargo, en base a este estudio, no es posible determinar si la inhibición de la degradación del cartílago por punicalagina se debió a la inhibición transcripcional de MMP, la inhibición de la actividad de MMP-13, o una combinación de mecanismos (Jean-Gilles et al., 2013).

En cuanto a los efectos de compuestos aislados del zumo de granada, cabe resaltar los estudios llevados a cabo con la delfinidina, una antocianidina presente en dicho zumo en la línea celular MH7A estimulada con TNF- α (Danesi et al., 2017) y cuyos resultados más relevantes aparecen en detalle en el tabla 2.

Diversos estudios demuestran que la delfinidina es un inhibidor de la histona acetiltransferasa (HAT), y estos inhibidores se asociaron a la supresión de la señal inflamatoria. La delfinidina inhibió la enzima HAT de forma dosis-dependiente, llegando a inhibir un 70% de su actividad en células MH7A. (Seong et al., 2011). En este caso la acetilación se indujo con TNF- α , y se comprobó que dichas dosis revirtieron el efecto de TNF- α (Seong et al., 2011).

Además, se comprobó que la delfinidina inhibía la función NF-kB y la producción de citocinas en las células MH7A. La acetilación de NF-kB es fundamental

para que pueda ejercer su función. De esta forma, se comprobó que la delfinidina rompía la unión entre NF-kB y el ADN que se había formado por el tratamiento con TNF α -, por lo que sugirió que el grado de acetilación es determinante en la unión de NF-kB al ADN. Por otro lado, también se demostró la capacidad de la delfinidina para inhibir la expresión de COX-2, por la inhibición de quinasas como MAPKK4 o PI-3 (Seong et al., 2011). Estos resultados son coherentes con los publicados recientemente por Danesi et al., 2017 (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos anti-inflamatorios de la delfinidina (Danesi et al., 2017 y Seong et al., 2011).

| Línea celular | Compuesto usado en el test, dosis y duración | Tratamiento pro-inflamatorio | Efecto biológico |
|---------------|---|------------------------------|--|
| MH7A | Delfinidina (10 y 30 micro molar) durante 24 horas o 2 horas (para ELISA) | TNF- α (20 ng/mL) | Disminución de: - Expresión de IL-1-beta e IL-6 - Expresión de COX2- NF-kB |
| MH7A | Delfinidina (10-100 micromolar) | TNF- α | Inhibición HAT |

4.1.1.2. *In vivo*

Las primeras investigaciones se deben a los estudios llevados a cabo por Shukla y colaboradores donde evaluaron los efectos de una preparación estandarizada de un extracto de granada (POMx) en un modelo experimental de AR inducida por colágeno II (CIA) en ratones DBA 1/J.

Estos autores pusieron de manifiesto que el tratamiento con POMx a las dosis de 13.6 y 34 mg/Kg minimizaron de forma significativa el edema articular y la destrucción del cartílago, en comparación con el grupo control, previniendo el desarrollo de la AR (Figura 1). Asimismo, la disminución del daño articular se acompañó de una bajada

significativa de los niveles de la citocina proinflamatoria IL-6 en el tejido articular (Shukla et al., 2008).

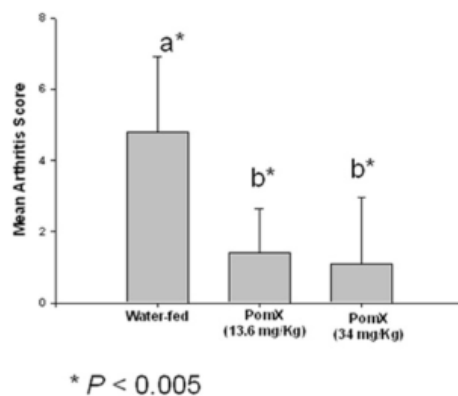


Figura 1. Incidencia de la artritis en el grupo control y los dos grupos tratados con diferentes dosis del extracto de granada (Tomada de Shukla et al., 2008).

Los macrófagos están presentes en las articulaciones de los pacientes con AR y juegan un papel fundamental en la patogénesis de dicha enfermedad (Szekanecz y Koch, 2007). Estas células activadas producen TNF- α , óxido nítrico (NO) y otros mediadores inflamatorios que exacerban la enfermedad (Figura 2). En este sentido, Shukla y colaboradores, demostraron que POMx era capaz de inhibir la activación producida por lipopolisacárido (LPS) de las vías de señalización: factor nuclear kappa B (NF- κ B) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), así como, inhibir la activación de ciertos factores de transcripción y la producción de NO en macrófagos murinos (Shukla et al., 2008). De este modo, estos autores afirman que la inhibición de la activación de los macrófagos por POMx podría contribuir a los efectos antiartríticos de este extracto, demostrados en el modelo de CIA.

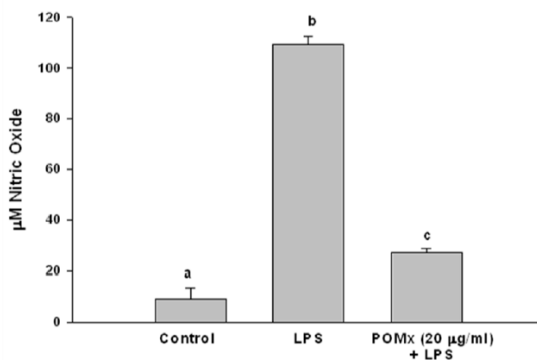


Figura 2. POMx inhibe la producción de NO inducida por LPS en macrófagos de ratón (Tomada de Shukla et al., 2008).

De forma similar, un reciente estudio de 2018 ha demostrado que la fracción butanólica de un extracto de la corteza de *Punica granatum L.* administrado a las dosis de 50 y 75 mg/Kg fue capaz de reducir los signos y síntomas de la enfermedad, disminuyendo la inflamación articular en un modelo de AR experimental inducido por adyuvante completo de Freund en ratas (Gautam et al., 2018). Igualmente, ha sido puesto de manifiesto el efecto del ácido elágico en la prevención y/o tratamiento de la AR experimental inducida por adyuvante en ratones por Allam y colaboradores en 2016. Para ello, trataron a los animales con ácido elágico administrado por vía intraperitoneal a la dosis de 700 mg/Kg, una semana antes de la inducción de la enfermedad y lo continuaron durante tres semanas después. El tratamiento con el ácido elágico inhibió la hinchazón edematosa de la pata y atenuó la patología asociada a la AR experimental. Esto estuvo acompañado por una disminución significativa de los niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias: TNF- α , IL-1 β e IL-17, sin embargo produjo un aumento en los niveles séricos de las citocinas anti-inflamatorias: IL-10 e interferón gamma (IFN- γ) (Allam et al., 2016).

La IL-17 es una citocina que desempeña un papel crucial en el desarrollo de la AR mediante la activación de respuestas inmunes celulares y humorales específicas de autoantígenos (Lubberts et al., 2004). Se ha demostrado que la IL-17 impulsa la diferenciación, maduración, activación y liberación de citoquinas de los neutrófilos; activa a los monocitos y fibroblastos sinoviales, facilitando la liberación de quimiocinas, prostaglandinas y favorece la síntesis de MMP, implicadas en la destrucción del cartílago (Weaver et al., 2007). Por tanto, su inhibición resulta de gran interés para inhibir la inflamación y el daño articular (Allam et al., 2016). En el estudio llevado a cabo por Lubberts et al., profundizaron en el efecto del ácido elágico sobre la inhibición de la producción de IL-17.

Jean-Gilles y colaboradores, estudiaron el efecto anti-inflamatorio de la punicalagina sobre un modelo de AR inducida por adyuvante en ratones. Estos autores, probaron dos dosis de punicalagina 10 y 50 mg/Kg administrada por vía intraperitoneal. Descubrieron, que la dosis de 10 mg/kg, no producía una mejora en los signos y síntomas clínicos de la enfermedad, por el contrario, la dosis de 50 mg/Kg redujo de forma significativa el edema de las patas de los animales, sin embargo, se

encontraron con que la dosis más alta, provocaba la muerte de 1 de cada 3 animales, con lo que concluyeron que tendrían que repetir el ensayo, con dosis mayores que 10 mg/Kg, pero menores a 50 mg/Kg (Jean-Gilles et al., 2013).

4.1.2. Ensayos clínicos

A día de hoy, existen 2 ensayos clínicos realizados con extracto de granada. En 2011 se realizó un estudio piloto, cuyo objetivo era determinar los posibles efectos beneficiosos de un extracto de granada sobre los parámetros clínicos en la AR activa, basados en el estado oxidativo del suero (Balbir-Gurman et al., 2011). Este estudio se llevó a cabo en 8 pacientes (mujeres post-menopáusicas) que consumieron 10 mL de extracto de granada al día, durante 12 semanas. 6 pacientes completaron el estudio. El consumo del extracto de granada redujo el índice de actividad de la enfermedad (DAS28) en un 17%. Esta reducción del DAS28 se podría atribuir a una marcada disminución en el número de articulaciones sensibles y el ratio de sedimentación de eritrocitos, sin embargo la escala analógica visual del conjunto de los pacientes o el número de articulaciones inflamadas, no se vieron afectados.

La mejora de los parámetros clínicos de la AR después del tratamiento con el extracto de granada, estuvo acompañado de una mejora en los índices de estrés oxidativo sérico, medido como niveles de peroxidación lipídica, concentración sérica de grupos sulfidrilos y la actividad de la paraoxonasa asociada a lipoproteínas de alta densidad 1 arilesterasa.

Una limitación de este estudio fue el bajo número de pacientes (Balbir-Gurman et al., 2011).

Por otro lado, en 2017 se llevó a cabo otro un ensayo clínico doble ciego randomizado, donde el grupo de pacientes con AR fueron asignados a dos grupos de forma aleatoria. Los pacientes recibieron dos cápsulas con 250 mg extracto de granada o celulosa como placebo, diariamente, durante 8 semanas.

Tras el tratamiento, demostraron que el suplemento con extracto de granada era capaz de reducir la actividad de la enfermedad, incluyendo el número de articulaciones sensibles e inflamadas, la intensidad del dolor y el ratio de sedimentación de eritrocitos. Además, la puntuación en el cuestionario de la evolución de la salud, la

rigidez matutina y los niveles de peróxido de glutatión fueron mejores en el grupo que recibió el tratamiento en comparación con el grupo placebo. Sin embargo, no se encontraron cambios en los niveles séricos de MMP-3, proteína C reactiva y malondialdeído (Ghavipou et al., 2017).

4.2 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Bajo la denominación común EII se incluyen a las enfermedades inflamatorias del intestino, grueso principalmente, de etiología desconocida y de evolución crónica, caracterizada por períodos de remisiones y de exacerbaciones. Se distinguen fundamentalmente dos tipos de afectación inflamatoria: la Colitis Ulcerosa (CU) y la Enfermedad de Crohn (EC), que comparten aspectos epidemiológicos y presentan síntomas clínicos, signos radiológicos y hallazgos anatomopatológicos comunes. Sin embargo ambas enfermedades se diferencian principalmente en su localización, forma de afectar el espesor de la pared intestinal, y en las diferentes complicaciones locales y respuestas a la cirugía. Las manifestaciones extraintestinales que pueden presentar estas patologías con frecuencia siguen un curso recidivante (Szigethy et al., 2010). En España, la tasa de incidencia de la EII ha aumentado en los últimos años (López-Serrano et al., 2009).

Si bien, las causas fisiopatológicas de la EII permanecen sin conocerse y, en consecuencia, seguimos sin disponer de un tratamiento curativo, los últimos años han aportado importantes avances en el conocimiento de sus mecanismos patogénicos. En este sentido, se considera que estas enfermedades son la consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos, medioambientales, microbiológicos e inmunes.

Las estrategias más importantes del tratamiento farmacológico de la EII son la antiinflamatoria y la inmunomoduladora. El mayor conocimiento de los mecanismos patogénicos de la EII ha permitido el desarrollo de fármacos de diseño eficaces, que son fruto de la industria biotecnológica, fármacos biológicos (Rawla et al; 2018).

Estudios epidemiológicos y experimentales han mostrado que existe una estrecha relación entre los hábitos alimentarios y el riesgo a padecer ciertas enfermedades. En general, se acepta que el consumo de alimentos derivados de productos vegetales como el vino, frutas, hortalizas, frutos secos, cereales, legumbres,

especies, etc (abundantes en la dieta mediterránea) se asocia con efectos beneficiosos sobre la salud, particularmente sobre enfermedades como la EII (Espín et al., 2007).

De este modo, alimentos ricos en compuestos fenólicos, como la granada, parecen ser beneficiosos para el tratamiento de la EII, ya que poseen propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras. Estos compuestos fenólicos suelen tener una eficiencia de absorción baja, por lo que éstos o sus metabolitos llegan al intestino en concentraciones altas, resultando de gran interés para el tratamiento de estas enfermedades.

La granada es rica en elagitaninos, que son los precursores del ácido elágico. Así, los elagitaninos se hidrolizan a lo largo del tracto digestivo y liberan el ácido elágico. Tanto los elagitaninos como el ácido elágico son a su vez metabolizados a urolitinas, que son derivados de las dibenzopiranonas, gracias a la acción de una serie de bacterias. Las principales urolitinas que se producen son la Uro-A y la Uro-B, a las que se han asociado potentes propiedades anti-inflamatorias (Espín et al., 2007).

Hasta la fecha existen estudios preclínicos y clínicos que ponen de manifiesto el poder beneficioso que ejerce la granada o sus compuestos aislados en el tratamiento de la EII.

4.2.1 Estudios preclínicos

4.2.1.1. *In vitro*

En un estudio llevado a cabo por Giménez Bastida y colaboradores (Giménez-Bastida et al., 2012), pusieron de manifiesto el efecto anti-inflamatorio del ácido elágico y las urolitinas Uro-A y Uro-B en un cultivo celular de fibroblastos humanos de colon (CCD18-Co) estimulados con IL-1 β o TNF- α ; este efecto antiinflamatorio se vio acompañado de una inhibición de la migración de los fibroblastos y una disminución en la adhesión de monocitos a los fibroblastos. Los fibroblastos colónicos fueron estimulados con IL-1 β , dando lugar a un aumento marcado en la producción de PGE₂. Por el contrario, el tratamiento de dichas células con la mezcla de metabolitos (Uro-A, Uro-B y ácido elágico, 40, 5 y 1 μ M, respectivamente), consiguió disminuir significativamente los valores de PGE₂. Por otro lado, el tratamiento con Uro-A o Uro-B, también consiguió disminuir los niveles del ecosanoide. Sorprendentemente, tras

tratar las células con ácido elálgico no se observó ningún cambio significativo sobre los niveles de PGE₂ (Figura 3).

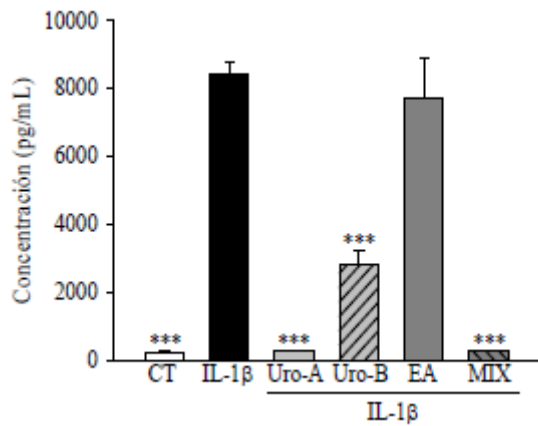


Figura 3. Efecto de Uro-A, Uro-B y ácido elálgico sobre los niveles de PGE₂ (Tomada de Giménez-Bastida, 2012)

Además, estos autores demostraron la capacidad de las urolitinas y del ácido elálgico para inhibir la migración celular de los fibroblastos inducida por IL-1β o TNF-α (Figura 4).

El inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) es una molécula que se asocia a reacciones inflamatorias de la mucosa del intestino y juega un papel regulador en la migración de fibroblastos (Giménez-Bastida et al., 2009). En concordancia con esto, demostraron que la migración de los fibroblastos inducida por IL-1β y TNF-α, estuvo acompañada por un aumento de los niveles de PAI-1, sin embargo el tratamiento con la mezcla de los metabolitos o la Uro-A, redujo de forma significativa los niveles de esta molécula.

Finalmente, expusieron que el ácido elálgico, Uro-A y la mezcla de metabolitos, inhibía la adhesión de macrófagos THP-1 con fibroblastos de colon (Figura 5); esto estuvo acompañado por una disminución de los niveles de las quimiocinas o moléculas de adhesión: IL-8, CCL2, ICAM-1 y VCAM.

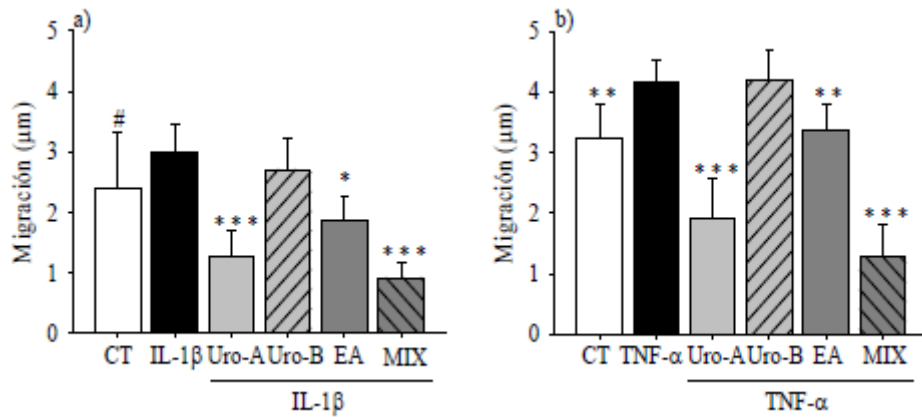


Figura 4. Efecto en la migración de los fibroblastos de colon tras una inducción de la migración de éstos, en un caso con IL-1beta y en otro con TNF-alfa (Tomada de Giménez-Bastida, 2012).

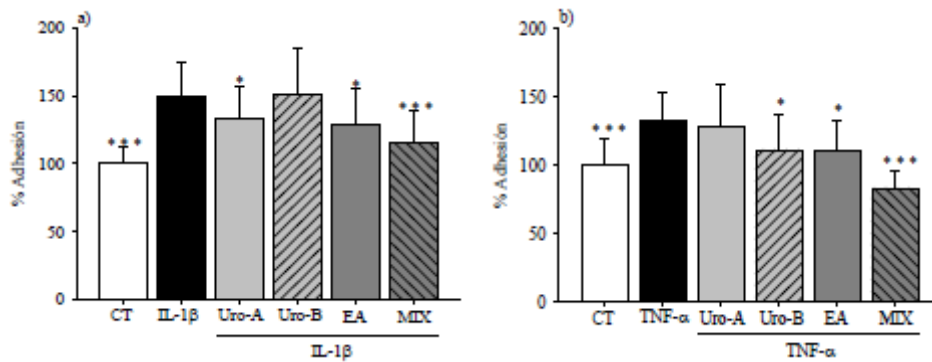


Figura 5. Efecto de las urolitinas y/o el ácido elágico sobre la adhesión de monocitos a fibroblastos de colon previamente estimulados con IL-1beta o TNF-alfa (Tomada de Giménez-Bastida, 2012).

Hollebeek y colaboradores (Hollebeek et al., 2012), pusieron de manifiesto el potencial antiinflamatorio de un extracto de la cáscara de la granada así como de la punicalagina aislada en un modelo *in vitro* de epitelio intestinal humano, usando la línea celular Caco-2 en cámaras bilaterales. Los tratamientos con el extracto de cascara de granada (0.1 mg/mL (conteniendo 8μM de punicalagina) o punicalagina (50μM), se realizó por el lado apical de la cámara, representando la luz intestinal. El estímulo, una mezcla de citocinas pro-inflamatorias (IL-1β, TNF-α e INF-γ) fue añadido por el lado basolateral de la cámara, sin embargo la adicción de LPS se realizó por el lado apical.

Tras el tratamiento con el extracto de granada o la punicalagina, sobre las células inflamadas, encontraron una disminución en la transcripción de los genes que codifican IL-6 y MCP-1, mientras que la transcripción de IL-8 no se vio afectada. Ambos tratamientos también disminuyeron de forma dosis-dependiente los niveles de las citocinas IL-6, IL-8 y MCP-1, pero sólo en el compartimento apical.

4.2.1.2. *In vivo*

De igual manera, se disponen de estudios *in vivo* (Tabla 4) que ponen de manifiesto las propiedades anti-inflamatorias de los elagitaninos y las urolitinas de la granada en modelos de EII.

Los estudios preclínicos en modelos animales de inflamación intestinal han generado hallazgos novedosos en varias áreas de investigación (Bamias, 2017).

Larrosa y colaboradores demostraron *in vivo* los efectos anti-inflamatorios del extracto de granada (250 mg/kg/día) y de su metabolito Uro-A (15 mg/kg/día) en ratas. Los resultados de este estudio demostraron que tanto el extracto como la Uro-A conseguían inhibir la producción de NO y disminuir los niveles de PGE2, al igual que los estudios *in vitro* anteriormente tratados en el presente trabajo. Además, este estudio fue el primero que demostró que un tratamiento previo a la inducción de la colitis con el extracto y la Uro-A era capaz de modular la microbiota, aumentando los niveles de lactobacilos y bifidobacterias (Larrosa et al., 2010).

Tabla 4. Propiedades anti-inflamatorias de los elagitaninos y las urolitinas de la granada, demostradas por estudios *in vivo*

| Compuesto/Alimento | Modelo animal | Efecto |
|-----------------------|--|--|
| Ácido elágico | Ratas albinas Wistar con cáncer de colon | Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • iNOS • COX-2 • IL-6 • TNF-α |
| Uro-A y Uro-B | Ratas Sprague-Dawley sanas | Aumento de: <ul style="list-style-type: none"> • CYP1A1 en mucosa colónica |
| Extracto de granada y | Colitis inducida con DSS en | Disminución de: |

| | | |
|-------|--|--|
| Uro-A | ratas Fisher F344 | <ul style="list-style-type: none"> • COX-2 • PGE2 • iNOS |
| Uro-A | Ratas con edemas producidos por carragenanos | Disminución del: <ul style="list-style-type: none"> • volumen de los edemas |

El estudio llevado a cabo por Ogawa y colaboradores, demostró el efecto protector del ácido elálgico en un modelo de colitis experimental inducida con dextrano sulfato de sodio (DSS) en ratas. Asimismo, estos autores consiguieron una optimización de esta actividad antiinflamatoria mediante la administración de ácido elálgico formulado en microesferas (10 mg/kg de ácido elálgico) al día. Estas microesferas tenían la capacidad de disolverse cerca de la válvula ileo-cecal y así distribuirse al íleon terminal y al colon selectivamente. Esta acción antiinflamatoria selectiva local del ácido elálgico permitió reducir los daños provocados por el DSS de forma dosis-dependiente, disminuyendo la actividad MPO así como la peroxidación lipídica en la mucosa colónica (Ogawa et al., 2002).

De forma similar, en los estudios llevados a cabo por Kim y colaboradores, el tratamiento con una bebida de granada (que contenía ácido elálgico y elagitaninos) en aquellas ratas colíticas sometidas a DSS, demostró ejercer un marcado efecto anti-inflamatorio al reducir significativamente los niveles de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β que se vio acompañado de la reducción de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS (Kim et al., 2017). Del mismo modo, Singh y colaboradores demostraron la capacidad del extracto de granada y su fracción rica en ácido elálgico (100 y 200 mg/kg) para reducir la colitis inducida con DSS, la cual fue comparable al tratamiento con sulfasalazina (100 mg/kg) y cromoglicato sódico (40 mg/kg) reduciendo significativamente los niveles de histamina, MPO y estrés oxidativo, con su consiguiente efecto anti-inflamatorio (Singh et al., 2009).

En esta misma línea, Rosillo y colaboradores, evaluaron inicialmente el efecto protector del ácido elálgico (10-20 mg/kg/día) en un modelo murino de EC aguda inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) (Rosillo et al., 2011). Además, estos autores describieron posteriormente la atenuación que producía el tratamiento

dietético del extracto de granada solo (250 mg/kg/día) o enriquecido en ácido elálgico (10 mg/kg/día) empleando el mismo modelo de inflamación colónica descrito con anterioridad (Rosillo et al., 2012).

El estudio macroscópico de las muestras colónicas reveló un aumento de la relación peso del colon/longitud del colon en los animales con lesiones en el mismo, de tal forma que este incremento se relacionó directamente con la inflamación, mientras que en los grupos tratados con ácido elálgico se observó una disminución de dicha relación, poniendo de manifiesto su acción protectora. Además, el tratamiento con ácido elálgico redujo considerablemente el daño tisular en el colon por medio de la observación de las heridas producidas tras la instilación de TNBS (Figura 6) (Rosillo et al., 2011).

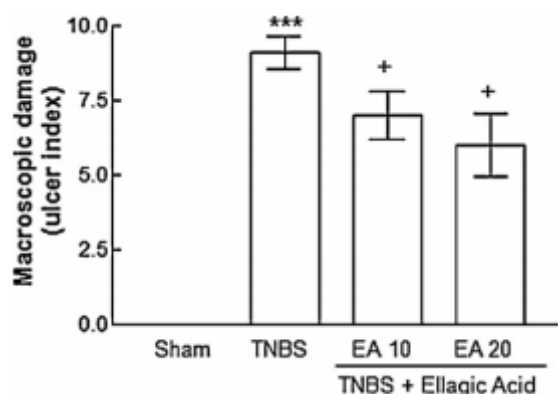


Figura 6. Efectos de la administración de ácido elálgico en la ulceración del colon de ratas (Tomada de Rosillo et al., 2011).

Este mismo efecto beneficioso tras la administración oral de ácido elálgico se observó en aquellos animales que habían recibido una dieta enriquecida en dicho polifenol y/o extracto de granada. Este estudio permitió valorar la capacidad del tratamiento con extracto de granada y enriquecido en ácido elálgico, de disminuir el daño colónico en comparación con la administración exclusiva de ácido elálgico (Figura 7). Como podemos observar en la Figura 7, el tratamiento dietético con extracto de granada y ácido elálgico, redujo la severidad y extensión del daño colónico inducido mediante TNBS en ratas (Rosillo et al., 2012).

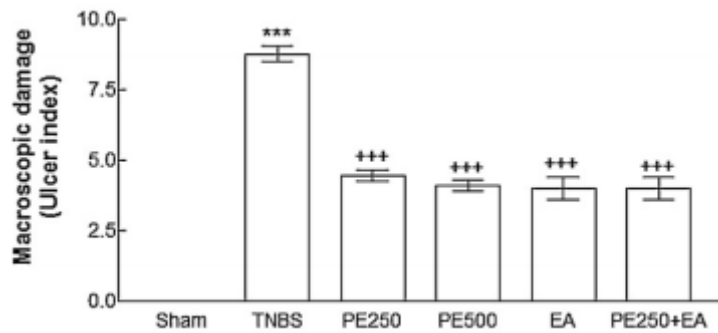


Figura 7. Efecto de la administración de ácido elálgico y extracto de granada a distintas dosis en la ulceración del colon de ratas (Tomada de Rosillo et al., 2012).

Los estudios histológicos revelaron el papel protector del ácido elálgico, ya que éste redujo las alteraciones morfológicas asociadas con la administración del TNBS, como la aparición de criptas y la transformación de la lámina propia, haciéndose más fina y apareciendo ulceraciones (Figura 8 Cy D). Estos estudios permitieron también la observación de acumulación de moco tras la administración del ácido elálgico, actuando como barrera, confiriéndole protección al colon (Rosillo et al., 2011).

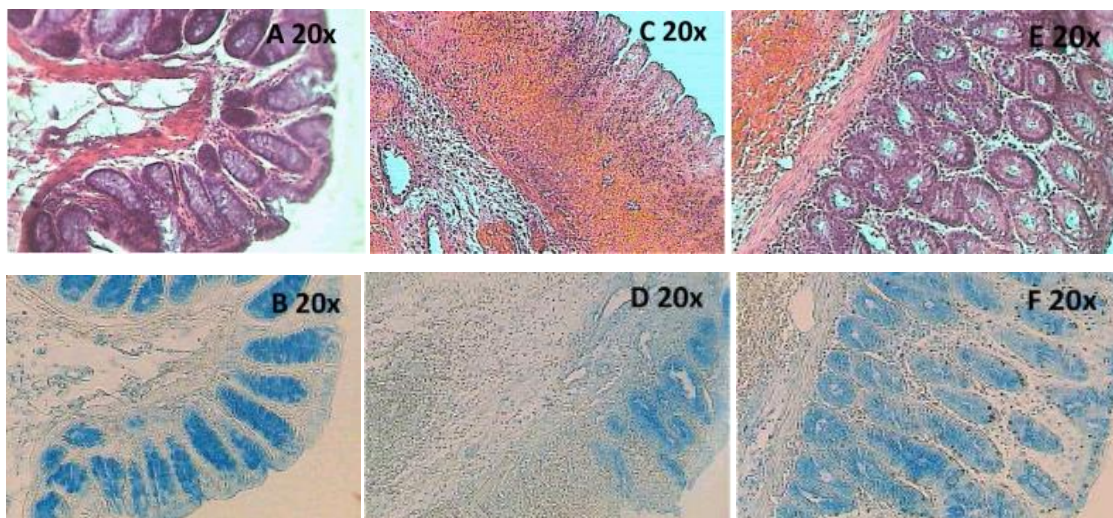


Figura 8. Efectos histológicos del ácido elálgico tras la inducción de una colitis con TNBS con tinción de hematoxilina y eosina, y tinción azul alcian: placebo (A y B), tratados con TNBS 10 mg/animal (C y D) y tratados con ácido elálgico (10 mg/kg) (E y F) (Tomada de Rosillo et al., 2011).

En el caso del estudio que englobaba el extracto de granada y el ácido elálgico, también se puede observar la eficacia del ácido elálgico para reducir las alteraciones

morfológicas asociadas a la administración del TNBS, siendo más evidente este efecto para el caso del extracto de granada rico en ácido elálgico (Figura 9) (Rosillo et al., 2012).

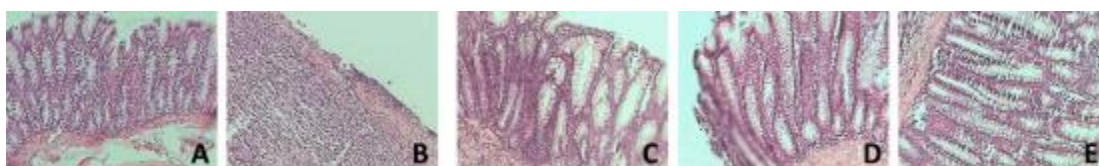


Figura 9. Efecto del ácido elálgico y el extracto de granada en el daño tisular al colon: placebo (A), tratamiento con TNBS 30 mg/animal (B), extracto de granada 250 mg/kg (C), ácido elálgico 10 mg/kg (D) y extracto de granada 250 mg/kg + ácido elálgico 10 mg/kg (Tomada de Rosillo et al., 2012).

La actividad MPO, indicadora del grado de infiltración de neutrófilos, y la producción de TNF α producido en la mucosa, son considerados parámetros de inflamación. Mediante este estudio se comprobó la disminución en el grado de infiltración de neutrófilos gracias a la disminución de la actividad MPO por parte del ácido elálgico, tras la inducción de la colitis con TNBS. Esta infiltración de neutrófilos parece estar relacionada con la necrosis y la disfunción de la mucosa que se asocian a la colitis, ya que representan una mayor fuente de ROS. Por tanto, el ácido elálgico contribuye a la disminución de estas ROS (Figura 10) (Rosillo et al., 2011).

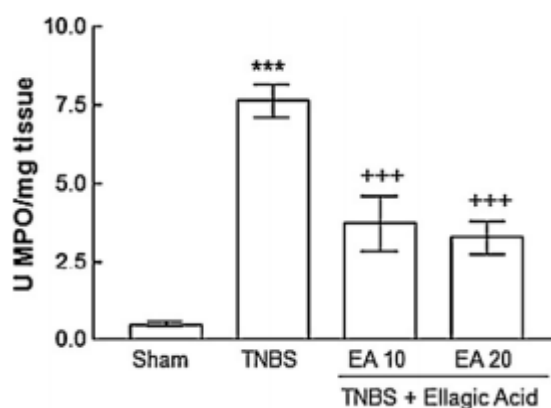


Figura 10. Efecto del ácido elálgico en la actividad MPO (Tomada de Rosillo et al., 2011).

Otros estudios han demostrado también la capacidad del ácido elálgico para disminuir la actividad MPO tras la administración de fosfalona en ratas con respecto al grupo control (Farnaz et al., 2016).

También estudiaron otros marcadores indicativos de la inhibición de la respuesta inflamatoria, como son los niveles de COX-2 e iNOS. La inducción de la colitis por TNBS produjo una sobreexpresión de COX-2 y de iNOS, que experimentó un gran descenso en aquellos animales colíticos que recibieron una administración oral de ácido eláxico, siendo éste mayor en el grupo tratado con la mayor dosis de polifenol ensayada (Figura 11) (Rosillo et al., 2011).

En el estudio de Rosillo et al., 2012, se puso de manifiesto la capacidad de inhibitoria de todos los suplementos dietéticos empleados en la expresión proteica de las enzimas COX-2 e iNOS. La mayor dosis de extracto de granada empleada demostró poseer una mayor capacidad inhibitoria. Aún así, fue mayor el efecto del extracto de granada enriquecido en ácido eláxico (Figura 12). Una inhibición de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS, contribuye a una disminución del daño intestinal al reducir la producción de mediadores inflamatorios, responsables del daño colónico. Aunque el mecanismo anti-inflamatorio del ácido eláxico no está bien definido, gracias a estos estudios se puede demostrar que su efecto beneficioso está relacionado con la inhibición proteica de la COX-2 e iNOS (Rosillo et al., 2012).

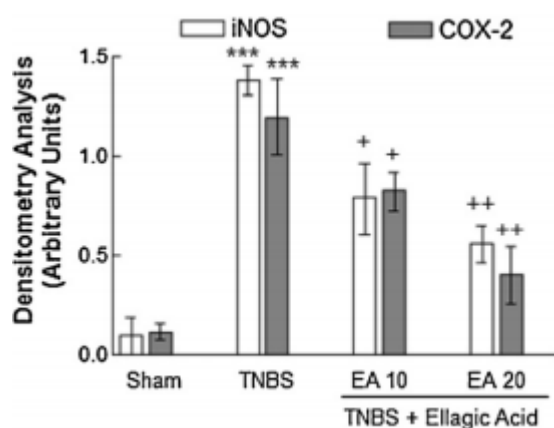


Figura 11. Efecto inhibitorio de la expresión de COX-2 y NOS en el colon, tras una colitis inducida con TNBS, por parte del ácido eláxico (Tomada de Rosillo et al., 2011).

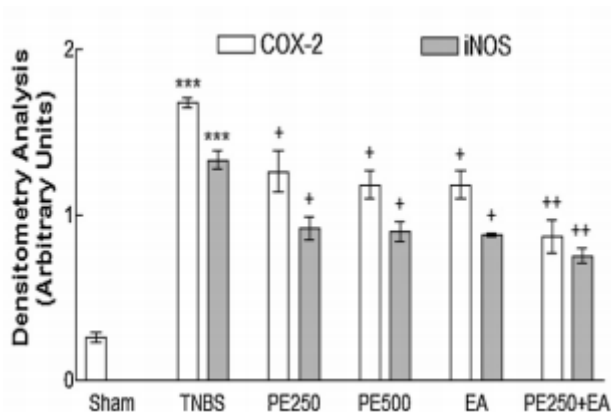


Figura 12. Efecto inhibitorio de la expresión de COX-2 y NOS en el colon, tras una colitis inducida con TNBS, por parte del ácido elálgico y el extracto de granada (Tomada de Rosillo et al., 2012).

Otro mecanismo de acción que subyace al efecto anti-inflamatorio atribuido a la granada en la colitis experimental, es la inhibición de la vía m-TOR. La activación de esta vía es fundamental para la regulación de la proliferación celular y la inflamación. En esta línea, se llevó a cabo un estudio en el que la colitis se indujo con DSS en ratas. La unión del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), insulina y otros factores de crecimiento a sus receptores, fosforila quinasas intracelulares, como la proteína-quinasa B (AKT). Cuando AKT se fosforila, es catalíticamente activa y contribuye a la fosforilación de otras quinasas, como mTOR, que deriva en una respuesta inflamatoria y en proliferación celular. En este estudio, se midieron los niveles de proteínas fosforiladas, para determinar la actividad de los componentes implicados en la vía m-TOR. Para ello, se empleó la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), estudiando los cambios que se producían en el perfil de genes de la vía m-TOR tras el tratamiento con la granada. Así, este estudio demostró una supresión de la vía m-TOR, que disminuyó la proliferación celular y la inflamación (Kim et al., 2016).

4.2.2 Ensayos clínicos

En 2015, se llevó a cabo un ensayo clínico para valorar la eficacia del extracto acuoso de la piel de *Punica granatum* (6 gramos de piel/día) en pacientes con CU. Fue un estudio randomizado, en el que unos pacientes recibieron dicha dosis, y otros, tratamiento placebo. Para valorar los resultados, la medida usada fue el índice de actividad de la colitis (LCAI). Así, el grupo tratado experimentó una mayor reducción de

dicho índice (41,4%) en comparación con el grupo placebo (18,2%) a la cuarta semana, aunque estas diferencias fueron menos llamativas en la semana 10. Atendiendo a los síntomas individuales, tras la administración del extracto de piel de granada, los pacientes experimentaron una mejoría en la incontinencia fecal, en la necesidad de medicación anti-diarreica, en el sangrado rectal, y en el bienestar general. Por tanto, se concluyó que el extracto de piel de granada fue efectivo en el tratamiento complementario de la CU (Kamali et al., 2015).

En la actualidad, se está terminando de reclutar pacientes en un ensayo clínico que evalúa el efecto de los elagitaninos presentes en el zumo de granada en la inflamación que tiene lugar en la EII. Se trata de un estudio randomizado, con 36 participantes. Los participantes que pertenecen al grupo experimental, reciben 125 mL de zumo 100% de granada, dos veces al día durante 12 semanas, mientras que el otro grupo recibe tratamiento placebo. Durante este estudio, se miden parámetros como los cambios en la concentración de elagitaninos en plasma, los cambios en los niveles de citocinas o cambios en los metabolitos de excreción urinaria de elagitaninos (Clinical Trials, Espín et al., 2014.)

4.3. ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

La EM es una enfermedad del sistema nervioso, de origen inflamatorio, que produce una lesión en las vainas de mielina, afectando al cerebro y la médula espinal. Además del proceso de desmielinización que tiene lugar en esta enfermedad, también tiene lugar una oxidación lipídica en el cerebro. Esta lesión hace que los mensajes entre el cerebro y el cuerpo sean más lentos o queden bloqueados, lo que conduce a los síntomas característicos de la EM, como son: debilidad muscular, problemas con el pensamiento y la memoria o problemas de coordinación.

Se trata de una enfermedad de causa desconocida, y parece ser de índole enfermedad autoinmune. Aunque la fisiopatología se asociaba a las células T, durante las últimas décadas se ha descubierto que se trata de un proceso en el que están implicadas células B. El mayor conocimiento de la enfermedad ha llevado al desarrollo de anticuerpos dirigidos a las células B para el tratamiento de la enfermedad, como es el caso del ocrelizumab (Mulero et al., 2018).

En los últimos años, ha tenido lugar una búsqueda en la naturaleza de productos que puedan ayudar al control de esta enfermedad, como es el caso de los componentes de *Punica granatum*.

4.3.1. Estudios preclínicos

4.3.1.1. *In vivo*

A día de hoy se han llevado a cabo estudios en animales de experimentación que demuestran la eficacia de la granada y/o de sus compuestos bioactivos en esta enfermedad gracias a su actuación a dichos niveles (Binyamin et al., 2015).

Concretamente, en el estudio llevado a cabo por Binyamin et al., estudiaron los efectos de la administración de una nanoemulsión de aceite de semilla de granada a ratones, a los que previamente se les había inducido una encefalomiелitis autoinmune (EAE) experimental. La inducción de la encefalomiелitis se llevó a cabo con glucoproteínas de oligodendrocitos asociadas a mielina (MOG).

El aceite de semillas de granada es rico en ácido púnico, un ácido graso poliinsaturado considerado uno de los antioxidantes más potentes. La administración dietética de aceite de semillas de granada (PSO) (27-75 mL PSO/kg) así como una nanoemulsión de la misma (100-300 microlitros (μ L), 10,8% de fracción de aceite) consiguió reducir los niveles cerebrales de malondialdehído (MDA), indicador del grado de peroxidación lipídica, en ratones sometidos a EAE experimental, alcanzando valores similares a los observados en el grupo naïve (Figura 13).

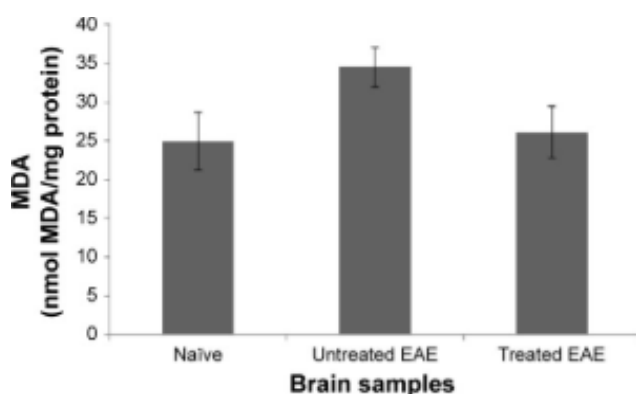


Figura 13. Efecto del tratamiento con una nanoemulsión de aceite de semillas de granada sobre los valores de MDA en la EAE experimental (Tomada de Binyamin et al., 2015).

Más concretamente, se observó que la nanoemulsión, incluso a una menor dosis que PSO, consiguió reducir la peroxidación lipídica de manera más efectiva que el tratamiento dietético con el aceite natural.

Estos resultados indican que la oxidación lipídica inicial no destaca en la activación inicial de células inmunitarias, pero que puede tener un papel fundamental en la posterior desmielinización. Las lipoproteínas oxidadas son neurotóxicas y pro-inflamatorias, por lo que los productos derivados de la peroxidación lipídica podrían tener un papel fundamental en la desmielinización y el daño axonal. Por tanto, y debido a la falta de toxicidad de esta nanoemulsión, sería una buena opción de tratamiento al comienzo de las enfermedades desmielinizantes, como es el caso de la EM. Cuando la enfermedad esté más avanzada, sería más conveniente la combinación de esta nanoemulsión con tratamientos avanzados para esta enfermedad, como por ejemplo el natalizumab.

En esta línea, recientes estudios se han centrado en el estudio de la actividad neuroprotectora de diversos compuestos bioactivos de *Punica granatum*, como el ácido elágico, sobre la pérdida de esfingolípidos asociados a la mielina que tiene lugar tras la inducción de una EAE experimental (Busto et al., 2018). En este estudio, se comprobó que los síntomas asociados a la EAE aparecían 8 días tras la inducción de la enfermedad experimental, alcanzando un pico en 3 días, coincidiendo con la reducción de la proteína básica de mielina (MBP) (fase aguda de la enfermedad). Además de la MBP, los esfingolípidos son los otros principales componentes de la mielina, y también se observó una reducción del nivel de éstos en la fase aguda de la enfermedad, tanto en corte cerebral como en la médula espinal. Por el contrario, en aquellas ratas recibieron ácido elágico (10mg/kg/día) incorporado en el agua de bebida durante dos días antes de la inducción de la EAE experimental se retrasó el comienzo de la enfermedad y los síntomas se redujeron, comprobando que los niveles de MBP y esfingolípidos no experimentaron la reducción observada en el grupo de animales sometidos a EAE que no habían recibido tratamiento con ácido elágico, de forma que el grupo tratado no experimentó una la pérdida de peso o la infiltración de células inflamatorias T-CD3+ que se observó en el grupo no tratado.

Asimismo, el tratamiento con ácido elágico ejerció un efecto neuroprotector tras la administración de cuprizona al 0.2% administrada durante cuatro semanas en la

comida para inducir la depleción de oligodendrocitos en ratones (Sanadgol et al., 2017). El análisis de la glicoproteína de mielina oligodendrocítica (MOG), reveló una disminución de dichos valores en aquellas ratas en las que se indujo la desmielinización. Por el contrario, en los grupos de ratas tratadas con ácido elálgico (40 u 80 mg/kg/día) hubo una gran diferencia de respuesta en función de la dosis empleada. Concretamente, la dosis de 80/mg/kg/día promovió un incremento de MOG acompañado de una disminución de la apoptosis.

La IL-17 es una citocina esencial para el desarrollo de la desmielinización de manera que una disminución de sus niveles resulta esencial para evitar el proceso, mientras que la sobreexpresión de IL-11 ha demostrado limitar la desmielinización por disminución de la microgliosis y de la muerte de oligodendrocitos al poseer efectos reparadores espontáneos. En base a los estudios publicados, altas dosis ensayadas de ácido elálgico han demostrado ejercer un efecto antiinflamatorio y profiláctico de la desmielinización, al reducir significativamente la expresión de IL-17 e incrementar los niveles de IL-11, limitando con ello la pérdida de oligodendrocitos y evitando así la correspondiente desmielinización.

En cuanto a los estudios de apoptosis celular, los oligodendrocitos maduros procedentes de aquellos animales tratados con cuprizona durante 4 semanas provocaron la sobreexpresión de la caspasa-3, mientras que en los procedentes de animales que recibieron tratamiento con ácido elálgico a alta dosis, los niveles de esta caspasa se vieron notablemente reducidos, demostrando el efecto protector de este polifenol.

5. CONCLUSIONES

A raíz de los datos obtenidos en la presente revisión, podemos concluir:

1. Existe un elevado número de estudios preclínicos que demuestran los efectos beneficiosos de *Punica granatum* y/o sus componentes bioactivos en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades inflamatorias autoinmunes más prevalentes. La mayoría de los datos disponibles proceden de modelos animales experimentales y se centran particularmente en los modelos de EII y AR, seguido de la EM experimental.

2. La mayoría de las propiedades beneficiosas de *Punica granatum* en la EII, AR y EM son atribuidas a su alto contenido en polifenoles, destacando fundamentalmente el papel del ácido elágico, el cual reduce la producción de mediadores proinflamatorios, tales como, TNF- α , IL-1 β e IL-17, entre otros, a través del bloqueo de las vías de señalización protagonizadas por el NF-KB y las MAPK. No obstante, cabe mencionar también el efecto beneficioso de las punicalaginas, las urolitinas y del ácido púnico, ácido graso poliinsaturado, clave en la EM experimental.

3. Los ensayos clínicos disponibles son muy limitados, sobretodo en la EM, pero resultan prometedores y refuerzan el potencial terapéutico de *Punica granatum* y/o sus compuestos bioactivos descrito en los estudios preclínicos.

4. Resulta esencial la puesta en marcha de ensayos preclínicos y clínicos adicionales que permitiesen confirmar el efecto beneficioso de *Punica granatum* y/o sus compuestos bioactivos y la incorporación de éstos hoy día a la terapia convencional y/o prevención de la EII, AR y EM.

(Anexo I). Resumen de los ensayos llevados a cabo con *Punica granatum* o alguno de sus componentes en la artritis, EII y la esclerosis múltiple.

| Patología | Parte de la granada o componente | Dosis | Tipo de sistema | Mecanismo de acción |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------|--|
| ARTRITIS <i>In vivo</i> | Extracto | 13.6 ó 34 mg/kg | Ratones DBA/1Lac | Disminución de la expresión de: <ul style="list-style-type: none"> • IL-1β • • IL-6 • TNF-α |
| | Ácido elágico | 58,33 mg/kg (3dosis/semana) | Roedores MF1 | Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • TNF-α • IL-1β |

| | | | | |
|-----------------------------|--------------------|-----------------|--------------|---|
| | | | | <ul style="list-style-type: none"> • IL-17 • PG • MMP Inhibición de: <ul style="list-style-type: none"> • NF-kB |
| | Extracto | 50 y 75 mg/kg | ratas | Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • IL-1β • TNF-α |
| | Punicalagina | 50 mg/kg | Roedores | Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • edema • IL-1 • Liberación de proteoglicanos |
| ARTRITIS <i>in vitro</i> | Punicalagina | | Colágeno II | Inhibición de: <ul style="list-style-type: none"> • degradación colágeno • MMP-13 • IL-1β • MMP-12 y MMP-9 |
| | Delfinidina | 10-100 μ M | Células MH7A | Inhibición de: <ul style="list-style-type: none"> • HAT • NF-kB • COX-2, MAPKK-4 y PI-3 |
| | Zumo (delfinidina) | 10 y 13 μ M | Células MH7A | Disminución de la expresión de: <ul style="list-style-type: none"> • IL-1 e IL-6 • COX-2 y NF-kB |

| | | | | |
|---------------------------|-----------------|---|-------------------------------|--|
| Artritis ensayos clínicos | Extracto fluido | 100 mL | Personas | Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • DAS28 • estrés oxidativo • peroxidación lipídica |
| | Extracto | 250 mg | Personas | Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • actividad de la enfermedad • dolor • inflamación articular |
| EII <i>in vitro</i> | Urolitinas Ay B | Uro-A: 40 μ M Uro-B: 5 μ M Ácido elágico: 1 μ M | Línea celular humana CCD18-Co | Disminución de la expresión de: <ul style="list-style-type: none"> • PGE2 • IL-8 Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • migración celular • Adhesión de monocitos |
| | Extracto | 50 μ M punicalagina | Células intestino humano | Inhibición: <ul style="list-style-type: none"> • TNF-α • IL-1β |
| EII <i>in vivo</i> | Ácido elágico | 10-20 mg/kg | Ratas Wistar | Disminución de la expresión de: <ul style="list-style-type: none"> • COX-2 • NOS Disminución de la activación de: <ul style="list-style-type: none"> • p38 • JNK • MAPKs • NF-kB |

| | | | | | | | | |
|---------------------|-------------------------------------|----|---------|--------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------|---|
| | AE microesferas | | | 10 mg/kg/día | | | Ratones | Disminución actividad MPO |
| | Extracto granada Uro-A | | | 250 mg/kg/día 15 mg/kg/día | | | Ratas | Disminución: <ul style="list-style-type: none"> • NO • PGE2 |
| | AE Fracción rica en AE | | | 100 mg/kg/día 200 mg/kg/día | | | Ratones | Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • Histamina • MPO • EStrés oxidativo |
| | AE | EG | AE + EG | 10 mg/kg | 250 mg/kg 500 mg/kg | 10 mg/kg + 250 mg/kg | Ratas Wistar | Disminución de la expresión de: <ul style="list-style-type: none"> • COX-2 • NOS Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • MAPKs Prevención de la traslocación de: <ul style="list-style-type: none"> • NF-kB |
| Ensayos clínicos AR | Zumos | | | 125 mL | | | Personas | Por confirmar |
| | Extracto acuoso | | | 6g piel/día | | | Personas | Disminución de: <ul style="list-style-type: none"> • medicación anti-diarreica • sangrado rectal Mejoría: <ul style="list-style-type: none"> • bienestar general • incontinencia fecal |
| | Aceite de la semilla (ácido púnico) | | | 100-300 microlitros | | | Ratones C57BL/6 | Disminución de los niveles de: <ul style="list-style-type: none"> • MDA • lipoproteínas oxidadas • daño axonal |

| | | | | |
|---------------------------------------|---------------|--------------|---------|--|
| Esclerosis múltiple <i>In vivo</i> | | | | |
| | Ácido elágico | 10 mg/kg/día | Ratas | Disminución en la reducción de los niveles de MBP Aumento del nivel de esfingolípidos |
| | Ácido elágico | 80 mg/kg/día | Ratones | Disminución de expresión: <ul style="list-style-type: none"> • IL-17 Aumento de expresión: <ul style="list-style-type: none"> • IL-11 • Caspasa-3 |

6. BIBLIOGRAFÍA

- Akhtar N, Khan NM, Ashruf O, Haqqi TM. Inhibition of cartilage degradation and suppression of PGE₂ and MMPs expression by Pomegranate Fruit Extract in a model of Post-Traumatic Osteoarthritis. *Nutrition*. 2017; 33: 1-13.
- Allam G, Mahdi EA, Alzahrani AM, Abuelsaad AS. Ellagic acid alleviates adjuvant induced arthritis by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Cent Eur J Immunol*. 2016; 41(4): 339-349.
- Balbir-Gurman A, Fuhrman B, Braun-Moscovici Y, Markovits D, Aviram M. Consumption of pomegranate decreases serum oxidative stress and reduces disease activity in patients with active rheumatoid arthritis: a pilot study. *Eur J Nutr*. 2017; 71: 92-96.
- Bamias G, Arseneau KO, Cominelli F. Mouse models of inflammatory bowel disease for investigating mucosal immunity in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2017; 33(6): 411-416.

- Bayry J, Radstake TR. Immune-mediated inflammatory diseases: progress in molecular pathogenesis and therapeutic strategies. *Exp Rev Clin Immunol*. 2013; 9(4): 297-99.
- Binyamin O, Larush L, Frid K, Keller G, Friedman-Levi Y, Ovadia H et al. Treatment of a multiple sclerosis animal model by a novel nanodrop formulation of a natural antioxidant. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10: 7165-7174.
- Bookheimer SY, Renner BA, Ekstrom A, Li Z, Henning SM, Brown JA et al. Pomegranate juice augments memory and FMRI activity in middle-aged and older adults with mild memory complaints. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 946298.
- Busto R, Serna J, Perianes-Cachero A, Quintana-Portillo R, García-Seisdedos D, Canfrán-Duque A et al. Ellagic acid protects from myelin-associated sphingolipid loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochim Biophys Acta*. 2018; 1863(9): 958-967.
- Calín A. La granada cultivada en España [en línea]. 2015 [en línea]. [Consultado en marzo 2018]. Disponible en: http://www.zumodegranada.com/wp-content/uploads/2015/09/LIBRO_la-fruta-granada-cultivada-en-Espana-2015.pdf
- Colombo E, Sangiovanni E, Dell'Agli M. A Review on the Anti-Inflammatory Activity of Pomegranate in the Gastrointestinal Tract. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 247145.
- Danesi F, Ferguson L. Could Pomegranate Juice Help in the Control of Inflammatory Diseases?. *Nutrients*. 2017; 9(9): 958.
- Del Villar JA, Melo E. Guía de plantas medicinales del Magreb. Cuadernos de la fundación Dr. Antonio Esteve. 2010; 18: 52-55.
- Espín JC. Pharmacokinetics and Bioavailability of Pomegranate Phenolics and Urolithins in Healthy Subjects. *Clinical Trials*. 2014.
- Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*. 2007; 68: 2986-3008.
- Espín JC, González-Barrio R, Cerdá B, López-Bote C, Rey AI, Tomás-Barberán FA- The Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and

- metabolism of allagitannins in humans. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 10476-10485.
- Farnaz S, Maqbool F, Baeri M, Gholalmi M, Abdollahi M. Phosalone-induced inflammation and oxidative stress in the colon: Evaluation and treatment. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(21): 2999-5011.
 - Gautam RK, Sharma S, Sharma K, Gupta G. Evaluation of Antiarthritic Activity of Butanol Fraction of *Punica granatum* Linn. Rind Extract Against Freund's Complete Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2018; 37(1): 53-62.
 - Gimenez-Bastida JA, Martínez-Florensa M, Espín JC, Tomas-Barberán FA, García-Conesa MT. A citrus extract containing flavanones represses plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression and regulates multiple inflammatory, tissue repair, and fibrosis genes in human colon fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 9305–9315.
 - Giménez-Bastida, J. Efectos anti-inflamatorios y antibacterianos de compuestos fenólicos abundantes en cítricos y granada, y de sus derivados metabólicos: mecanismos celulares y moleculares. 2012.
 - Hollebeeck S, Winand J, Hérent MF, During A, Leclercq J, Larondelle Y et al. Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of human intestine. *Food Funct.* 2012; 3(8): 875-85.
 - Houston DMJ, Burgert JJ, Denyer SP, Heard CM. Potentiated virucidal activity of pomegranate rind extract (PRE) and punicalagin against *Herpes simplex virus* (HSV) when co-administered with zinc (II) ions, and antiviral activity of PRE against HSV and aciclovir-resistant HSV. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0179291.
 - Jean-Gilles D, Li L, Vaidyanathan VG, King R, Cho B, Worthen DR et al. Inhibitory effects of polyphenol punicalgin on type-II collagen degradation in vitro and inflammation in vivo. *Chem Biol Interact.* 2013; 205(2): 90-9.

- Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev*. 2008; 13(2): 128-44.
- Kamali M, Tavakoli H, Khodadoost M, Daghighzadeh H, Kamalinejad M, Gachkar L et al. Efficacy of the *Punica granatum* peels aqueous extract for symptom management in ulcerative colitis patients. A randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Complement Ther Clin Pract*. 2015; 21(3): 141-6.
- Kim H, Banerjee N, Ivanov I, Pfent CM, Prudhomme KR, Bisson WH et al. Comparison of anti-inflammatory mechanisms of mango (*Mangifera Indica* L.) and pomegranate (*Punica Granatum* L.) in a preclinical model of colitis. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(9): 1912-1923.
- Kim H, Banerjee N, Sirven MA, Minamoto Y, Markel ME, Suchodolski JS et al. Pomegranate polyphenolics reduce inflammation and ulceration in intestinal colitis-involvement of the miR145/p70S6K1/HIF1 α axis in vivo and in vitro. *J Nutr Biochem*. 2017; 43: 107-115.
- Kuek A, Hazleman BL, Östör AJK. Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. *Postgrad Med J*. 2007; 83(978): 251-260.
- Larrosa M, González-Sarrías A, Yáñez-Gascón MJ, Selma MV, Azorín-Ortuño M, Toti S et al. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem*. 2010; 21(8): 717-25.
- Liu H, Zeng Z, Wang S, Li T, Mastriani E, Li QH et al. Main components of pomegranate, ellagic acid and luteolin, inhibit metastasis of ovarian cancer by down-regulating MMP2 and MMP9. *Cancer Bio Ther*. 2017; 18(12): 990-999.
- López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Carrera-Alonso E., Pérez-Fernandez T, Rodríguez-Caravaca G, Boixeda-de-Miguel D et al. Epidemiologic study on the current incidence of inflammatory bowel disease in Madrid. *Rev. Esp. Enferm. Dig*. 2009; 101: 168-772.
- Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-

induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 650-659.

- Mulero P, Midaglia L, Montalban X. Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Ther Adv Neurol Disord.* 2018; 11: 1756286418773025.
- Ogawa Y, Kanatasu K, Lino T, Kato S, Jeong YI, Shibata N et al. Protection against dextran sulfate sodium-induced colitis by microspheres of ellagic acid in rats. *Life Sci.* 2002; 71(7): 827-39.
- Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, Siegel RM. Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12(8): 570-80.
- Pereira R, Lago P, Faria R, Torres T. Safety of Anti-TNG Therapies in Immune-Mediated Inflammatory Diseases: Focus on Infections and Malignancy. *Drug Dev Res.* 2015; 76(8): 419-27.
- Pollard KM, Hultman P, Kono DH. Immunology and genetics of induced systemic autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005; 4(5): 282-288.
- Rawla P, Sunkara T, Pradeep J. Role of biologics and biosimilars in inflammatory bowel disease: current trends and future perspectives. *J Inflamm Res.* 2018; 11: 215-216.
- Reza H, Arastoo M, Nasser S. A Comprehensive Review of *Punica granatum* (Pomegranate) Properties in Toxicological, Pharmacological, Cellular and Molecular Biology Researches. *Iran J Pharm Res.* 2012; 11(2): 385-400.
- Rojanathammanee L, Puig KL, Crombs CK. Pomegranate Polyphenols and Extract Inhibit Nuclear Factor of Activated T-Cell Activity and Microglial Activation In Vitro and in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Nutr.* 2013; 143(5): 597-605.
- Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82(7): 737-45.
- Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Aparicio-Soto M, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I et al. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched

- pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res.* 2012; 66(12): 235-42.
- Sanadgol N, Golab F, Tashakkor Z, Taki N, Moradi S, Mostafaie A et al. Neuroprotective effects of ellagic acid on cuprizone-induced acute demyelination through limitation of microgliosis, adjustment of CXCL12/IL-17/IL-11 axis and restriction of mature oligodendrocytes apoptosis. *Pharm Biol.* 2017; 55(1): 1679-1687.
 - Seong AR, Yoo JY, Choi K, Lee MH, Lee YH, Lee J et al. Delphinidin, a specific inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses inflammatory signaling via prevention of NF- κ B acetylation in fibroblast-like synoviocyte MH7A cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 410(3): 581-6.
 - Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. Consumption of Hydrolyzable Tannins Rich Pomegranate Extract (POMx) Suppresses Inflammation and Joint Damage In Rheumatoid Arthritis. *Nutrition.* 2008; 24(7-8): 733-743.
 - Singh K, Jaggi AS, Singh N. Exploring the ameliorative potential of Punica granatum in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Phytother Res.* 2009; 23(11): 1565-74.
 - Spilmont M, Léotoing L, Davicco MJ, Lebecque P, Miot-Noirault E, Pilet P et al. *Nutrients.* 2015; 7(11): 9265-92284.
 - Stuchlík M, Zák S. Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2002; 146(2): 3-10.
 - Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007; 19: 289–295.
 - Szigethy E, McLafferty L, Goyal A. Inflammatory bowel disease. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2010; 19: 301-318.
 - Tibullo D, Caporarello N, Giallongo C, Anfuso CD, Genovese C, Arlotta C et al. *Nutrients.* 2016; 8(10): 611.

- Toussirot E, Béreau M, Vauchy C, Saas P. Could Sodium Chloride be an Environmental Trigger for Immune-Mediated Diseases? An Overview of the Experimental and Clinical Evidence. *Front Physiol.* 2018; 9: 440.
- Viladomiu M, Hontencillas R, Lu P, Bassanganya-Riera J. Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 789764.
- Wang L, Ho J, Glackin C, Martins-Green M. Specific Pomegranate Juice Components as Potential Inhibitors of Prostate Cancer Metastasis. *Trans Oncol.* 2012; 5(5): 344-355.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 821-852.
- Williams JP, Meyers JA. Immune-mediated inflammatory disorders (I.M.I.D.s): the economic and clinical costs. *Am J Manag Care.* 2002; 8(21): 664-81.
- Yaniv Z, Dudai N. *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East.* 1ª ed. Hungría: Springer; 2014.