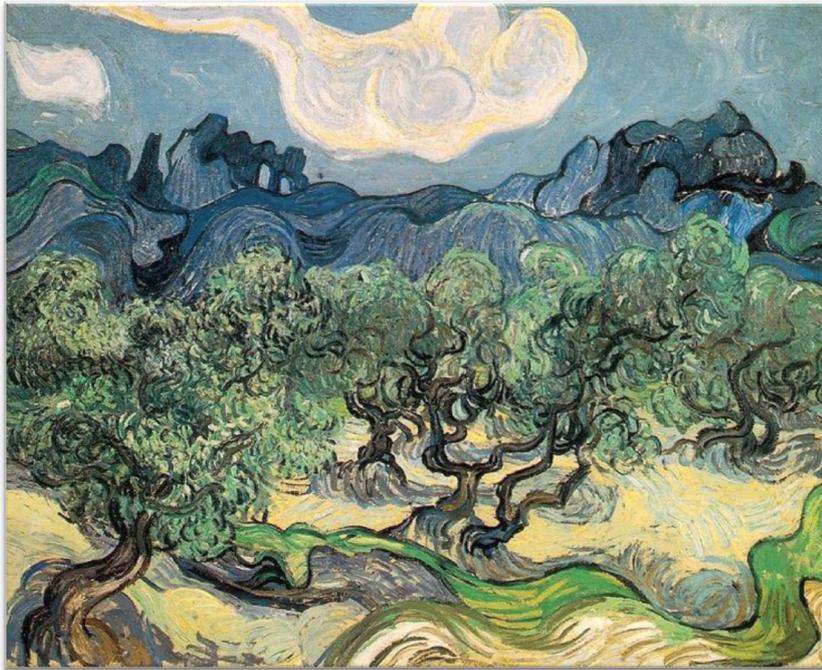




# EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS SW982



TATIANA MONTOYA GARCÍA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA





Facultad de Farmacia  
Departamento de Farmacología  
Universidad de Sevilla

**Trabajo Fin de Grado Experimental**

**Grado en Farmacia**

# **EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS SW982**

**Realizado por: Tatiana Montoya García.**

**Dirigido por: Catalina Alarcón de la Lastra Romero. Catedrática de Farmacología.**

**Facultad de Farmacia, Sevilla.**

**7 de julio de 2016**



# RESUMEN

**Introducción:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica crónica de etiología autoinmune caracterizada por una sinovitis erosiva en la cual el tejido de granulación de origen sinovial (*pannus*), invade y erosiona el cartílago y el hueso de las articulaciones diartrodiales. Los fibroblastos sinoviales (FS) o sinoviocitos de tipo fibroblástico juegan un papel fundamental en la persistencia de la inflamación crónica y en el daño articular, siendo unas de las poblaciones celulares más abundantes del *pannus*.

La oleuropeína (OLE) es un secoiridoide, componente fenólico mayoritario de la pulpa del fruto y hojas de *Olea europaea* L. y, que a su vez, se encuentra en el aceite de oliva. Se han documentado diversas actividades farmacológicas del citado secoiridoide, entre las que se destaca la antioxidante y antiinflamatoria. No obstante no existen, hasta la fecha, estudios experimentales en fibroblastos humanos que validen su potencial antirreumático, así como los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados.

**Objetivos:** Este estudio pretende evaluar el efecto antiinflamatorio de OLE en la línea celular SW982 inducida con IL-1 $\beta$ , mediante el análisis de la producción de la producción de mediadores pro-inflamatorios, así como, las vías de señalización involucradas.

**Materiales y métodos:** Las células SW982 fueron cultivadas en DMEM y estimuladas con IL-1 $\beta$  (5 ng/mL) en presencia o ausencia de OLE (50 y 100  $\mu$ M). La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo con sulforrodamina B (SRB). Los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 fueron evaluados por la técnica ELISA. La expresión de las proteínas inflamatorias COX-2 y m-PGES-1 y, estudio de las vías de señalización celular fueron llevados a cabo mediante Western blot.

**Resultados:** El tratamiento con OLE redujo significativamente los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$ , y además disminuyó la sobreexpresión de COX-2 y m-PGES-1. Este compuesto a las concentraciones ensayadas fue capaz, además, de modular la activación de JNK y p38, impidiendo su fosforilación.

**Conclusión:** OLE reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  y la expresión proteica de COX-2 y m-PGES-1, posiblemente a través de la inhibición de la vía de señalización de MAPK: PJNK y p38, en fibroblastos sinoviales humanos SW982 estimulados con IL-1 $\beta$ .

**PALABRAS CLAVE:** Oleuropeína – inflamación – fibroblasto sinovial – SW982



# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES DEL TEMA.....</b>	<b>3</b>
	▪ Oleuropeína	
	▪ Actividad farmacológica de la oleuropeína	
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>III.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>18</b>
	▪ Oleuropeína: Extracción y caracterización química	
	▪ Cultivo celular	
	▪ Viabilidad celular	
	▪ Determinación de citocinas: IL-6 y TNF- $\alpha$	
	▪ Determinación de la expresión proteica	
	▪ Evaluación estadística de los resultados	
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
	▪ Efectos de la oleuropeína en la viabilidad celular	
	▪ Efectos de la oleuropeína en la producción de citocinas pro-inflamatorias Interleucina-6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) en células SW982	
	▪ Efectos de la oleuropeína sobre la expresión de Ciclooxygenasa-2 (COX-2) y Prostaglandina E Sintasa 1 microsomal (m-PGES-1) en células SW982	
	▪ Estudio de vías de señalización	
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>VII.</b>	<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS.....</b>	<b>31</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>32</b>

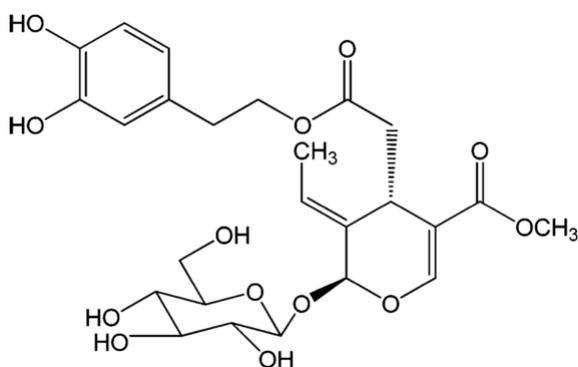


# INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES DEL TEMA

## I. OLEUROPEÍNA

### A. Características químicas y distribución en la naturaleza

La oleuropeína (OLE) es un glucósido secoiridoide esterificado con un alcohol fenilpropanoide. En concreto esta sustancia está constituida por la unión de tres moléculas: hidroxitirosol, glucosa y ácido enólico. Químicamente se conoce como un éster del oleósido-11-metil-éster (ácido elenólico glucosado) con el 3,4-dihidroxifeniletanol ó 3,4-DHPEA (Figura 1).



**Figura 1:** Estructura química de la oleuropeína.

OLE es abundante en las familias *Gentianaceae*, *Cornaleae*, *Oleaceae*. En esta última familia, el secoiridoide se puede encontrar y aislar de numerosos géneros, y ha sido descrita en *Fraxinus americana* L., *F. excelsior* L., *F. chinensis* Roxb., (Sanz y cols., 2012) *Syringa pubescens* Turcz. (Deng y cols., 2010), *S. josikaea* J.Jacq. ex Rchb., *S. vulgaris* L., *S. reticulata* (Blume) H.Hara., (Bi y cols., 2011), *Ligustrum lucidum* Ait. (Guo y cols., 2011), *L. vulgare* L., *L. ovalifolium* Hassk., *Phillyrea latifolia* L., entre otras (Soler-Rivas, 2000). Sin embargo, la más comúnmente conocida es la *Olea europaea* L. (que da nombre al glicósido), siendo el componente fenólico mayoritario de la pulpa de las aceitunas verdes, aunque también las hojas del olivo contienen OLE como componente principal; asimismo, se puede encontrar en el aceite de oliva virgen extra (AOVE), al que da su sabor amargo.

La ruta del ácido mevalónico es la responsable de la síntesis de los secoiridoide oleósidos como OLE. Estas rutas metabólicas son complejas y se pueden ver afectadas por numerosas variables tales como la variedad del fruto, las condiciones del crecimiento y el estrés ambiental, entre otros (Ryan y cols., 2002).

## B. Variaciones cuali y cuantitativas en el contenido de oleuropeína en *Olea europaea* L.

Se han usado diversos métodos para analizar la presencia cualitativa y cuantitativa de compuestos fenólicos y secoiridoides: desde técnicas simples como cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía de masas-espectrometría de masas (GC-MS) y electroforesis capilar (CE); y métodos sofisticados como Full Automatic Modelling System (FAMS) o tetrametilsilano NMR, ionización por electrospray- espectroscopía de masa (ESI-MS/MS) (Omar, 2010).

El contenido de OLE varía según el origen, condiciones de cosecha, condiciones meteorológicas, grado de humedad, sistema de procesado (secado y extracción), grado de contaminación del suelo (Ahmad-Qasem y cols., 2013), entre otros. A pesar de ello, es en la hoja donde este componente alcanza un mayor contenido que varía de 1% a 14%, frente a 0.005% y 0.12% que puede presentarse en el aceite de oliva (Tabla 1).

**Tabla 1:** Contenido de oleuropeína en diferentes partes del olivo (Barbaro y cols., 2014).

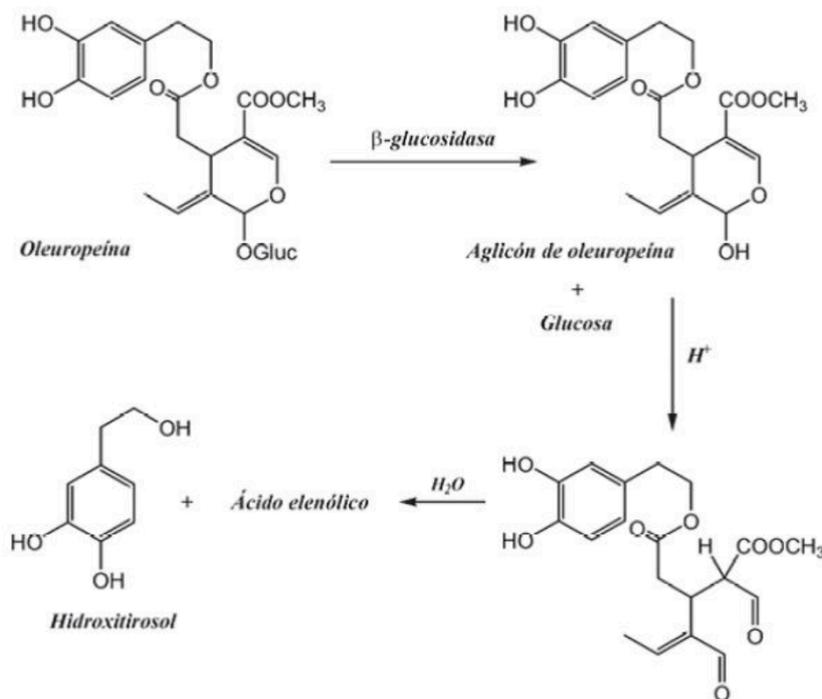
Parte del olivo	Contenido de Oleuropeína	Referencia
Hojas	93-134 mg/g (PS)	Charoenprasert y Mitchell, 2012
	6.1-13.3 mg/g (PS)	Savournin y cols., 2001
	5.6-9.2 mg/g (PS)	Ansari y cols., 2011
	34.0-38.1 mg/g (PF)	Tayoub y cols., 2012
	60-90 mg/g (PS)	Malik y Bradford, 2006
	2.1-24.8 mg/g (PS)	Omar, 2010
Ramas	11-14 g/kg (PS)	Altinyay y Altum, 2006
	18.9 g/kg (PS)	Japón-Lujan y Luque de Castro, 2007
Raíces	1.9-6.0 g/kg (PS)	Ortega-García y Peragón, 2010
Capullos	15.7-58.4 mg/g (PF)	Malik y Bradford, 2006
Flores	15.3-20.9 mg/g (PF)	Malik y Bradford, 2006
Aceitunas (fruto)	2.5-8.9 mg/g (PF)	Ranalli y cols., 2006
	0.6-1.1 mg/g (PS)	Ansari y cols., 2011
	13.6-50.8 mg/g (PF)	Malik y Bradford, 2006
	0.4-21.7 mg/g (PS)	Omar, 2010

	1.3-5.8 mg/g (PF)	<i>Bouaziz y cols., 2010</i>
	0.3-3.5 mg/g (PF)	<i>Esti y cols., 1998</i>
Aceitunas de mesa	0.0-0.1 mg/g (PS)	<i>Omar, 2010</i>
	0.0-0-5 mg/g (PF)	<i>Zoidou y cols., 2010</i>
Aceite de oliva virgen	0.0-11.2 mg/kg	<i>Perri y cols., 1999</i>
	0.0-4.7 mg/kg	<i>Caponio y cols., 1999</i>
	2.0 mg/kg	<i>Truck y Hayball, 2002</i>
	3.8 mg/kg	<i>Tuberoso y cols., 2007</i>
Aceite de oliva	Se desconoce	<i>Visioli y Galli, 2000</i>
Pulpa de la aceituna	0.4 mg/g (PS)	<i>Kanakis y cols., 2013</i>
Agua residual de la	6.5 mg/g (PS)	<i>Goldsmith y cols., 2014</i>
molienda de la aceituna	Se desconoce	<i>Allouche y cols., 2004</i>

PS: Peso seco/PF: Peso fresco

El hecho de que OLE sea más abundante en cantidad en las hojas y frutos jóvenes, es debido a reacciones químicas y enzimáticas que tienen lugar en la planta durante la maduración de la aceituna (*De la Torre-Carbot y cols., 2005*). En la formación del fruto del olivo, se distinguen tres fases: una fase de crecimiento, en la que se acumula OLE; una fase de maduración verde, que coincide con una reducción en el nivel de clorofila y OLE; y una fase de maduración negra, que se caracteriza por la aparición de antocianinas y durante la cual OLE continúa disminuyendo. Así, el secoiridoide es muy abundante en estados tempranos; aunque menor, su nivel continúa siendo importante en la cosecha de cultivos verdes selectos. En cultivos negros, este nivel desciende rápidamente durante la maduración, llegando incluso a cero en algunas variedades cuando el fruto está completamente negro (*Omar, 2010*).

Las enzimas endógenas hidrolíticas, principalmente las glucosidasas, entre ellas, la  $\beta$ -glucosidasa, pueden activarse durante procesos de molienda o maceración en extractos acuosos y catalizar la hidrólisis de los fenoles como OLE con la consiguiente producción del aglicón, que se isomeriza rápidamente a través de la forma enólica a dialdéhido (*Fernandez-Bolaños y cols., 2002*) (*Figura 2*).

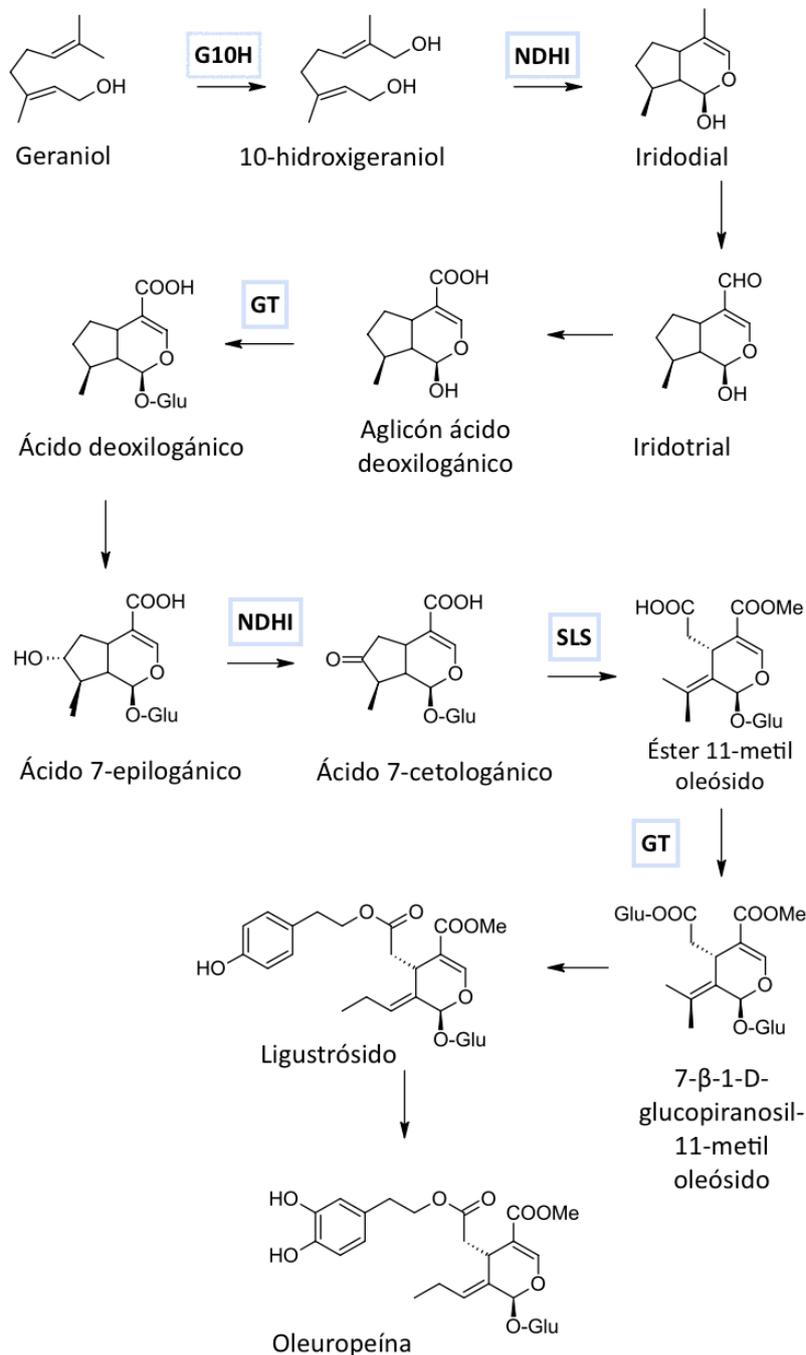


**Figura 2.** Hidrólisis y degradación parcial de oleuropeína en hojas del olivo.

### C. Biosíntesis

El principal precursor de la síntesis de OLE es el ácido mevalónico como se ha comentado, que es el sustrato para la síntesis del oleósido 11-metil-éster (ácido elenólico glucosado). El primer paso que ocurre en la ruta biosintética es la catalización por geraniol sintasa (GES), y la conversión del geraniol a 10-hidroxigeraniol por la enzima geraniol 10-hidroxilasa (GE10H). La actividad bioquímica del NADH deshidrogenasa (NDHI) sobre el 10-hidroxigeraniol da paso al aglicón ácido deoxilogánico (*Alagna y cols., 2012*). La transferencia de grupos glucosílo al aglicón ácido deoxilogánico para la formación de ácido deoxilogánico (precursor de varios monoterpenos alcaloides indólicos y OLE) es catalizada por glucosiltransferasa (GT). El ácido deoxilogánico experimenta una 7- $\alpha$ -hidroxilación del anillo ciclopentano, formando el ácido 7-epilogánico (*Obied y cols., 2007*), el cual rápidamente pasa a ácido 7-cetologánico mediante la oxidación del grupo hidroxilo por NNDI. La metilación de este ácido es catalizada por la ácido logánico metiltransferasa (ALMT), dando lugar a la 7-cetologanina. En este punto, la expresión constitutiva de secologanina sintasa (SLS) oxida el grupo cetónico, y se forma el éster 11-metil oleósido, el cual es inmediatamente glicosilado a 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido por la GT. Este último componente experimenta una reacción de esterificación con tirosol que

forma el ligustrósido, y finalmente, OLE se forma por hidroxilación (Alagna et al., 2012)(Figura 3).



**Figura 3:** Esquema de la ruta biosintética de la oleuropeína.

#### D. Metabolismo y biodisponibilidad

Los compuestos fenólicos han demostrado ser altamente biodisponibles. La administración del aglicón OLE presenta un 55-60% de absorción en humanos (Vissers y cols., 2002). Además,

otros estudios han demostrado que OLE se absorbe rápidamente en el intestino delgado y colon tras su administración oral, alcanzando su máxima concentración plasmática a las dos horas de la administración (*Katsoulieris, 2016*). Sin embargo, el mecanismo por el cual se absorbe permanece aún desconocido.

Se distribuye rápidamente en sangre, unido a lipoproteínas humanas; y se excreta en orina principalmente como glucurónido o, en menor concentración, como forma libre (*Tan y cols., 2003*)(*Boccio y cols., 2003*).

A su vez se ha demostrado que un 15% de OLE glicosilada administrada en humanos sanos se excreta en orina como hidroxitirosol, principal metabolito, y tirosol (*Vissers y cols., 2002*).

## **II. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LA OLEUROPEÍNA**

Muchos estudios *in vitro e in vivo* han documentado numerosas e importantes actividades farmacológicas de OLE como la antioxidante, antidiabética, antimicrobiana, antivírica, antitumoral, hepatoprotectora, cardioprotectora, neuroprotectora, antienvjecimiento y antiinflamatoria (*Carrera-González y cols., 2013; Fuentes y Palomo, 2014; Rubió y cols., 2014; Sepporta y cols., 2014*).

### **A. Actividad antioxidante**

Una de las propiedades de OLE de mayor interés es su potente actividad antioxidante ante radicales libres (*Cicerale y cols., 2012*), la cual fue atribuida a su habilidad para donar electrones, estabilizando estos radicales libres (*Lee y cols., 2009; Visioli y cols., 2000*). Tanto su capacidad para eliminar radicales libres como su actividad quelante sobre metales, parecen ser las responsables de la habilidad protectora de las membranas frente a la peroxidación lipídica. Esta hipótesis es apoyada por *Czerwisńka y cols. (2012)*, quienes publicaron que este secoiridoide suprime la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (óxido nítrico, peroxinitrito) en sistemas celulares *in vitro*. También, el experimento de *Čabarkapa y cols. (2014)* y *Kyriakopoulou y cols. (2012)*, en leucocitos periféricos humanos y células de carcinoma hepatocelular (HepG2) con daño en el ADN inducido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, confirma esta actividad de OLE.

*In vivo*, utilizando conejos diabéticos inducidos por aloxano (Al-Azzawie y Alhamdani, 2006), ratas alimentadas con dietas ricas en colesterol (Jemai y cols., 2008) y en ratas expuestas a arsénico (Kotyzová y cols., 2011), OLE fue capaz de inducir un incremento en los niveles y actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRx), catalasa (CAT), y un aumento del nivel de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (GHS),  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno y ácido ascórbico.

### **B. Actividad antidiabética**

En los 90, González y cols., usando un modelo animal de diabetes mellitus inducida con aloxano, postularon por primera vez el papel protector e hipoglucemiante de OLE extraída de hojas del olivo (Gonzalez y cols., 1992).

Estudios posteriores mostraron una evidente unión de la acción antidiabética con los efectos antioxidantes del secoiridoide. El tratamiento con OLE de conejos con diabetes inducida por aloxano, mostró efectos hipoglucemiantes significativos comparados con los animales diabéticos control, asociados con el restablecimiento de los niveles de malondialdehído (subproducto derivado del metabolismo de lípidos) y sobretodo, de antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos (Al-Azzawie y Alhamdani, 2006).

### **C. Actividad antimicrobiana y antivírica**

OLE ha mostrado una gran actividad antimicrobiana frente bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus* y *Salmonella enteritidis* (Cicerale y cols., 2012). Además, estudios *in vitro* mostraron actividad contra micoplasmas, incluso frente a las que eran resistentes a tratamientos antibióticos (Furneri y cols., 2002).

Estas propiedades podrían sugerir el uso del compuesto fenólico como un aditivo alimentario y como tratamiento en infecciones humanas del tracto digestivo o respiratorio (Bisignano y cols., 1999).

Su actividad se debe al daño sobre la membrana bacteriana y/o la desorganización de los péptidoglucanos (Caturla y cols., 2005). Sin embargo, el mecanismo molecular por el que actúa se desconoce. Entre los posibles procedimientos se baraja la interferencia en la producción de ciertos aminoácidos necesarios para el crecimiento; o, la estimulación directa de la fagocitosis

como respuesta del sistema inmune frente a todo tipo de microorganismos (*Saija y Uccella, 2001*).

En cuanto a la actividad antiviral, se ha demostrado su eficacia sobre células de carcinoma hepatocelular (HepG2 2.2.15) infectadas frente septicemia hemorrágica viral (*Micol y cols., 2005*); virus de la hepatitis B (VHB) (*Zhao y cols., 2009*) y virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (*Lee-Huang y cols., 2007*). En este caso su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la integrasa vírica y alteración de la envoltura vírica.

#### **D. Actividad antitumoral**

Varios estudios han confirmado la actividad anticancerosa/antitumoral de OLE y han dilucidado los posibles mecanismos en la última década. Hamdi y Castellon han validado, tanto en estudios *in vivo* e *in vitro*, que el secoiridoide inhibe el crecimiento celular, movilidad celular, capacidad de invasión e induce un efecto proapoptótico en líneas celulares cancerosas como glioblastoma (LN-18), eritroleucemia (TF-1a), células de adenocarcinoma renal (786-O), carcinoma metastásico de derrame pleural (T-47D), adenocarcinoma de glándula mamaria o derrame pleural (MCF-7), melanoma maligno de piel o nodo linfático (RPMI-7951) y adenocarcinoma colorectal o región metastásica supraclavicular (LoVo) (*Hamdi y Castellon, 2005*).

En base a esto, estudios experimentales en animales han determinado que el tratamiento con OLE previene el desarrollo de cáncer de piel (*Kimura y Sumiyoshi, 2009*), tejidos blandos (*Hamdi y Castellon, 2005*) y cáncer de pulmón (*Sepporta y cols., 2014*).

Además de actuar directamente sobre el tumor, OLE puede desempeñar una función antiangiogénica, inhibiendo la proliferación del endotelio, produciendo así una reducción del número de vasos sanguíneos. Esto fue demostrado por estudios en membrana corioalantoidea de pollo y en modelos de ratón (*Hamdi y cols., 2003*).

Por todo esto, Hamdi y Castellon se refieren este secoiridoide como una nueva clase de agente anticanceroso, que actúa en la progresión del tumor, activa sistemas reparadores de ADN e inhibe de la angiogénesis.

### **E. Actividad hepatoprotectora**

Se ha observado en diversos estudios un efecto hepatoprotector, demostrando que el tratamiento con OLE disminuye significativamente las transaminasas en plasma, especialmente la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en ratones intoxicados con tetracloruro de carbono. Estos resultados se asocian con una clara regresión de áreas necróticas y un marcado aumento de la actividad SOD y la concentración de GHS. La inmunoquímica también reveló que OLE atenúa de forma dosis-dependiente ERO/ERN y suprime la inflamación (*Domitrovic ' y cols., 2012*)(*Kim y cols., 2014*).

Además, en hígado de rata tratado con hidroxitolueno butilado, el secoiridoide fue capaz de reducir los niveles de urea nitrogenada en sangre, transaminasa glutámico pirúvica en suero (sGPT), transaminasa glutámico oxalacética (GOT), fosfatasa alcalina (FA), lactato deshidrogenasa (LDH), triacilglicéridos (TG) y creatinina (*Lin y cols., 2007*); además de minimizar la generación de fibrosis y necrosis (*Fang y cols., 2008*)(*Kim y cols., 2014*).

Por tanto, estos estudios validan el potencial hepatoprotector de OLE, proponiéndola como un nuevo agente seguro y protector a este nivel (*Hassen y cols., 2015*).

### **F. Actividad cardioprotectora**

La actividad cardioprotectora de OLE en modelos de experimentación *in vivo* ha sido demostrada en diversos estudios. En ratas con cardiotoxicidad aguda inducida por doxorubicina (DXR), se realizaron inyecciones intravenosas de OLE, produciéndose un descenso en el nivel de creatinquinasa (CK), creatinquinasa -MB (CK-MB), LDH, AST y ALT. A su vez, la inmunoquímica reveló una reducción en el contenido de carbonilos, nitrotirosinas, iNOS y peroxidación lipídica en tejido miocárdico; y en histopatología, la reducción de la vascularización citoplasmática en cardiomiocitos reveló su efecto protector frente a la cardiotoxicidad inducida por DXR (*Andreadou y cols., 2007*).

El pretratamiento con el compuesto fenólico en ratones con infarto agudo de miocardio (IAM), mostró un efecto protector frente al IAM, previniendo el desarrollo de un fallo cardiaco secundario al mismo, al descenso en los niveles séricos de CK-MB, troponina I, LDH (*Janahmadi y cols., 2014*).

### **G. Actividad neuroprotectora**

Tanto OLE como los polifenoles del olivo exhiben un efecto neuroprotector significativo en modelos experimentales y sugiriéndose una nueva estrategia terapéutica potencial en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer.

En un ensayo en ratas OLE mostró un número mayor de neuronas en la sustancia negra, respecto a las ratas sin tratar. De hecho, las investigaciones con GC-MS describieron al secoiridoide como una molécula de unión no covalente al péptido  $\beta$ -amiloide (1-40), contrarrestando la producción y generación de la placa amiloide (*Bazoti y cols., 2006*). En adición, el secoiridoide fue capaz de inhibir la proteína Tau, que forma agregados amieloides característicos del Alzheimer, en ratones (*Daccache y cols., 2011*). Estos resultados avalan a esta molécula como una novedosa diana farmacológica en la prevención o atenuación del daño o pérdida de neuronas dopaminérgicas en patologías neurodegenerativas.

### **H. Actividad antienviejeamiento**

Los FS sufren la senescencia por la influencia de factores genéticos y ambientales. La función fisiológica del proteosoma, una proteasa no liposomal multicatalítica, se deteriora con el paso del tiempo, de forma más acentuada en fibroblastos durante la senescencia. Katsiki y cols., demostraron que OLE mejora la actividad de los proteosomas *in vitro*, de forma más eficaz que otros quimioactivadores conocidos, posiblemente mediante cambios en la conformación de éstos. Además, el tratamiento continuo de fibroblastos embrionarios en fase temprana con OLE, disminuyó los niveles intracelulares de ERO, reduciendo la cantidad de proteínas oxidadas mediante el incremento de la tasa de degradación mediada por proteosomas y, manteniéndose la función del proteosoma durante la senescencia replicativa. De forma importante, los cultivos celulares tratados con OLE exhibieron una demora en la aparición de la senescencia, y su tiempo de vida se extendió aproximadamente un 15% (*Katsiki y cols., 2007*).

### **I. Actividad antiinflamatoria**

La inflamación es una respuesta fundamental inducida por el sistema inmune para proteger el organismo contra patógenos, daño tisular y estrés.

Una amplia variedad de estudios han demostrado la evidencia de la contribución de citocinas en la inflamación y el tejido dañado. Las citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  y el factor

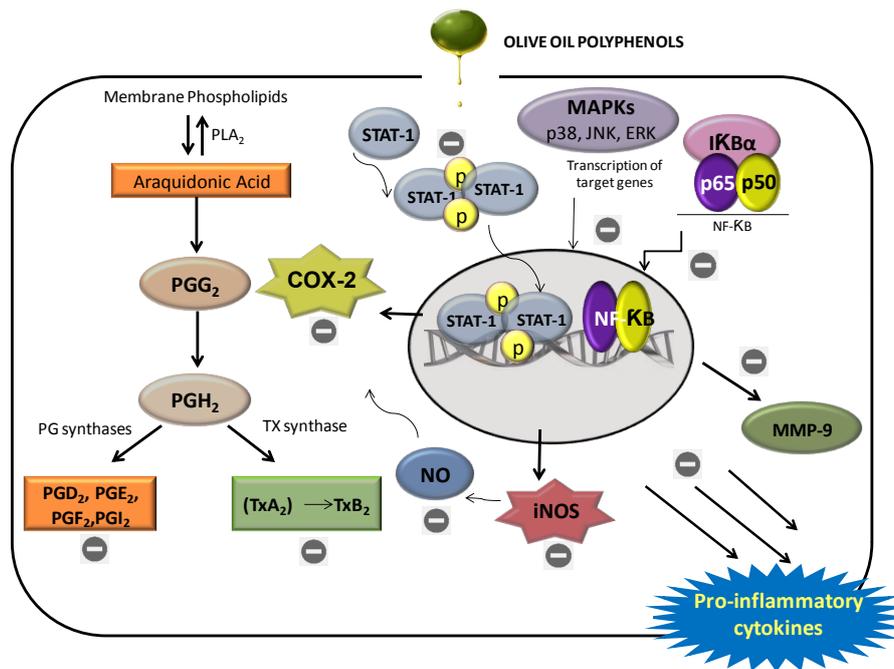
de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) se activan por vías de señalización implicadas en la inflamación, entre las que se incluyen los factores nucleares de transcripción NF- $\kappa$ B y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK): c-Jun NH2 –terminal cinasa (JNK), p38 cinasa y cinasa regulada por señal extracelular (ERK), fundamentalmente (Aupperle y cols., 2001; McInnes y Schett, 2011).

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B juega un papel fundamental en la función biológica y en la patogenia de desórdenes inflamatorios y autoinmunes (*Sun y cols., 2013*). Es un factor transcripcional regulador de la expresión de numerosos genes que codifican moléculas involucradas en el proceso inflamatorio, entre los que podemos incluir ciclooxygenasa- 2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), prostaglandina E sintasa-1 microsomal (m-PGES-1) y ciertas citocinas proinflamatorias entre las cuales se incluyen TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 e IL-23 (*Cho, 2006; Neurath y cols., 1998*).

El NF- $\kappa$ B está regulado por la vía de las MAPK, que en su estado inactivo (no fosforilado) residen en el citoplasma, pero cuando se activan son fosforiladas y a su vez fosforilan en serinas y treoninas a los factores de transcripción. Estos últimos promueven la transcripción de genes responsables de la activación de las células inflamatorias e inmunocompetentes y la expresión de proteínas mediadoras clave con el consiguiente efecto biológico (*Ghosh y cols., 2003*).

La vía de las MAPK parece jugar un papel importante en el control de la inflamación (*Wei y Feng, 2010*). Las vías de la cinasa N- terminal p38 y JNK se activan por el estrés celular (*Kyriakis y Avruch, 2001*). La MAPK p38 también está involucrada en el control post-transcripcional de la expresión génica mediante la estabilización de los ARN mensajeros (ARNm). De igual manera, se ha descrito que puede regular la producción de citocinas en respuesta a una variedad de estímulos y la sobreexpresión de COX-2 (*Hommes y cols., 2002*) (*Figura 4*).

El efecto antiinflamatorio de OLE esta mediado por su capacidad de inhibir la actividad pro-inflamatoria de ERO libres producidas por enzimas, como la COX-2 e iNOS y modular diferentes vías de señalización: inhibición del NF- $\kappa$ B y su translocación al núcleo, IL-1 $\beta$ , MAPK, mediante la alteración de los procesos redox en células inmunes sensibles (*Cárdeno y cols., 2013*).



**Figura 4:** Esquema del mecanismo antiinflamatorio de compuestos fenólicos (Cárdeno y cols., 2013).

A continuación, se incluyen los estudios *in vitro* e *in vivo* más significativos que avalan la actividad antiinflamatoria de OLE.

- Estudios *in vitro* con OLE

Dell’Agli y cols., investigaron el efecto del aglicón OLE, extraído de aceite de oliva virgen extra (AOVE), en la expresión de metaloproteasas de la matriz-9 (MMP-9) en células de leucemia aguda monocítica (THP-1), el cual previene la estimulación de la expresión de dicha enzima en células THP-1 estimuladas con TNF- $\alpha$ , debido a la alteración en la señalización de NF- $\kappa$ B. Esto evidenció el mecanismo por el que el AOVE reducía la inflamación asociada a enfermedades (Dell’Agli y cols., 2010).

Otros estudios, en la línea celular RAW-264.7 (macrófagos monocíticos inducidos por el virus de leucemia murina de Abselon), estimulada con lipopolisacáridos (LPS) pusieron de manifiesto que el compuesto fenólico inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$  e IL-6 y la generación de óxido nítrico (NO), mediante la supresión de la expresión de enzimas pro-inflamatorias, iNOS y COX-2. Así mismo, se observó una disminución de la activación de las MAPK (ERK1/2 y JNK), las cuales se asocian al proceso de inflamación (Ryu y cols., 2015).

Además, se demostró que OLE reducía el efecto de la mieloperoxidasa (MPO) (enzima que cataliza la formación de ácido hipocloroso) en neutrófilos humanos de forma concentración-dependiente (Czerwisńska y cols., 2012).

- Estudios *in vivo* con OLE

La eficacia de OLE en modelos *in vivo* de inflamación ha sido probada con gran extensión. Este secoiridoide también ha mostrado unos buenos beneficios preventivos a nivel gastrointestinal, en el modelo de úlcera gástrica inducida con etanol, disminuyendo el índice de ulceración e incrementando la actividad de enzimas con actividad antioxidante en ratas, el contenido de GHS, SOD y CAT en tejido gástrico (Alirezai y cols., 2012).

De la misma forma, se ha reportado que OLE atenúa la extensión y severidad en colitis aguda inducida con DSS a la vez que reduce la infiltración de neutrófilos, la producción de NO, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , los niveles expresión génica de proteína iNOS, COX-2, MMP-9 y la translocación al núcleo subunidad p65 de NF-kB en tejido de colón (Giner y cols., 2011, 2013).

Son conocidos los efectos antiinflamatorios del aglicón OLE en ratones con artritis colágeno-inducida (CIA). Por ejemplo, el aglicón OLE atenúa el desarrollo de la artritis causada por inyección de colágeno tipo II en ratones, mejorando el estado histológico tanto en la articulación como en la pata, el grado de daño oxidativo y nitrosativo y los niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias (Impellizzeri y cols., 2011). Asimismo, el tratamiento con aglicón OLE disminuyó significativamente el daño histológico, la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), la expresión de iNOs, la infiltración de neutrófilos, la formación de nitrotirosina y los niveles de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), a través de la inhibición de la vía de señalización NF-kB e impidiendo la degradación de la proteína inhibitoria IKB- $\alpha$ . Del mismo modo, el aglicón OLE fue capaz de reducir actividad de la proteinquinasa A (PKA), y estimuló la apoptosis, en el mismo modelo experimental en ratones (Impellizzeri y cols., 2012) (Tabla 2).

**Tabla 2:** Estudios *in vivo* e *in vitro* de la actividad antiinflamatoria de la oleuropeína.

Referencia	Polifenol	Método de experimentación	Mecanismos de acción	Dosis usadas
<i>In Vitro</i>				
<i>Dell'Agli y cols., 2010</i>	Aglicón OLE	Células THP-1 TNF- $\alpha$ estimuladas	Inhibición de la expresión anómala de MMP-9 mediante la señal NF-kB	2.5-50 $\mu$ M
<i>Ryu y cols., 2015</i>	OLE	RAW 264.7 LPS estimuladas	Supresión de la producción de iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6 y MAPK	100, 200, 300 $\mu$ M
<i>Czerwisńska y cols., 2012</i>	OLE	Neutrófilos humanos	Reducción de MPO	5-50 $\mu$ M
<i>In Vivo</i>				
<i>Alirezaei y cols., 2012</i>	OLE	Úlcera gástrica inducida con etanol en ratas	Elevación de la actividad de enzimas antioxidantes, aumento del índice de úlceras inhibidas, el contenido de GSH, SOD y CAT en el tejido gástrico	12 y 18 mg/kg
<i>Giner y cols., 2011</i>	OLE	Colitis aguda inducida con DSS	Reducción de la infiltración de neutrófilos, la producción de NO, IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF- $\alpha$ ; la expresión de iNOS, COX-2, y MMP-9; y la translocación al núcleo de la subunidad p65 NF-kB	2% OL en dieta
<i>Impellizzeri y cols., 2011</i> <i>Impellizzeri y cols. 2012</i>	Aglicon OLE	Enfermedad de la médula espinal en ratón Artritis (colágeno tipo II) en ratón	Disminución del daño histológicamente, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ , iNOS, infiltración de neutrófilos, peroxidación lipídica, nitrotirosina, formación de PKA, niveles de GDNF, inhibición de la expresión de NF-kB, degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ e inducción de apoptosis	20, 40, 100 $\mu$ g/kg

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades reumáticas son una de las causas más frecuentes de incapacidad en el mundo. En España estas patologías están relacionadas con el 50,7% de las incapacidades laborales y son la principal causa de bajas laborales permanentes. Especial relevancia tiene la AR, por sus repercusiones sobre la calidad de vida de los pacientes y el deterioro progresivo que produce esta enfermedad.

AR es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, crónica 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. Los FS juegan un papel fundamental en la persistencia de la inflamación crónica y en el daño articular, siendo unas de las poblaciones celulares más abundantes en el *pannus*. Actúan directamente degradando la matriz del cartílago, e indirectamente sobre el hueso como inductores de la diferenciación y activación de los osteoclastos (Fauci, 2010).

El abordaje terapéutico de la AR es multidisciplinar, dirigida a la supresión inespecífica del proceso inflamatorio, con el objetivo de mitigar los síntomas y signos de la enfermedad, englobando tratamiento fisioterápico y farmacológico. No obstante, dado las limitaciones en eficacia y seguridad de la farmacoterapia actual antirreumática, se ha generado en los últimos años, un auge en el uso de otras estrategias terapéuticas, entre las que destaca la terapia nutricional y el uso de nutraceuticos (Fauci, 2010).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto el potencial antirreumático del AOVE, base de nuestra dieta mediterránea, de su fracción polifenólica y de un uno de sus fenoles derivado del hidroxitirosol (acetato de hidroxitirosol) (Rosillo y cols., 2014, 2015, 2016) en un modelo *in vivo* de artritis inducida por colágeno en ratones DBA/1. No obstante, no existen hasta la fecha, estudios experimentales *in vitro* en células humanas que validen el potencial antirreumático de los secoiridoides, y en particular de OLE así como los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados.

En base a la actividad antiinflamatoria de OLE puesta de manifiesto en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, se plantea llevar a cabo un desarrollo experimental cuyo objetivo principal es llegar al conocimiento del funcionalismo de este secoiridoide en una línea celular validada para el estudio de la AR de FS humanos (SW982) y dilucidar los posibles mecanismos moleculares, así como, las vías de señalización involucradas.

# METODOLOGÍA

## 1. Oleuropeína: Extracción y caracterización química

Para la extracción de OLE a partir de hojas de olivo, se siguió el método descrito por (Stamatopoulos y cols., 2014). Posteriormente, el extracto se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Diclorometano-metanol 10:1--->5:1) obteniéndose OLE como un sólido débilmente amarillo que fue analizado posteriormente por RMN de alta resolución (Servicios Generales de la Universidad de Sevilla, Citius, que cuenta con equipos Bruker Advance III 500 y 700 MHz).

## 2. Cultivo celular

La línea celular de FS humanos SW982 se obtuvo de American Tissue Culture Collection (ATTC®, Number HTB-93 (Manassas, VA, EE.UU.)). Las células SW982 se cultivaron en flasks T-150 (Nunc™, Barcelona, España), con Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 2 mM de L-glutamina, suero fetal bovino al 10% (SFB) y penicilina-estreptomina al 1%, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

## 3. Viabilidad celular

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) e incubadas en presencia o ausencia de OLE durante 24 h. Transcurrido este tiempo de exposición, el efecto del compuesto en la viabilidad celular fue analizado mediante el ensayo de la sulforrodamina B (SRB) (Skehan y cols., 1990). Después del periodo de incubación, las células adherentes del cultivo fueron fijadas a la placa, añadiendo 50 mL de ácido tricloroacético (50% p/v) frío (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) e incubadas durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó, y las placas se lavaron cinco veces con agua destilada y se secaron al aire. Se añadió a cada pocillo 50 µL de solución SRB (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) (0.4% p/v) en ácido acético al 1% (Panreac®, Barcelona, España) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó la solución SRB de las placas y posteriormente, fueron lavadas cinco veces con ácido acético al 1%. Seguidamente, se secaron las placas y se añadieron 100 µL por pocillo de Tris base (100 mmol/L, pH 10.5) (Sigma-Aldrich®, Madrid, España), leyendo, a continuación, la absorbancia a 510 nm utilizando un lector de placas (BioRad®, Madrid, España). Finalmente, la viabilidad de las células se calculó como el porcentaje de absorbancia comparado con el obtenido en las células sin tratar, a los que se les asignó el valor 100%.

#### **4. Determinación de citocinas: IL-6 y TNF- $\alpha$**

Las células SW982 se sembraron en placas de 24 pocillos ( $2.5 \times 10^5$  células/pocillo). 48 h después de sembrarlas, se incubaron en presencia o ausencia de OLE (50 y 100  $\mu$ M) durante 24 h en DMEM con 10% (v/v) de SFB en una atmósfera del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Seguidamente, se estimularon con IL-1 $\beta$  (5ng/mL) y se incubaron durante 24 h. Los sobrenadantes del cultivo fueron recogidos y conservados a -80 °C.

Los niveles de IL-6 y de TNF- $\alpha$  se han valorado mediante un enzimoimmunoanálisis (ELISA) tipo competitivo usando un kit comercial de eBioscience® (San Diego, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones indicadas en los mismos. El método estuvo basado en la competición entre la IL-6 y TNF- $\alpha$  de la muestra, y un estándar por la unión a un anticuerpo (Ac) policlonal anti-IL-6 o anti-TNF- $\alpha$  que revestía la placa. Tras la incubación, se añadió un Ac monoclonal que se unió al anterior, y esta ligado a la enzima catalasa (enzima de detección). Tras un nuevo lavado, se adicionó el sustrato y la reacción enzimática produjo un color cuya intensidad se midió a 450 nm en lector de placa Labsystems Multiskan Ex. (Helsinki, Finlandia) siendo directamente proporcional a la cantidad de IL-6 o de TNF- $\alpha$  de las muestras.

#### **5. Determinación de la expresión proteica**

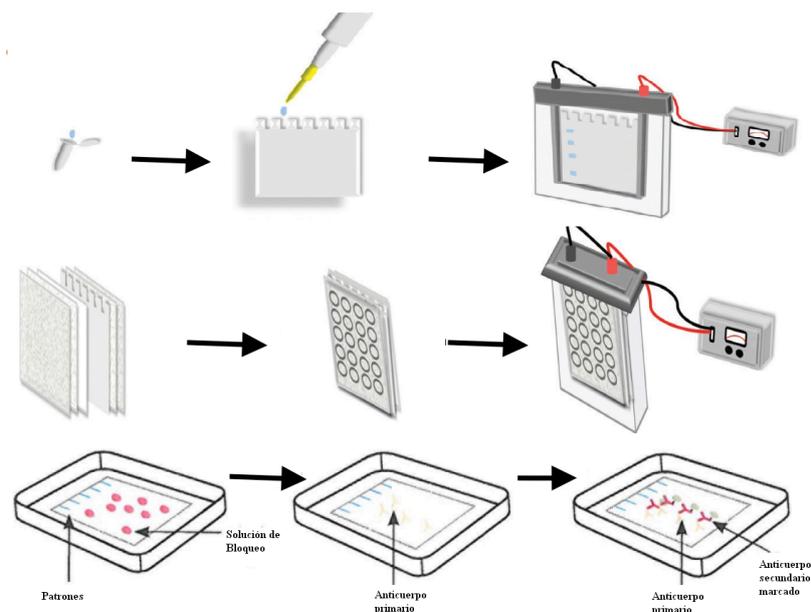
Con este estudio, se determinaron los cambios en la expresión de determinadas proteínas presentes en las células SW982 mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico (SDS)/poliacrilamida y, posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa, y detección mediante una reacción de quimioluminiscencia empleando anticuerpos específicos de la proteína de interés (*Western blot*)(Figura 5).

Las células se incubaron en presencia o ausencia de OLE (50 y 100  $\mu$ M) durante 24 h y se estimularon con IL-1 $\beta$  (5ng/mL) a distintos tiempos, dependiendo de la proteína estudiada (30 min o 24 h). Pasado el tiempo de estímulo, las células se lisaron utilizando un tampón, que contenía un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa, y se procesaron según describen Sánchez-Hidalgo y cols. (2005) para aislar las proteínas.

La concentración proteica de cada muestra se determinó de acuerdo al método colorimétrico descrito por Bradford. En este ensayo, 5  $\mu$ l de cada una de las muestras a determinar fueron añadidos y mezclados con el reactivo de *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad®), el cual alcanza una absorbancia máxima a 595 nm, permitiendo su posterior lectura en un espectrofotómetro.

Las muestras se desnaturalizaron por calor (95°C, 10 min) en presencia del tampón de carga (Laemly 1x), conteniendo agentes desnaturalizantes como el  $\beta$ -mercaptoetanol y SDS (recubre las cargas netas negativas haciendo que la migración sea proporcional a la carga y tamaño de la molécula). La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10 %, cargando las muestras, desnaturalizadas y con igual cantidad de proteína (25  $\mu$ g), en los pocillos formados en el gel de concentración junto al marcador de peso molecular (Bio-Rad Laboratories®, California, EE.UU.). La electroforesis tuvo lugar en el sistema Mini Protean-II (Bio-Rad Laboratorios®, CA, EE.UU.) en presencia de tampón de electroforesis (1x). Inicialmente se aplicó una corriente de 70 voltios (V) y se aumentó paulatinamente hasta alcanzar los 150 V una vez que el frente de migración alcanzó el gel de separación.

En el siguiente paso, las proteínas se transfirieron electroforéticamente desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, para ello se empleó el sistema de transferencia húmeda.



**Figura 5.** Representación esquemática de la técnica de Western Blotting.

Seguidamente se saturó la membrana con una solución de bloqueo (para evitar uniones inespecíficas del Ac) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se incubaron las membranas con los Ac primarios específicos para las proteínas a determinar diluidos en tampón de bloqueo durante al menos 1 h a temperatura ambiente y después toda la noche a 4°C en un agitador rotatorio (Movil Rod, Selecta®).

Cada membrana se lavó con las soluciones C, B, PBS 1X consecutivamente, durante 15 minutos. Seguidamente se incubaron con Ac secundario correspondiente durante 1-2 h a temperatura ambiente (*Tabla 3*).

**Tabla 3.** Anticuerpos usados en el estudio de las proteínas COX-2, m-PGES-1, pJNK y pp38.

Anticuerpo primario			Dilución	Anticuerpo secundario		Dilución
Anti-COX-2	conejo	(Cayman Chemical®, Michigan, EE.UU.)	1:1000	Anti-rabbit (Cayman Chemical®, Michigan, EE.UU.)		1:50000
Anti-m-PGES-1	rata	(Cayman Chemical, EE.UU.)	1:200	Anti-rabbit (Cayman Chemical®, Michigan, EE.UU.)		1:50000
Anti-pJNK	ratón	(Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, EE.UU.)	1:200	Antimouse (Dako®, Atlanta, GA, EE.UU.)		1:2000
Anti-JNK	rata	(Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, EE.UU.)	1:200	Anti-rabbit (Cayman Chemical®, Michigan, EE.UU.)		1:50000
Anti-pp38	ratón	(Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, EE.UU.)	1:200	Antimouse (Dako®, Atlanta, GA, EE.UU.)		1:2000
Anti-P38	rata	(Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, EE.UU.)	1:200	Anti-rabbit (Cayman Chemical®, Michigan, EE.UU.)		1:50000

Tras los lavados del Ac secundario, la detección de los inmunocomplejos marcados con peróxidos se realizó mediante la reacción de quimioluminiscencia. Sobre las membranas se añadieron los reactivos del *kit* de Supersignal® (Pierce®, Rockford, IL, EE.UU.), luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1) (la enzima peroxidasa cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocando una reacción quimioluminiscente). Por último, para valorar esta señal de quimioluminiscencia, se introdujeron las membranas en el transluminador LAS-3000 Imaging System de Fujifilm Image Reader (Stamford®, CT, EE.UU.), dispositivo que nos permitió obtener

una imagen de la señal. Los datos densitométricos obtenidos fueron estudiados siguiendo una normalización con el control  $\beta$ -actina, y las señales fueron analizadas y cuantificadas mediante el programa informático ImageJ software (Bethesda<sup>®</sup>, MD, EE.UU.).

## **6. Evaluación estadística de los resultados**

Todos los valores que aparecen en las figuras y el texto se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar (SEM), y la significación estadística de las diferencias en cada parámetro entre los distintos grupos fue evaluada por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), utilizando el test de comparación múltiple de Tukey. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Los datos fueron evaluados con Graph Pad Prism<sup>®</sup> version 5.01 software (San Diego, CA, EE.UU.).

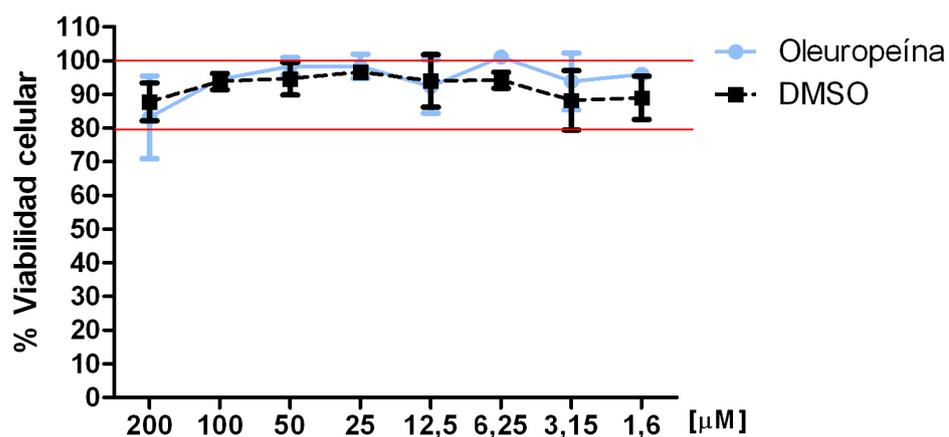
En los experimentos que implican densitometría, los valores indicados son representativos de al menos tres experimentos distintos realizados en días diferentes.

# RESULTADOS

## 1. Efectos de la oleuropeína en la viabilidad celular

Los efectos de OLE sobre la la viabilidad de los fibroblastos sinoviales humanos (SW982), fue realizado mediante la técnica de SRB. El SRB es un método eficiente para evaluar la toxicidad de compuestos sobre células adherentes, basado en la medición del contenido de proteína celular.

Tras 24 h, los resultados obtenidos demostraron que los tratamientos con el secoiridoide a las concentraciones ensayadas [6,25-100  $\mu\text{M}$ ] no resultaron tóxicos, ya que, las células SW982 mostraron una viabilidad  $>90\%$  (Figura 5).



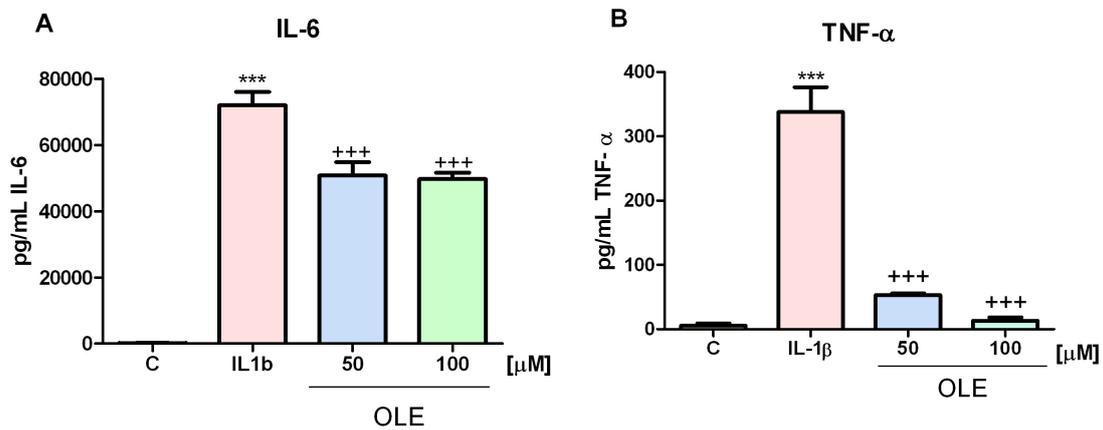
**Figura 5. Efecto de OLE en viabilidad celular.** Las concentraciones usadas en este estudio no afectan a la viabilidad de las células SW982. Las células fueron tratadas con OLE [1,6-200  $\mu\text{M}$ ] durante 24 h. La supervivencia celular fue expresada en porcentaje de absorbancia comparado con el contenido proteico en células control (células sin estimular).

## 2. Efectos de la oleuropeína en la producción de citocinas pro-inflamatorias

### Interleucina-6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) en células SW982

Los resultados correspondientes a la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  pusieron de manifiesto un incremento muy significativo de los niveles de ambas citocinas proinflamatorias tras la estimulación con IL-1 $\beta$  en relación con los resultados obtenidos en las células SW982 no estimuladas ( $*** p < 0.001$  vs. células control no estimuladas).

Por el contrario, el tratamiento con las concentraciones ensayadas de OLE (50 y 100  $\mu$ M) indujo una disminución estadísticamente significativa de ambas citocinas con respecto al grupo de células control estimuladas con IL-1 $\beta$  ( $+++ p < 0.001$  vs. células control estimuladas con IL-1 $\beta$ ) (Figura 6 A y B).

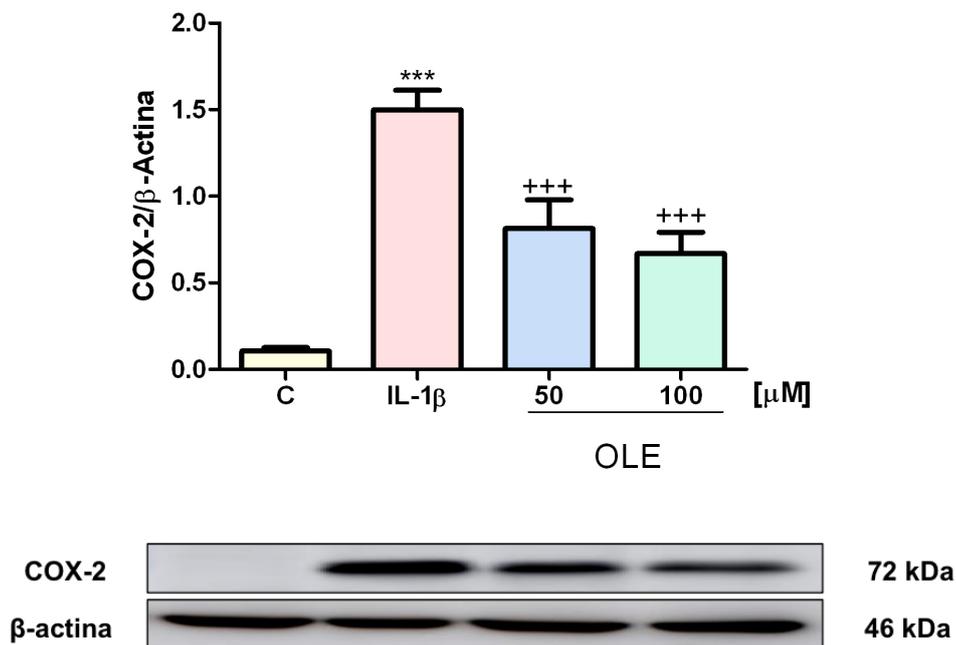


**Figura 6. Efecto inhibitor de OLE en la producción de IL-6 (A) y TNF- $\alpha$  (B) en células SW982.**

Las células SW982 fueron tratadas durante 24 h con OLE (50 y 100  $\mu$ M) y estimuladas con IL-1 $\beta$  (5ng/mL). Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM (n=3).  $***p < 0.001$  vs. células control no estimuladas;  $+++p < 0.001$  vs. células control estimuladas con IL-1 $\beta$ .

### 3. Efectos de la oleuropeína sobre la expresión de Ciclooxygena-2 (COX-2) y Prostaglandina E Sintasa 1 microsomal (m-PGES-1) en células SW982

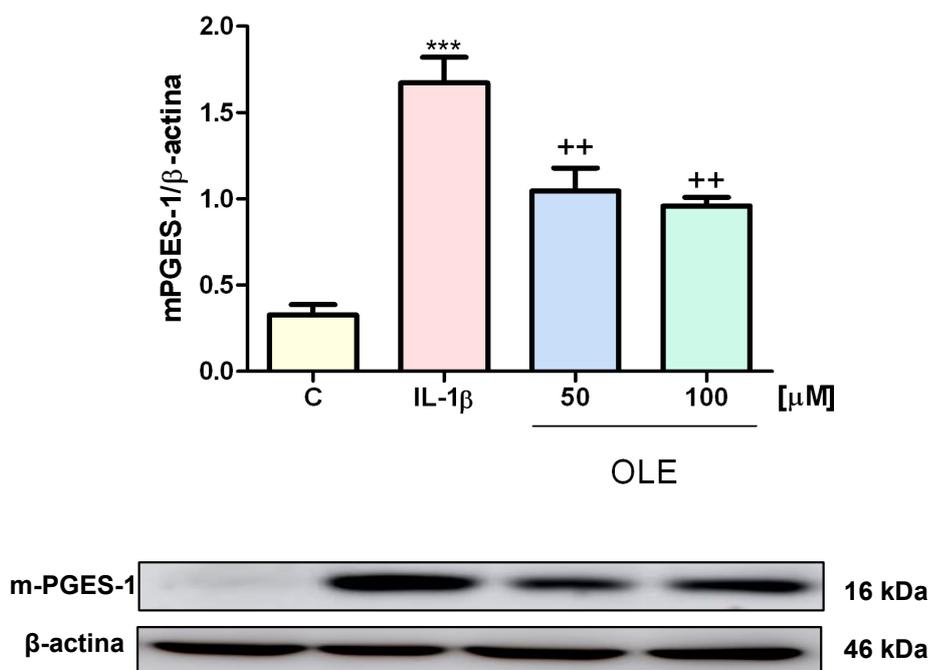
Se estudiaron los posibles efectos de OLE sobre la expresión proteica de la COX-2. Tras estimular durante 24 h las células SW982 con IL-1 $\beta$ , se observó un incremento significativo en la expresión proteica de COX-2 ( $*** p < 0.001$  vs. células control no estimuladas). Sin embargo, el tratamiento con OLE (50 y 100  $\mu$ M) disminuyó la sobreexpresión de dicha proteína pro-inflamatoria en las células SW982 tratadas respecto a las células control estimuladas ( $+++ p < 0.001$  vs. células control estimuladas con IL-1 $\beta$ )(Figura 7).



**Figura 7.** Expresión proteica de COX-2 tras el tratamiento con OLE en células SW982. Las células fueron no tratadas o tratadas con OLE (50 y 100  $\mu$ M) durante 24 h en presencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/mL). Las células control no estimuladas fueron incubadas en ausencia de IL-1 $\beta$ . El gráfico representa la intensidad de la banda. La  $\beta$ -actina sirvió como control para la normalización de la igualdad de carga. Los datos mostrados son medias  $\pm$  SEM (n=4).  $***p < 0.001$  vs. células control sin estimular;  $+++p < 0.001$  vs. células control estimuladas con IL-1 $\beta$ .

La m-PGES-1 es una enzima, que induce la formación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), un importante eicosanoide que contribuye a la patogénesis de la AR actuando como mediador de la inflamación y el dolor, y promoviendo la destrucción del hueso (Westman y cols., 2004). En pacientes con AR, la expresión de m-PGES-1 está marcadamente aumentada en el tejido sinovial, sobretudo en células inflamatorias (Samuelsson y cols., 2007).

La expresión de m-PGES-1 (Figura 8), fue incrementada en FS tras la estimulación con IL-1 $\beta$  con respecto a los que no fueron estimulados con la citocina (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. células control no estimuladas). No obstante, el tratamiento con ambas dosis de OLE causó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de dicha proteína respecto a las células control tras la estimulación con IL-1 $\beta$  (++)  $p < 0.01$  vs. células control estimuladas con IL-1 $\beta$ ).



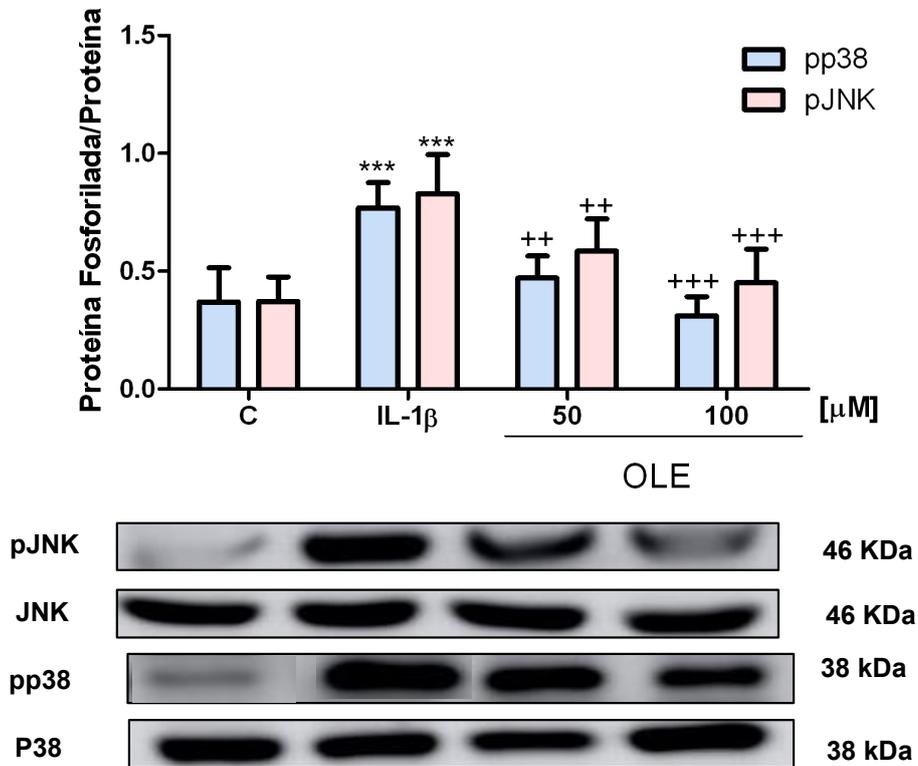
**Figura 8. Expresión proteica de m-PGES-1 tras el tratamiento con OLE en células SW982.** Las células fueron no tratadas o tratadas con OLE (50 y 100  $\mu$ M) durante 24 h en presencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/mL). Las células control no estimuladas fueron incubadas en ausencia de IL-1 $\beta$ . El gráfico representa la intensidad de la banda. La  $\beta$ -actina sirvió como control para la normalización de la igualdad de carga. Los datos mostrados son medias  $\pm$  SEM (n=4). \*\*\* $p < 0.001$  vs. células control sin estimular; ++ $p < 0.01$  células control estimuladas con IL-1 $\beta$ .

#### 4. Estudio de vías de señalización

Para explorar el posible mecanismo molecular de la actividad farmacológica de OLE en FS humanos, determinamos sus efectos potenciales en la vía de señalización de las MAPK: JNK y p38, tras 30 minutos de estímulo con IL-1 $\beta$ .

Nuestros resultados pusieron de manifiesto que los FS de la línea SW982 estimulados con IL-1 $\beta$ , inducían un aumento significativo de la fosforilación de las proteínas JNK y p38, en comparación con los fibroblastos control no estimulados. Por el contrario, el tratamiento con

OLE (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) redujo significativamente la fosforilación de ambas MAPK: JNK y p38, tras 30 minutos de estímulo con IL-1 $\beta$  ( $++ p < 0.01$  y  $+++ p < 0.001$  vs. células control estimuladas con IL-1 $\beta$ ) (Figura 9).



**Figura 9. Expresión proteica de las proteínas MAPK: pp38 y pJNK.** Las células fueron tratadas con OLE (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h y estimuladas con IL-1 $\beta$  (5 ng/mL) durante 30 minutos. Las células control no estimuladas se incubaron en ausencia de IL-1 $\beta$ . El gráfico muestra la intensidad de la banda. El análisis densitométrico se realizó tras la normalización con los genes de control (JNK y p38) para la igualdad de carga. Los datos mostrados son medias  $\pm$  SEM (n=6). \*\*\* $p < 0.001$  vs. células control sin estimuladas; ++ $p < 0.01$  y +++ $p < 0.001$  vs. células control estimuladas con IL-1 $\beta$ .

## DISCUSIÓN

Los FS desempeñan una función relevante en la patogenia de la AR. En la membrana sinovial reumatoide, los FS aumentan en número y muestran un fenotipo alterado. Este tipo de células producen citocinas, que junto con la producción de anticuerpos e inmunocomplejos, mantienen la inflamación crónica y destruyen el tejido, debido sobretodo a la sobreexpresión local de mediadores inflamatorios, como IL-6, entre otros (*Izquierdo y Pablos, 2013*).

Son varios los estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación con distintos compuesto fenólicos en modelos *in vivo* e *in vitro* de AR (*Rosillo y cols., 2014, 2015, 2016*). Sin embargo, hasta la fecha, no se conoce el potencial antirreumático de OLE en los fibroblastos sinoviales humanos.

Entre las principales citocinas pro-inflamatorias implicadas en la patogénesis de AR se encuentran: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Principalmente, la IL-6 se encuentra en células sinoviales y macrófagos promoviendo la degradación del cartílago y la activación de osteoclastos (*Baillet y cols., 2015*). Nuestro estudio demostró como la estimulación con IL-1 $\beta$ , producía un aumento en la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en las células SW982, mientras que el pretratamiento con OLE disminuyó de forma significativa los niveles de ambas citocinas.

Así mismo, la COX-2, isoforma inducible de COX, es una enzima clave que cataliza la biosíntesis de PG a partir de ácido araquidónico, y a su vez, de m-PGES-1, y juega un papel clave en la respuesta inflamatoria. Nuestros resultados pusieron de manifiesto como la expresión proteica de ambas enzimas (COX-2 y m-PGES-1) aumentaba de forma significativa en células SW982 estimuladas por IL-1 $\beta$ ; no obstante, el tratamiento con OLE indujo un descenso considerable de la expresión de estas enzimas inflamatorias.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios, en los que se demuestra como OLE es capaz de reducir la repuesta inflamatoria mediante una disminución en en los niveles de COX-2, m-PGES-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , entre otros (*Ryu y cols., 2015; Impellizzeri y cols., 2011; Corona y cols., 2007*).

Entre las vías de señalización implicadas en la AR se encuentra la vía de las MAPK (*Smolen y Steiner, 2003*). Las MAPK activadas, ERK, JNK y p38 se localizan en el tejido sinovial y pueden ser estimuladas por citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  (*Schett y cols., 2000*). Del mismo modo, en nuestro trabajo pudimos demostrar como cuando estas células son tratadas con OLE se reducía la fosforilación de ambas MAPK: JNK y p38, datos coincidentes con los obtenidos

por nuestro grupo de investigación en estudios llevados a cabo con otros compuestos fenólicos en modelos murinos inducidos de artritis (*Rosillo y cols., 2015*), donde se puso de manifiesto el efecto antirreumático de estos compuestos fenólicos mediante la drástica disminución de la activación de las MAPK.

En resumen, los resultados de este Trabajo Fin de Grado ponen de manifiesto un marcado efecto antiinflamatorio de OLE sobre fibroblastos sinoviales humanos (SW982), caracterizado por una disminución en los niveles de citocinas pro-inflamatorias: IL-6 y TNF- $\alpha$ . Entre los distintos mecanismos de acción posiblemente implicados figuran el descenso de la expresión de la enzima inducible COX-2, y por tanto, de m-PGES-1, a través de la inhibición de la vía de señalización de MAPK.

## CONCLUSIÓN

Los resultados de este Trabajo Fin de Grado permiten concluir que:

1. La OLE presenta un marcado efecto antiinflamatorio sobre los FS humanos (SW982), caracterizado por una disminución en los niveles de citocinas pro-inflamatorias: IL-6 y TNF- $\alpha$ . Entre los distintos mecanismos de acción posiblemente implicados figuran el descenso de la expresión de la enzima inducible COX-2, y por tanto, de m-PGES-1, a través de la inhibición de la vía de señalización MAPK.
2. Estos resultados preliminares sugieren que OLE podría participar en el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica dirigida a los elementos del sistema inmunitario, cuyas limitaciones en eficacia y seguridad son bien conocidas, y constituir un complemento nutricional de gran valor en tratamiento y/o prevención de la AR al actuar sobre procesos FS-dependientes.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

- Ac: Anticuerpo
- ALMT: Ácido logánico metiltransferasa
- ALT: Alanina aminotransferasa
- AOVE: Aceite de oliva virgen extra
- AR: Artritis reumatoide
- ARNm: ARN mensajero
- AST: Aspartato aminotransferasa
- CAT: Catalasa
- CCF: Cromatografía de capa fina
- CE: Electroforesis capilar
- CIA: Artritis colágeno-inducida
- CK-MB: Creatinquinasa-MB
- CK: Creatinquinasa
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DXR: Doxorubicina
- ELISA: Enzimoimmunoanálisis
- ERK: Cinasa regulada por señal extracelular
- ERN: Especies reactivas de nitrógeno
- ERO: Especies reactivas de oxígeno
- ESI-MS/MS: Ionización por electrospray-espectroscopía de masa
- FA: Fosfatasa alcalina
- FAMS: Full Automatic Modelling System
- FS: Fibroblastos sinoviales
- GC-MS: Cromatografía de masas-espectrometría de masas
- GDNF: Factor neutrótico derivado de células gliales
- GE10H: Geraniol 10-hidroxilasa
- GES: Geraniol sintasa
- GHS: Glutathion
- GOT: Transaminasa glutámico oxalacética
- GPx: Glutathion peroxidasa
- GRx: Glutathion reductasa
- GT: Glucosiltransferasa
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
- IAM: Infarto agudo de miocardio
- IL: Interleucina
- iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
- JNK: c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal cinasa
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- LPS: Lipopolisacáridos
- m-PGES-1: Prostaglandina E sintasa-1 microsomal
- MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos
- MMP: Metaloproteasa de la matriz
- MPO: Mieloperoxidasa
- NDHI: NADH deshidrogenasa
- NO: Óxido nítrico
- OLE: Oleuropeína
- PG<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>
- PKA: Proteinquinasa A
- SDS: Dodecil sulfato sódico
- SEM: Error estándar de la media
- SFB: Suero fetal bovino
- sGPT: Transaminasa glutámico pirúvica en suero
- SLS: Secologanina sintasa
- SOD: Superóxido dismutasa
- SRB: Sulforrodamina B
- TG: Triacilglicéridos
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- VHB: Virus de la hepatitis B
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

## BIBLIOGRAFÍA

- **Ahmad-Qasem MH**, Barrajón-Catalán E, Micol V, Mulet A, García-Pérez JV. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Res Int.* 2013; 50(1): 189-196.
- **Al-Azzawie HF**, Alhamdani MS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.* 2006; 78(12):1371–1377.
- **Alagna F**, Mariotti R, Panara F, Caporali S, Urbani S, Veneziani G et al. Olive phenolic compounds: Metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology.* 2012; 12: 162.
- **Alirezaei M**, Dezfoulan O, Neamati S, Rashidipour M, Tanideh N, Kheradmand A. Oleuropein prevents ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats. *J Physiol Biochem.* 2012; 68(4), 583–592.
- **Allouche N**, Fki I, Sayadi S. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(2): 267–273.
- **Altinyay C**, Altun ML. HPLC analysis of oleuropein in *Olea europaea* L. *J Fac Pharm.* 2006; 35(1): 1–11.
- **Andreadou I**, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(3): 549–558.
- **Ansari M**, Kazemipour M, Fathi S. Development of a simple green extraction procedure and HPLC method for determination of oleuropein in olive leaf extract applied to a multi-source comparative study. *J Iran Chem Soc.* 2011; 8(1): 38–47.
- **Aupperle KR**, Yamanishi Y, Bennett BL, Mercurio F, Boyle DL, Firestein GS. Expression and regulation of inducible ikappaB kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes. *Cell immunol.* 2001; 214(1): 54-59.
- **Baillet A**, Gossec L, Paternotte S, Etcheto A, Combe B, Meyer O et al. Evaluation of serum interleukin-6 level as a surrogate marker of synovial inflammation and as a factor of structural progression in early rheumatoid arthritis: results from a French national multicenter cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2015; 67(7): 905-912.

- **Barbaro B**, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A et al. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(10): 18508-18524.
- **Bazoti FN**, Bergquist J, Markides KE, Tsarbopoulos A. Noncovalent interaction between amyloid- $\beta$ -peptide (1–40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006; 17(4): 568–575.
- **Bi X**, Li W, Sasaki T, Li Q, Mitsuhata N, Asada Y et al. Secoiridoid glucosides and related compounds from *Syringa reticulata* and their antioxidants activities. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011; 21(21): 6426– 6429.
- **Bisignano G**, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51(8): 971–974.
- **Boccio P**, DiDeo A, De Curtis A, Celli N, Iacoviello L, Rotilio D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. *J Chromatogr B.* 2003; 785(1): 47–56.
- **Bouaziz M**, Jemai H, Khabou W, Sayadi S. Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *J Sci Food Agric.* 2010; 90(10): 1750–1758.
- **Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- **Čabarkapa A**, Živković L, Žukovec D, Djelić N, Bajić V, Dekanski D et al. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicol In Vitro.* 2014; 28(3): 451–456.
- **Caponio F**, Alloggio V, Gomes T. Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of paste preparation techniques. *Food Chem.* 1999; 64(2): 203–209.
- **Cárdeno A**, Sánchez-Hidalgo M, Alarcón-de-la-Lastra C. An up-date of olive oil phenols in inflammation and cancer: Molecular mechanisms and clinical implications. *Curr Med Chem.* 2013; 20: 4758-4776.
- **Carrera-González MP**, Ramírez-Expósito MJ, Mayas MD, Martínez-Martos JM. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends Food Sci Tech.* 2013; 31(2): 92–99.

- **Caturla N**, Perez Fons L, Estepa A, Micol V. Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem Phys Lipids*. 2005; 137(1-2): 2–17.
- **Charoenprasert S**, Mitchell A. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem*. 2012; 60(29): 7081–7095.
- **Cho JH**. Recent progress in inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol*. 2006; 579: 24-34.
- **Cicerale S**, Lucas LJ, Keast RS. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol*. 2012; 23(2): 129–135.
- **Corona G**, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessì MA, Spencer JPE. (2007). Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 362(3), 606–611.
- **Czerwisńska M**, Kiss AK, Naruszewicz M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacin. *Food Chem*. 2012; 131(3): 940–947.
- **Daccache A**, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle P. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem Int*. 2011; 58(6): 700–707.
- **Damtoft S**, Franzyk H, Jensen SR. Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: carbocyclic iridoid precursors. *Phytochemistry*. 1995; 40(3): 785–792.
- **De La Torre-Carbot K**, Jauregui O, Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, López-Sabater MC. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(11): 4331-4340.
- **Dell'Agli M**, Fagnani R, Galli GV, Maschi O, Gilardi F, Bellosta S et al. Olive oil polyphenols modulate the expression of metalloproteinase 9 in THP-1 cells by acting on nuclear factor- $\kappa$ B signalling. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(4): 2246–2252.
- **Deng RX**, Yuan H, Yin WP, Wang XS, Zhao TZ. Chemical constituents from *Syringa pubescens* Turcz. *Biochem Syst Ecol*. 2010; 38: 813–815.
- **Domitrović R**, Jakovac H, Marchesi VV, Šain I, Romić Ž, Rahelić D. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacol Res*. 2012; 65(4): 451–464.
- **Esti M**, Cinquanta L, la Notte E. Phenolic compounds in different olive varieties. *J Agric Food Chem*. 1998; 46(1): 32–35.

- **Fang HL**, Lai JT, Lin WC. Inhibitory effect of olive oil on fibrosis induced by carbon tetrachloride in rat liver. *Clin Nutr.* 2008; 27(6): 900–907.
- **Fauci AS**, Langford CA. *Harrison Reumatología* (2nd ed.). Mc-Graw-Hill Interamericana. 2010.
- **Fernández-Bolaños J**, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “Alperujo”. *J Agric Food Chem.* 2002; 50 (23): 6804-6811.
- **Fuentes E**, Palomo I. Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets. *Food and drug interactions. J Funct Foods.* 2014; 6(1): 73–81.
- **Furneri PM**, Marino A, Saija A, Uccella N, Bisignano G. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 20(4): 293–296.
- **Ghosh S**, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P et al. Natalizumab for active Crohn’s disease. *N Engl J Med.* 2003; 348(1): 24-32.
- **Giner E**, Andújar I, Recio MC, Ríos JL, Cerdá-Nicolás JM, Giner RM. Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(24): 12882– 12892.
- **Giner E**, Recio MC, Ríos JL, Giner RM. Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. *J Nat Prod.* 2013; 76(6), 1113– 1120.
- **Goldsmith CD**, Stathopoulos CE, Golding JB, Roach PD. Fate of the phenolic compounds during olive oil production with the traditional press method. *Int Food Res J* 2014; 21(1): 101–109.
- **González M**, Zarzuelo A, Gamez MJ, Utrilla MP, Jimenez J, Osuna I. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med.* 1992; 58(6):513–515.
- **Guo N**, Yu Y, Ablajan K, Li L, Fan B, Peng J et al. Seasonal variations in metabolites profiling of the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011; 25(12): 1701–1714.
- **Hamdi HK**, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334(3): 769–778.
- **Hassem I**, Casabianca H, Hosni K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropeína: Exceeding the expectation- A mini-review. *J Funct Foods.* 2015; 18: 926-40.
- **Hommel D**, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B et al. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn’s disease. *Gastroenterol.* 2002; 122(1): 7-14.

- **Impellizzeri D**, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P et al. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem Pharmacol.* 2012; 83(10): 1413– 1426.
- **Impellizzeri D**, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P et al. The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan- induced pleurisy. *Clin Nutr.* 2011; 30(4): 533–540.
- **Izquierdo E**, Pablos JL. Fibroblastos sinoviales. *Semin Fund Esp Reumatol.* 2013; 14(4): 121-128.
- **Janahmadi Z**, Nekooeian AA, Moaref AR, Emamghoreishi M. Oleuropein Offers Cardioprotection in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Cardiovasc Toxicol.* 2014; 15(1): 61-68.
- **Japón-Lujan R**, Luque de Castro MD. Small branches of olive tree: A source of biophenols complementary to olive leaves. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(11): 4584–4588.
- **Jemai H**, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem Biol Interact.* 2008; 176(2-3): 88–98.
- **Kanakis P**, Termentzi A, Michel T, Gikas E, Halabalaki M, Skaltsounis AL. From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Med.* 2013; 79(16): 1576–1587.
- **Katsiki M**, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ, Gonos ES. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res.* 2007; 10(2): 157–172.
- **Katsoulieris EN**. The olive leaf extract oleuropein exerts protective effects against oxidant-induced cell death, concurrently displaying pro-oxidant activity in human hepatocarcinoma cells, *Redox Rep.* 2016; 21(2): 90-97
- **Kim SW**, Hur W, Li TZ, Lee YK, Choi JE, Hong SW et al. Oleuropein prevents the progression of steatohepatitis to hepatic fibrosis induced by high-fat diet in mice. *Exp Mol Med.* 2014; 46: e92.
- **Kimura Y**, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J Nutr.* 2009; 139(11): 2079–2086.
- **Kotyzová D**, Hodková A, Eybl V. The effect of olive oil phenolics-hydroxytyrosol and oleuropein on antioxidant defence status in acute arsenic exposed rats. *Toxicol Lett.* 2011; 205: S222.

- **Kyriakis JM**, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001; 81(2): 807-869.
- **Kyriakopoulou K**, Katsanou E, Machera K, Charistou A. Oleuropein protects HepG2 cells against oxidative stress-induced DNA damage. *Toxicol Lett.* 2012; 211: S106.
- **Lee OH**, Lee BY, Lee J, Lee HB, Son JY, Park CS et al. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour Technol.* 2009; 100(23): 6107–6113.
- **Lee-Huang S**, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y et al. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. fusion [corrected] inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354(4): 872–878.
- **Lee-Huang S**, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y et al. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. integrase inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354(4): 879–884.
- **Lin HM**, Yen FL, Ng LT, Lin CC. Protective effects of *Ligustrum lucidum* fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111(1): 129–136.
- **Malik NSA**, Bradford JM. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina” olives. *Sci Hortic.* 2006; 110: 274–278.
- **McInnes IB**, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011; 365(23): 2205-2219.
- **Micol V**, Caturla N, Pérez-Fons L, Más V, Pérez L, Estepa A. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir Res.* 2005; 66(2-3): 129–136.
- **Neurath MF**, Fuss I, Schürmann G, Pettersson S, Arnold K, Müller-Lobeck H et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 859: 149-159.
- **Obied HK**, Bedgood DR, Prenzler PD, Robardz K. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(7): 1238– 1248.
- **Omar SH**. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm.* 2010; 78(2): 133-154.
- **Ortega-García F**, Peragón J. HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and tyrosol in stems and roots of *Olea europaea* L. cv. Picual during ripening. *J Sci Food Agric.* 2010; 90(13): 2295–2300.

- **Perri E**, Raffaelli A, Sindona G. Quantitation of oleuropein in virgin olive oil by ionspray mass spectrometry-selected reaction monitoring. *J Agric Food Chem.* 1999; 47(10): 4156–4160.
- **Ranalli A**, Contento S, Lucera L, di Febo M, Marchegiani D, di Fonzo V. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *J Agric Food Chem.* 2006; 54(2): 434–440.
- **Rosillo MA**, Alcaraz MJ, Sánchez-Hidalgo M, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C, Ferrándiz ML. Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. *J Nutr Biochem.* 2014; 25(12): 1275-1281.
- **Rosillo MA**, Sánchez-Hidalgo M, González-Benjumea A, Fernández-Bolaños JG, Lubberts E, Alarcón-de-la-Lastra C. Preventive effects of dietary hydroxytyrosol acetate, an extra virgin olive oil polyphenol in murine collagen-induced arthritis. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59(12): 2537-2546.
- **Rosillo MA**, Sánchez-Hidalgo M, Sánchez-Fidalgo S, Aparicio-Soto M, Villegas I, Alarcón-de-la-Lastra C. Dietary extra-virgin olive oil prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in murine collagen-induced arthritis. *Eur J Nutr.* 2016; 55(1): 315-325.
- **Rubió L**, Serra A, Macià A, Piñol C, Romero MP, Motilva MJ. In vivo distribution and deconjugation of hydroxytyrosol phase II metabolites in red blood cells: A potential new target for hydroxytyrosol. *J Funct Foods.* 2014; 10: 1–5.
- **Ryan D**, Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Lavee S. Biotransformations of Phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci Horticult.* 2002; 92: 147-176.
- **Ryu SJ**, Choi HS, Yoon KY, Lee OH, Kim KJ, Lee BY. Oleuropein suppresses LPS-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cell and zebrafish. *J Agric Food Chem.* 2015; 63(7): 2098-105.
- **Saija A**, Uccella N. Olive biophenols: functional effects on human well-being. *Trends Food Sci Technol.* 2001; 11(9-10): 357–363.
- **Samuelsson B**, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: A novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.* 2007; 59(3): 207-224.
- **Sánchez-Hidalgo M**, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol.* 2005; 69(12): 1733-1744.
- **Sanz M**, Simón BF, Cadahía E, Esteruelas E, Muñoz AM, Hernández T et al. LC-DAD/ESI-MS/ MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus*

Americana L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *J Mass Spectrom.* 2012; 47(7): 905–918.

○ **Savournin C**, Baghdikian B, Elias R, Dargouth-Kesraoui F, Boukef K, Balansard G. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(2): 618–621.

○ **Schett G**, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P et al. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010; 43(11): 2501-2512.

○ **Sepporta MV**, Fuccelli R, Rosignoli P, Ricci G, Servili M, Morozzi G et al. Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts. *J Funct Foods.* 2014; 8: 269–273.

○ **Skehan P**, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82(13): 1107-1112.

○ **Smolen JS**, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2000; 2(6): 473-488.

○ **Soler-Rivas C**, Espin JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric.* 2000; 80(7): 1013–1023.

○ **Stamatopoulos K**, Chatzilazarou A, Katsoyannos, E. Optimization of Multistage Extraction of Olive Leaves for Recovery of Phenolic Compounds at Moderated Temperatures and Short Extraction Times. *Foods.* 2014; 3: 66-81.

○ **Sun P**, Zhou K, Wang S, Li P, Chen S, Lin G, Zhao Y, Wang T. Involvement of MAPK/NF- $\kappa$ B signaling in the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway in experimental colitis by chronic vagus nerve stimulation. *PLoS One.* 2013; 8(8): e69424.

○ **Tan HW**, Tuck KL, Stupans I, Hayball PJ. Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B.* 2003; 785(1): 187–191.

○ **Tayoub G**, Sulaiman H, Hassan AH, Alorfi M. Determination of oleuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. *Int J Med Arom Plants.* 2012; 2(3): 428–433.

○ **Tuberoso CI**, Kowalczyk A, Sarritzu E, Cabras P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oil seeds for food use. *Food Chem.* 2007; 103: 1494–1501.

- **Tuck KL**, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *J Nutr Biochem.* 2002; 13(11): 636–644.
- **Visioli F**, Galli C. Olive oil: More than just oleic acid. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(3): 853.
- **Vissers MN**, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr.* 2002; 132(3): 409–417.
- **Wei J**, Feng J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2010; 4(2): 105-107.
- **Westman M**, Korotkova M, Klint E, Stark A, Audoloy LP, Klarekog L et al. Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(6); 1774-1778.
- **Zhao G**, Yin Z, Dong J. Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *J Ethnopharmacol.* 2009; 125(2): 265–268.
- **Zoidou E**, Melliou E, Gikas E, Tsaibopoulos A, Magiatis P, Skaltsounis AL. Identification of Throuba Thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional rich source of oleuropein. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(1): 46–50.

