



UNIVERSIDAD  
DE SEVILLA

**FACULTAD DE FARMACIA**



***Efecto de nanovesículas conteniendo un polifenol sobre  
marcadores de inflamación en un modelo de colitis ulcerosa***

**Autora:** Triana Espinosa Jiménez

Sevilla, 8 de Junio de 2018





UNIVERSIDAD  
DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FARMACOTERAPIA



***Efecto de nanovesículas conteniendo un polifenol sobre  
marcadores de inflamación en un modelo de colitis ulcerosa.***

---

GRADO EN FARMACIA  
TRABAJO FIN DE GRADO  
TRABAJO EXPERIMENTAL

**Autora:** Triana Espinosa Jiménez

**Tutora:** Elena Talero Barrientos

Sevilla, 8 de Junio de 2018

## Resumen

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se caracteriza por una inflamación crónica descontrolada de la mucosa intestinal. RA-303 es un compuesto que pertenece al grupo de los polifenoles, los cuales se pueden encontrar en la naturaleza y que han demostrado tener actividad antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena, entre otras. En este estudio, hemos probado los efectos de este polifenol en un modelo de colitis ulcerosa inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) al 4% p/v sobre ratones macho de la cepa C57BL/6, valorándose su eficacia mediante la administración del polifenol vehiculizado en nanovesículas a las dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg y comparándolo con el polifenol libre. Al mismo tiempo se usó el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) como control de referencia. Todos los grupos fueron pretratados, durante los tres días previos a la administración del DSS, con las sustancias asignadas para cada uno de ellos. Los diferentes tratamientos fueron administrados mediante sonda intragástrica, en días alternos, de manera simultánea a la toma del DSS en el agua de bebida y durante 7 días. El tratamiento con el polifenol mejoró la pérdida de peso corporal y el acortamiento del colon. La infiltración neutrofílica, con el consiguiente aumento en los niveles de mieloperoxidasa inducida por DSS, disminuyó después de la administración del tratamiento, al igual que ocurrió con la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). Por otro lado, los efectos antiinflamatorios del polifenol se confirmaron mediante la inhibición de la producción de TNF- $\alpha$  en el colon. Con nuestro estudio, hemos demostrado por primera vez la efectividad del RA-303, así como las ventajas derivadas de su vehiculización en nanovesículas, siendo necesarios futuros trabajos para ampliar la visión de los beneficios de este tipo de compuestos.

**Palabras clave:** colitis ulcerosa, polifenoles, nanovesícula, EII, DSS.

## *Índice*

<b>I.</b>	<b>Introducción</b>	<b>4</b>
	1. Enfermedad inflamatoria intestinal	4
	1.1 Patogenia	5
	1.2 Tratamientos	10
	2. Polifenoles	14
	3. Nanovesículas	17
<b>II.</b>	<b>Objetivo</b>	<b>18</b>
<b>III.</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>19</b>
	1. Sustancias ensayadas	19
	2. Modelo murino de colitis ulcerosa aguda inducida por DSS	19
	3. Evaluación de la severidad de la colitis y análisis macroscópico de las lesiones	21
	4. Actividad de la enzima mieloperoxidasa	21
	5. Determinación de la producción de citosinas mediante ELISA	22
	6. Expresión de proteínas mediante Western Blot	23
	7. Análisis estadístico	24
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b>	<b>25</b>
	1. Valoración macroscópica de la colitis	25
	2. Análisis bioquímico de la mucosa colónica	27
<b>V.</b>	<b>Discusión</b>	<b>30</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>33</b>
<b>VII.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>34</b>

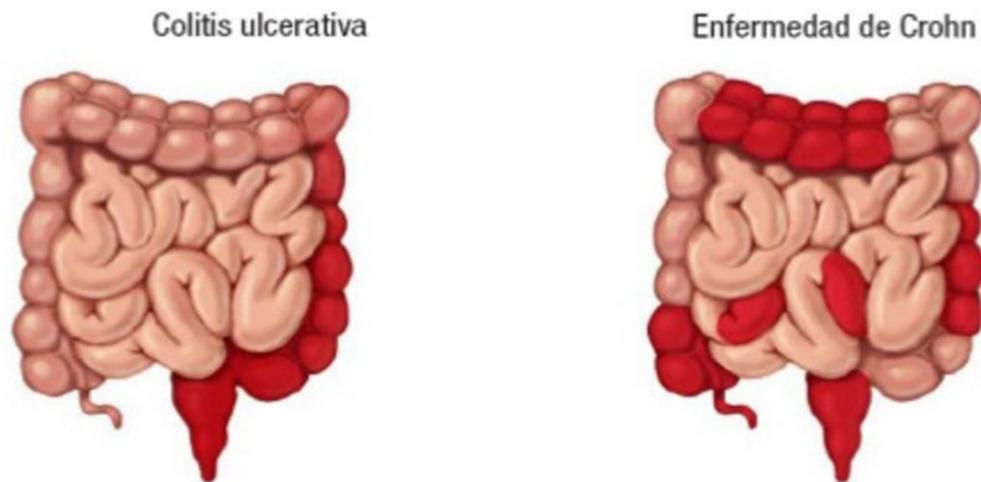
# I. Introducción

## 1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad crónica y heterogénea que se caracteriza por períodos de remisión y de recaídas. La EII comprende la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Se ha visto que se trata de una enfermedad multifactorial en la que tienen un papel importante la respuesta inmune, los factores medioambientales, la microbiota intestinal y múltiples genes (**Yamamoto, 2017**).

Aunque la EC y la CU puedan parecer lo mismo, cada una de ellas tiene sus propias características, si bien es cierto que comparten muchos aspectos. Entre ellos, el mecanismo del proceso inflamatorio, que es igual en ambos procesos. Los síntomas más característicos son bastante similares en ambos casos, pero las áreas del cuerpo a las que afectan son distintas. Mientras la EC puede afectar a cualquier parte del intestino, la CU se limita al colon (**Figura 1**). El síntoma más representativo de la CU es la aparición de sangre en las heces, siendo frecuente encontrar diarreas o heces poco consistentes, con sangre o mucosidad, urgencia rectal, tenesmo, esputos rectales y dolor abdominal, entre otros. A nivel extraintestinal, puede aparecer fiebre, taquicardia, pérdida de peso, náuseas, vómitos, inflamación en los ojos, dolor de articulaciones, etc.

En cuanto a la EC, en algunos casos a penas produce síntomas. Sin embargo, a veces puede causar una enfermedad perianal, o perforación y abscesos en el abdomen. Los síntomas de los brotes pueden variar pero casi siempre incluyen diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso. Es frecuente la fiebre y puede aparecer sangre en las heces. El ano puede verse afectado con la aparición de abscesos y fístulas. También pueden aparecer algunas manifestaciones extraintestinales, incluso durante los brotes se podrían producir alteraciones en los resultados analíticos, anemia y otros (**Fundación Española del Aparato Digestivo**).



**Figura 1: Zonas principales de afectación en la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.** Tomada de la IV conferencia sobre la CU y EC en Costa Rica por el gastroenterólogo León de Mezerville

Estas enfermedades por lo general afectan a personas entre los 30 y los 40 años, y actualmente, el número de casos alrededor del mundo está aumentando (**Basso et al.,2014**). Tradicionalmente, los países más desarrollados han presentado una prevalencia menor, pero la incidencia está aumentando en estos países, especialmente en aquellos situados en América Latina y Asia, a medida que se vuelven más industrializados (**Yamamoto, 2017**).

### 1.1 Patogenia

La EII se caracteriza por una inflamación muy difícil de controlar y exacerbaciones que conducen a una mala calidad de vida de los pacientes afectados. Aunque la causa exacta de la EII sigue sin conocerse, la evidencia sugiere que la interacción entre la desregulación del sistema inmunológico, los factores ambientales y los polimorfismos genéticos son los principales factores que contribuyen a la naturaleza multifactorial de la enfermedad (**Basso et al., 2014**).

#### 1.1.1 Polimorfismos genéticos

Si nos centramos en la influencia que tienen algunos genes en la EC y la CU, numerosos polimorfismos han sido identificados y relacionados con la patogenia de esta enfermedad. Una mayor susceptibilidad a la EII y una enfermedad colónica más extensa se han relacionado con alteraciones en los receptores *Toll-like* (TLRs), mientras que

variaciones genéticas en el receptor *nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like*, conducen a un aumento en la predisposición a padecer EC. De hecho, los polimorfismos en la proteína 15 que contiene el dominio de reclutamiento de NOD2/caspasa fueron las primeras modificaciones genéticas que se relacionaron con el comienzo de la EII. Desde entonces, diversos estudios han mostrado unas 100 variantes alélicas relacionadas con la EC o CU. Éstos incluyen a la familia de receptores tipo NOD y otros muchos como la familia del receptor *NOD-like (NLRP3)* (**Basso et al., 2014**).

### **1.1.2 Factores ambientales**

Entre los mecanismos no genéticos que subyacen a la patogénesis de la EII, existe un interés creciente en la interacción epigenética entre el ADN del huésped y los desencadenantes ambientales. Por ejemplo, según muestran los datos epidemiológicos, el mayor riesgo de desarrollar EII entre las personas que migran de zonas de baja a alta incidencia parece apoyar la noción de modificaciones epigenéticas impulsadas por el medioambiente. Entre algunos de los factores ambientales podemos destacar el papel de los alimentos, que se han visto implicados en la aparición de cambios epigenéticos, pudiendo predisponer un mayor riesgo para el desarrollo y la progresión de la EII. En un estudio que se realizó con células epiteliales intestinales aisladas se demostró que la mayoría de las modificaciones epigenéticas asociadas con la EII sugieren un papel relevante de la metilación del ADN (**De Souza, 2017**).

El estilo de vida occidental puede precipitar la inflamación intestinal e incluso las recaídas, pero este factor está principalmente basado en las variaciones en las comunidades microbianas. En la primera investigación poblacional que se realizó en Asia y Pacífico, se observó que las alteraciones dietéticas e inmunológicas que se producían en edades tempranas provocaban, posteriormente, el desarrollo de EII. Estos hallazgos parecen corroborar la hipótesis de que las diferencias en la microbiota relacionadas con la geografía y la etnia, pueden explicar los cambios recientes en la incidencia de trastornos relacionados con la microbiota, incluido el aumento global de la EII, especialmente en aquellos países que anteriormente mostraban bajas tasas de incidencia (**De Souza, 2017**).

La microbiota intestinal tiene importantes funciones en el metabolismo del huésped y en el desarrollo y funcionamiento de su sistema inmune (**Kamada et al., 2013**). Junto con la predisposición genética y los factores medioambientales, la microbiota es un elemento clave en la patogénesis de la EII, como un mecanismo que predispone o que protege frente al desarrollo de la inflamación intestinal. La relación entre la alteración de la microbiota y los pacientes con EC o CU apunta a que las comunidades de microorganismos que habitan en el intestino desempeñan un papel importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad, como se ha podido observar en modelos de ratones (**Gkouskou et al., 2014**). En consecuencia, varios estudios han demostrado el papel de los microorganismos específicos y combinados en la gravedad de la inflamación intestinal. Por ejemplo, se han descrito reducciones en las poblaciones de bacterias anaerobias encontradas normalmente en la microbiota intestinal como *Bacteroides*, *Eubacterium* y especies de *Lactobacillus* en pacientes con EII. Por otro lado, en pacientes con EC se ha visto una reducción en *Firmicutes* y un aumento simultáneo en *Proteobacteria*. Estos pacientes también mostraron una reducción en el grupo de *Clostridium leptum*, particularmente en *Faecalibacterium prausnitzii* (**Basso et al., 2014**).

### **1.1.3 Factores inmunológicos**

Dado que la EII es una inflamación crónica y recidivante de la mucosa intestinal, se ha establecido tradicionalmente que tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa desempeñan un papel importante en la patogénesis, junto con los factores predisponentes previamente descritos.

La respuesta inmune habitual comprende barreras físicas (por ejemplo, el epitelio que recubre la mucosa intestinal), células fagocíticas, células dendríticas, células *Natural Killer* (NK), citocinas, etc. La mayoría, si no todos, de estos componentes del sistema inmune innato se modifican en la EII, lo que lleva a una inflamación incontrolada de la mucosa intestinal. Además de las importantes alteraciones en la respuesta inmune innata, el perfil predominante de citocinas también dependerá de qué perfil de células T se desarrolle y, con ello, la respuesta inmune adaptativa que se produce durante el curso de la enfermedad (**Basso et al., 2014**).

Las células T CD4 + madre se diferencian en células Th1 gracias a la estimulación de la IL-12 y la IL-27. Estas células Th1 liberan citocinas como el TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2. Por otro lado, las Th2 se diferencian bajo la influencia de la IL-4

principalmente, y segregan IL-4, IL-5 e IL-13. Las células Th1 y Th2 son líneas celulares que se regulan mutuamente mediante la secreción de estas citocinas, así el IFN- $\gamma$  secretado por las células Th1 reprime la proliferación de las Th2, mientras que la IL-4 secretada por las células Th2 antagoniza la diferenciación de células Th1. Se ha demostrado que el desequilibrio inmune de los subconjuntos Th1 y Th2 juega un papel importante en el desarrollo de la EII. Se ha visto que una respuesta inmune dominada por Th1, con altas cantidades de IL-2 e IFN- $\gamma$ , es más pronunciada en pacientes con EC. El aumento en la mucosa de los niveles de IFN- $\gamma$  afecta consecuentemente a otras células inmunes como los macrófagos intestinales para inducir la producción de TNF- $\alpha$ , desempeñando un papel importante en la cronificación de la EII. Por el contrario, se ha demostrado que las células T de la mucosa de los pacientes con CU liberan mayores cantidades de IL-5 e IL-13 que los pacientes con EC. Por lo tanto, históricamente, basándose en las citocinas liberadas por las células T detectadas en la mucosa inflamada de los pacientes con EII, la EC se designó como una condición Th1, mientras que la CU se caracterizó como una condición Th2. Sin embargo, esta caracterización Th1/Th2 se ha revisado después del descubrimiento de las células Th17 y su papel clave en afecciones inflamatorias como la EII.

Las células Th17 se caracterizan por su producción de grandes cantidades de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Las células Th17 son inducidas por una combinación de IL-6 y TGF- $\beta$  y por la expresión de STAT3, siendo su expansión promovida por la IL-23. Se ha observado un mayor porcentaje de células Th17 en la mucosa de los pacientes con EC y UC. La IL-17A, la citocina proinflamatoria Th-17 característica que desempeña un papel importante en la diafonía entre la inmunidad innata y la adaptativa, también aumenta en la mucosa y el suero de pacientes con EC y CU, junto con los niveles de IL-21 y IL-23 (**Ahluwalia, 2018**).

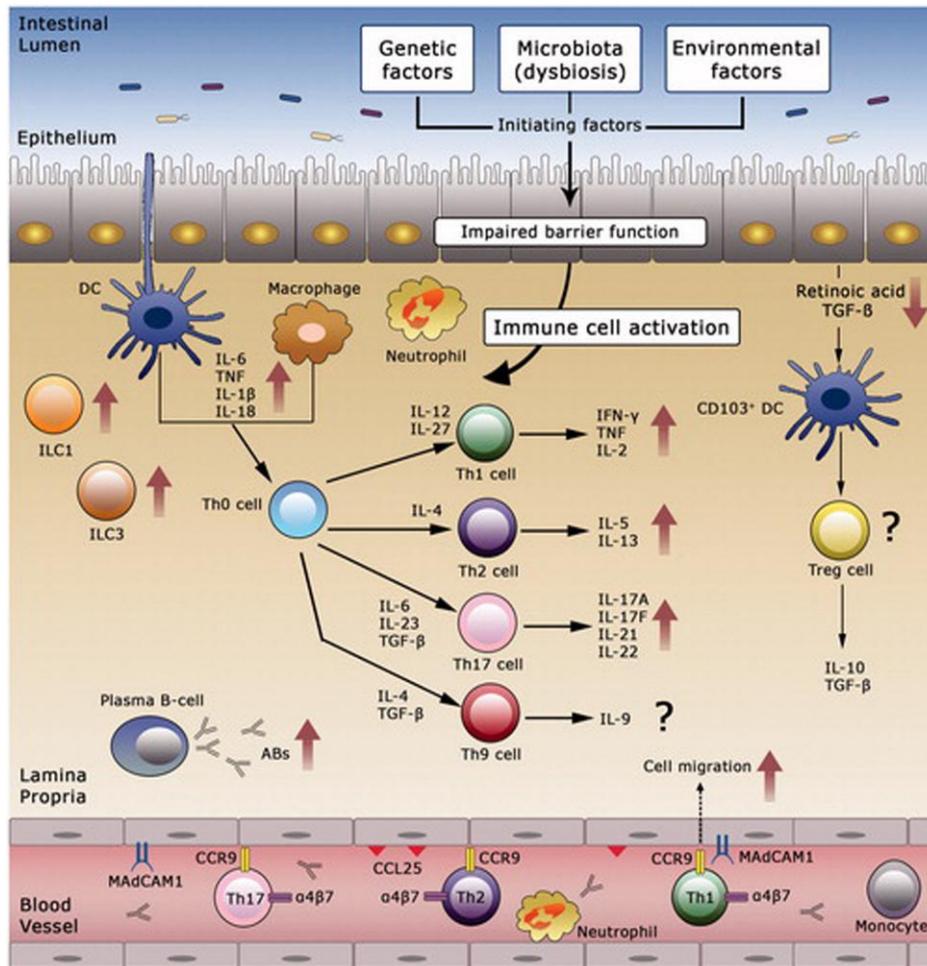


Figura 2: Principales citocinas implicadas en la diferenciación de las células T y producidas por las células Th1, Th2 y Th17. Tomada de Ahluwalia, 2018

### ILCs en EII

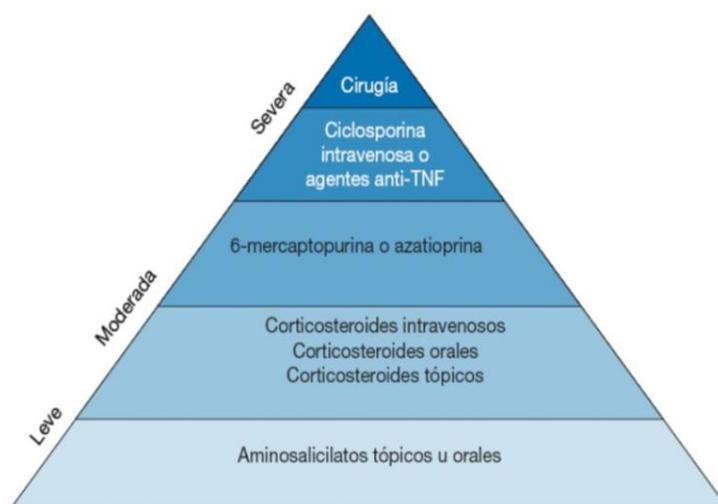
Recientemente, se ha descubierto que las células linfoides innatas (ILC) son linfocitos implicados en la patogénesis de la EII (Hoon Lee et al., 2018). La familia ILC se puede subdividir en tres grupos dependiendo de los factores de transcripción que expresan para la diferenciación: ILC1, ILC2, ILC3. Este último en particular está relacionado con la defensa del huésped frente a bacterias y hongos. De forma similar a las células Th17, las ILC3 patógenas también son responsables de la producción de IL-23, que induce la secreción de IL-17 e IL-22. El TNF- $\alpha$ , que como se sabe es una citoquina clave en la patogénesis de la EII, también provocó un aumento de la producción de IL-17 en un modelo murino de colitis (Powell et al., 2012). La IL-12 estimula la producción de citocinas específicas de ILC1 en sinergia con IL-15 e IL-18. IL-12 e IL-23 también pueden contribuir a la diferenciación a ILC1 o ILC3. Por lo

tanto, parece que la patogénesis de la EII está orquestada por una combinación de todas estas citocinas (**Bernink et al., 2013**).

## 1.2 Tratamientos

La gran heterogeneidad en los pacientes con EII ha motivado una búsqueda exhaustiva basada en la evidencia de biomarcadores novedosos para la estratificación de los pacientes de acuerdo a las diferencias interindividuales en severidad, eficacia farmacológica, efectos secundarios y pronóstico, con el fin de guiar a los médicos en el manejo de pacientes con EII representando un paso importante hacia la medicina personalizada.

Existen distintos tratamientos para la EII, cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes, que aparecen recogidos en la **Figura 3**.



**Figura 3: Principales tratamientos usados para el tratamiento de la EII.** Tomada de la IV conferencia sobre la CU y EC en Costa Rica por el gastroenterólogo León de Mezerville.

### 1.2.1 Mesalazina (Ácido 5-aminosalicílico)

La mesalazina constituye la primera línea de tratamiento para la inducción y mantenimiento de la remisión en la CU. Parece ser que actúa localmente sobre la mucosa del colon y reduce la inflamación a través de distintos procesos antiinflamatorios mediante la activación del receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ). Este receptor tiene un papel en la regulación de la inflamación intestinal y es altamente expresado en el colon, donde las células

epiteliales y los macrófagos son las principales fuentes celulares de este receptor nuclear (Lawson et al.,2006).

### 1.2.2 Corticoesteroides

Los corticoesteroides constituyen la segunda línea en la terapia de aquellos pacientes que no responden a dosis máximas de mesalazina o que presentan una EII de moderada a grave. El mecanismo de acción de los corticoides está basado en la inhibición de la activación de las células T y de la producción de citocinas proinflamatorias (Yamamoto, 2017).

### 1.2.3 Tiopurinas

Los inmunomoduladores se han convertido en el pilar principal de la EII con eficacia comprobada en la reducción de las recaídas, lo que permite evitar la toma continuada de corticoesteroides y el cierre de las úlceras (Dubinsky, 2004). Las tiopurinas como la azatioprina (AZA) y la 6-mercaptopurina (6-MP) se usan generalmente en pacientes con dependencia o resistencia a los corticoesteroides y se combinan con el tratamiento con el TNF- $\alpha$  (Yamamoto, 2017). Después de la administración, el AZA se convierte en 6-MP que se metaboliza en metabolitos inactivos como la 6-metilmercaptopurina por la enzima tiopurina metiltransferasa, pero también da lugar a un metabolito activo que es la 6-tioguanina (6-TGN). Ésta se incorpora a los ribonucleótidos de los linfocitos que se encuentran en proliferación impidiendo la mitosis. Todo este mecanismo explicaría el tiempo de latencia hasta que se empiezan a detectar los primeros resultados de estos fármacos. El metabolismo preferencial de 6-MP a 6-TGN o a metabolitos inactivos está determinado por varias variantes genéticas (Mantzaris, 2017).

### 1.2.4 Metotrexato

El metotrexato (MTX) es un análogo del ácido fólico y la aminopterina, que es un antagonista del ácido fólico. Las altas dosis de MTX ejercen actividades antineoplásicas al inhibir la enzima dihidrofolato reductasa que evita la proliferación de las células malignas. Las dosis más bajas se utilizan en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Este efecto del MTX no puede explicarse únicamente por su actividad antiproliferativa y se han propuesto varios mecanismos adicionales, incluidas la supresión de la proliferación de linfocitos, así como la inhibición de citocinas proinflamatorias y la quimiotaxis de neutrófilos. (Mantzaris, 2017).

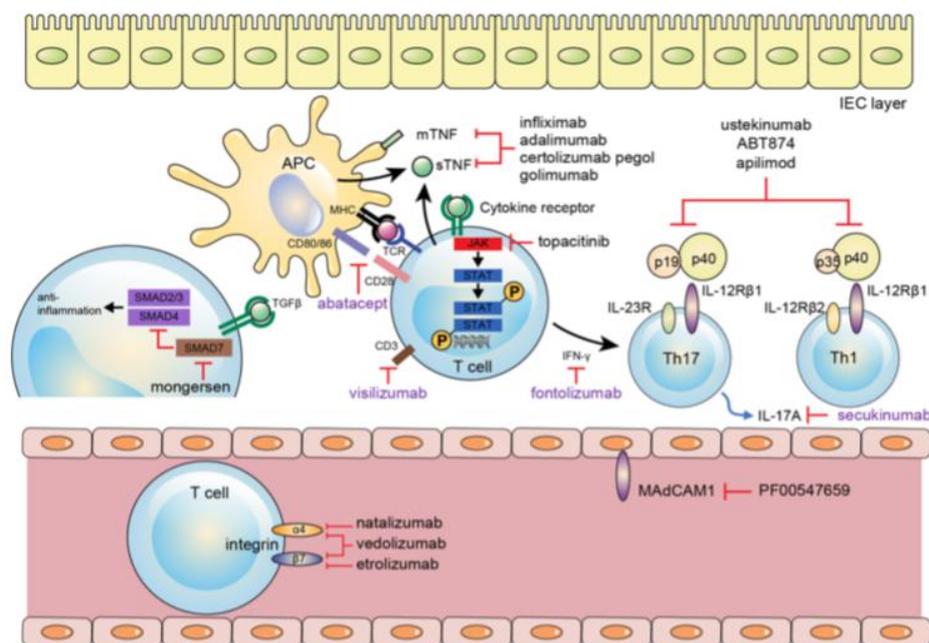
### 1.2.5 Terapia biológica

En el año 1998 comenzó la era de la terapia biológica cuando la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó el infliximab (**Figura 3**) como primer agente anti-TNF para tratar la EC (**Targan et al., 1997**), usado en la actualidad en la inducción de la remisión de la EC activa intraluminal y fistulizante en pacientes que no han respondido adecuadamente al tratamiento tradicional o que dependen de los corticoides.

El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria producida por los macrófagos, linfocitos T activados, monocitos y mastocitos de la mucosa intestinal y con un papel clave en la EII. Debido a este motivo, numerosos tratamientos están siendo ensayados para bloquear la acción de esta citocina en varios puntos. Algunos de estos fármacos son el adalimumab, certolizumab, golimumab, además del nombrado anteriormente, infliximab (**Figura 3**).

Existen otros fármacos biológicos frente a distintas dianas implicadas en la EII, como por ejemplo el vedolizumab, que es un anticuerpo humanizado anti- $\beta$ 7-integrina que inhibe selectivamente la adhesión de leucocitos del tracto gastrointestinal (**Mosli y Feagan, 2013**). Otro fármaco a destacar es el natalizumab, anticuerpo monoclonal que bloquea a las integrinas, y consecuentemente, impide la migración de leucocitos dentro del tracto gastrointestinal (**Figura 3**). Fue comercializado en 2004, pero meses después se retiró temporalmente por producir leucoencefalopatía multifocal progresiva. Poco después se volvió a comercializar para el tratamiento de la esclerosis múltiple y la EII, aunque de forma restrictiva (**Ghosh y Chaki, 2012**).

El ustekinumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 $\kappa$  totalmente humano que se une con especificidad a la subunidad proteica p40 compartida por las citocinas proinflamatorias y las interleucinas humanas (IL)-12 y -23 (**Figura 4**). Este bloqueo conduce a la amortiguación de la cascada inflamatoria y de la diferenciación de las células T inflamatorias (**Kotze et al., 2018**).



**Figura 4: Mecanismo de acción de distintos fármacos usados en la terapia biológica.** Tomada de Kim y Cheon, 2017.

### 1.2.6 Otras terapias

**Probióticos:** Las evidencias del papel de la flora intestinal en la patogénesis de la EII han conducido a la suposición de que la manipulación de dicha flora podría proporcionar beneficios terapéuticos. El modo de acción de los probióticos es bastante complejo y no se conoce en su totalidad. Se han identificado distintas especies probióticas, teniendo la mayoría de ellas distintos mecanismos de acción. Además, se ha observado que el modo de acción de un probiótico puede variar en función de la presencia de otros probióticos o bacterias entéricas (**Shanahan, 2004**). Entre algunos de los mecanismos que se han descrito podemos destacar: la adhesión a la mucosa intestinal, la regulación de la proliferación celular y la apoptosis, y la estimulación del sistema inmune mediante la modulación de citocinas (**Geier et al., 2007**).

**Trasplante fecal:** Basado en numerosos estudios en animales y en el gran éxito en pacientes con infección por *Clostridium difficile* grave recurrente, el trasplante fecal se considera un tratamiento potencial (**Berg et al., 2015**).

Durante el tratamiento, las heces obtenidas de donantes sanos se introducen como una suspensión en el tracto gastrointestinal de los receptores. Dada la gran cantidad de hallazgos que sugieren el papel fundamental que tiene la microbiota

intestinal en la EII, el trasplante fecal como nueva estrategia terapéutica ha ganado una atención creciente en los últimos años.

## 2. POLIFENOLES

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de productos naturales más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Más de 8000 estructuras fenólicas se conocen actualmente, y entre ellas se han identificado más de 4000 flavonoides. Aunque los polifenoles se caracterizan químicamente como compuestos con características estructurales fenólicas, este grupo de productos naturales es muy diverso y contiene varios subgrupos de compuestos fenólicos. Las frutas, verduras, cereales integrales y otros tipos de alimentos y bebidas como el té, el chocolate y el vino son fuentes ricas en polifenoles. La diversidad y amplia distribución de polifenoles en las plantas ha conducido a diferentes formas de categorizar estos compuestos naturales. Se trata de metabolitos secundarios de las plantas y muchos de ellos están involucrados en los mecanismos de defensa de las mismas, ya que tienen actividades antibióticas y antifúngicas (**Gil y Sánchez de Medina, 2010**), aunque algunos son esenciales para las funciones básicas fisiológicas de los vegetales.

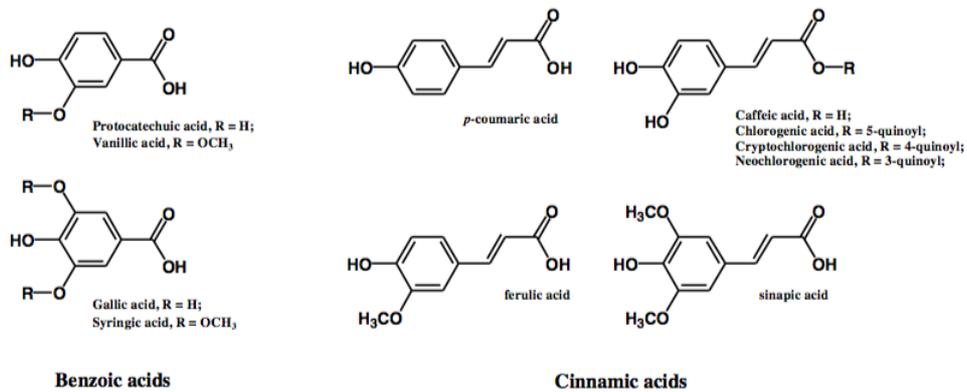
### 2.1 Estructura y clasificación

Los polifenoles se pueden dividir en distintas clases dependiendo del número de anillos fenólicos que contengan y los elementos estructurales que se unen entre ellos. De esta manera se pueden distinguir 5 grandes grupos; los ácidos fenólicos, los estilbenos, los lignanos, los alcoholes fenólicos y los flavonoides. Nuestro compuesto en estudio (RA-303) pertenece al grupo de los ácidos fenólicos, por lo que nos centraremos principalmente en ellos.

#### *Ácidos fenólicos*

Los ácidos fenólicos son compuestos polifenólicos no flavonoides que se pueden dividir en dos tipos principales, los derivados del ácido benzoico (gálico, vanílico, catéquico, elágico y siríngico) y los derivados del ácido cinámico (p-cumárico y cafeico) (**Figura 5**). Mientras que las frutas y verduras contienen muchos ácidos fenólicos libres, en granos y semillas, particularmente en el salvado o en la cáscara, los ácidos fenólicos a menudo se encuentran en la forma enlazada (**Chandrasekara y Shahidi, 2010**). Estos ácidos fenólicos solo pueden liberarse o hidrolizarse por

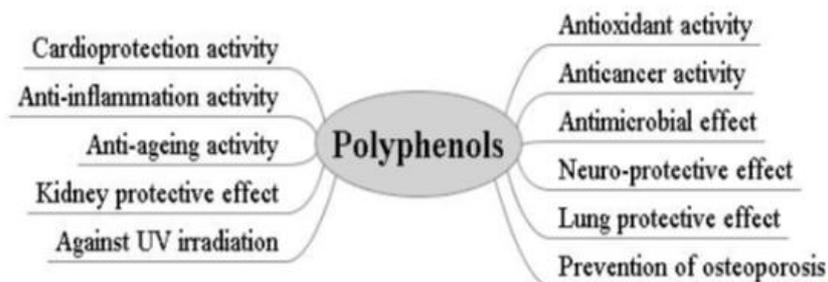
hidrólisis ácida o alcalina, o por enzimas (Tsao, 2010). Con el objetivo de focalizar contenido, nos centraremos en los ácidos hidroxicinámicos, los cuales no suelen encontrarse en forma libre sino que suelen estar esterificados en la pared celular vegetal, y, con ello, presentan una baja solubilidad. Los principales representantes son el ácido ferúlico, el ácido cumárico y el ácido cafeico.



**Figura 5: Estructura química de los principales ácidos fenólicos.** Tomada de Tsao, 2010

## 2.2 Bioactividad de los polifenoles

Los polifenoles han demostrado numerosas actividades biológicas y efectos beneficiosos para la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, etc. (Figura 6)



**Figura 6: Principales actividades biológicas de los polifenoles.** Tomada de Li et al, 2014.

### 2.2.1 Actividad antioxidante

Entre las bioactividades notables de los compuestos fenólicos, la antioxidante se ha estudiado ampliamente, incluida la eliminación de radicales libres, la inhibición de la

oxidación lipídica o la disminución de la producción de peróxido de hidrógeno (Sato et al, 1996).

Existen numerosos experimentos *in vitro* que probaron que los compuestos fenólicos son los principales contribuyentes de las capacidades antioxidantes de las plantas. Los polifenoles podrían funcionar también como antioxidantes mediante sus efectos en plasma, membranas, factores de transcripción y la actividad enzimática *in vivo* (Li et al., 2014).

### 2.2.2 Actividad anticancerígena

Los polifenoles pueden jugar un papel importante en la terapia anticancerígena. Sus efectos se han observado en la boca, estómago, duodeno, colon, hígado, y piel, entre otros. Muchos polifenoles, como las proantocianidinas, los flavonoides o el resveratrol han sido estudiados y todos han demostrado efectos protectores en algunos modelos aunque sus mecanismos de acción fueron diferentes (Johnson et al., 1994). Las actividades anticancerígenas de algunos compuestos fenólicos han sido estudiadas ampliamente, y los resultados se recogen en la **Figura 7**.

Polyphenols	Effects
proanthocyanidins	inhibited breast cancer metastasis
anthocyanin	repaired/protected genomic DNA integrity and retarded blood vessel growth in some tumors
epigallocatechin-3-gallate	inhibited proteasome and induced tumor cell death; prevented prostate cancer
gallic acid	prevented colon carcinogenesis by inhibiting DNA damage
2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one	induced apoptosis
resveratrol	inhibited each stage of multistage arcinogenesis; scavenged incipient populations of androgen-dependent/independent prostate cancer cells
ellagitannins	induced apoptosis of human oral tumor cell lines

**Figura 7: Efectos anticancerígenos de algunos compuestos fenólicos.** Tomada de Li et al., 2014.

### 2.2.3 Actividad antiinflamatoria

En los últimos años se nos ha permitido comprender la manera en la que diferentes polifenoles modifican los mecanismos básicos de la respuesta inflamatoria gracias a los modernos métodos de biología molecular y celular. Los polifenoles podrían afectar a la inflamación y el daño vascular no sólo como antioxidantes sino también como moduladores de las vías de señalización inflamatoria redox. Existen

varios mecanismos antiinflamatorios de polifenoles *in vivo*. Uno de ellos es la inhibición de los eicosanoides que generan enzimas incluyendo a la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la ciclooxigenasa (COX). Los polifenoles fueron capaces de modular la actividad de la COX-2 y la expresión génica en diferentes tipos de células **(Kim et al., 2004)**.

#### **2.2.4 Actividad antimicrobiana**

Los polifenoles han demostrado potencial actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral. Fueron capaces de suprimir una serie de factores de virulencia microbiana, como por ejemplo la neutralización de toxinas bacterianas, y además demostraron sinergismo con los antibióticos, potenciando su eficacia, reduciendo la dosis necesaria, y por lo tanto, disminuyendo las reacciones adversas a los antibióticos **(Daglia, 2012)**.

#### **2.2.5 Otras bioactividades de los polifenoles**

Además de las bioactividades explicadas anteriormente, los polifenoles han demostrado otros efectos beneficiosos sobre la salud. Existen evidencias que demuestran que los polifenoles tienen una respuesta protectora en el daño de la piel, eritema y peroxidación lipídica debidas a la exposición a la radiación UV **(Kim et al., 2001)**.

El efecto protector de los polifenoles sobre el riñón también ha sido demostrado. Estos compuestos podrían proteger frente a la rhabdomiolisis tras la inyección de glicerol. Este efecto renoprotector se pudo observar con mucha mayor frecuencia en humanos con consumo crónico de vino tinto **(Rodrigo et al., 2011)**.

La resistencia a la insulina, una característica distintiva de los trastornos metabólicos, es un factor de riesgo para la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. Se obtuvieron resultados que mostraron que algunos polifenoles, como el resveratrol, tuvieron *in vivo* un efecto beneficioso sobre el metabolismo energético en enfermedades como la obesidad provocada por la dieta y la resistencia a la insulina **(Dasgupta y Milbrandt, 2017)**.

### **3. NANOVESÍCULAS**

Las nanovesículas son sistemas coloidales constituidos por una o varias bicapas lipídicas concéntricas, formadas por moléculas anfipáticas como fosfolípidos o tensioactivos, y que contienen en su interior un compartimento acuoso. Dentro de ellas, los niosomas, formados por tensioactivos no iónicos y otros aditivos, han mostrado ser

especialmente útiles para la vehiculización de compuestos por vía oral. Presentan una serie de ventajas para la liberación por esta vía como la resistencia a las condiciones gástricas y el aumento de la biodisponibilidad de los compuestos encapsulados gracias a su absorción a nivel intestinal o colónica (**Tavano et al., 2014**).

Las nanovesículas se están ensayando para el tratamiento de la EII, ya que tienen la ventaja respecto a la terapia convencional de que presentan una mayor adherencia a los tejidos inflamados. Esto se traduce en un aumento de la biodisponibilidad del fármaco a una concentración más baja, minimizando los efectos adversos, con una mejora de la eficacia (**Lozano-Pérez et al., 2014**). La investigación actual se centra en el uso de nanovesículas para la liberación colónica de fármacos, debido a que las convencionales presentan poca resistencia al pH gástrico y a la degradación enzimática. Esto se consigue mediante el recubrimiento de niosomas con determinados polímeros. En este sentido, en un estudio reciente se vehiculizó la quercetina en liposomas recubiertos con quitosán, un polisacárido mucoadhesivo y nutricional, una dextrina derivada del maíz que resiste parcialmente la digestión en el intestino delgado y llega en un 85% inalterada al colon. Este complejo fue así capaz de paliar los síntomas asociados a la colitis experimental (**Castangia et al., 2015**).

## II. Objetivo

El estudio de productos naturales continúa siendo una parte importante en la investigación de nuevos compuestos que pueden dar lugar al desarrollo de fármacos. De entre todos los fitoquímicos, los polifenoles representan uno de los grupos más estudiados, con una amplia variedad de propiedades, incluyendo efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antitumorales, que los hacen ser compuestos parcialmente útiles en el tratamiento de enfermedades de índole inflamatoria como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

El **objetivo general** de este Trabajo Fin de Grado es evaluar el efecto del polifenol RA-303 encapsulado en niosomas recubiertos de nutricional y quitosano en un modelo animal de colitis ulcerosa aguda inducida por la ingestión de dextrano sulfato sódico (DSS) en el agua de bebida.

Este trabajo se ha centrado en los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar las manifestaciones clínicas de la colitis experimental en los ratones.
2. Analizar las lesiones macroscópicas y microscópicas, determinando el grado de infiltración neutrofílica en el colon.
3. Evaluar biomarcadores asociados con la inflamación en el colon como los niveles de citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  y la expresión de la enzima inducible ciclooxigenasa (COX-2).

### III. Material y métodos

#### 1. SUSTANCIAS ENSAYADAS

En este experimento se ha evaluado la eficacia del polifenol RA-303 vehiculizado en nanovesículas a las dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg, suministradas por la empresa Nanovex Biotechnologies (Asturias), comparándolo con el polifenol libre, sin encontrarse vehiculizado a una dosis de 20 mg/Kg. Al mismo tiempo, uno de los grupos fue tratado con ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) a una dosis de 75 mg/kg, como control de referencia.

#### 2. MODELO MURINO DE COLITIS ULCEROSA AGUDA INDUCIDA POR DEXTRANO SULFATO SÓDICO

Las experiencias realizadas se llevaron a cabo de acuerdo con las Guías Institucionales de la Unión Europea relativas al cuidado y uso de animales de laboratorio (Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE) y fueron revisadas por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla.

En este estudio se emplearon ratones macho de la cepa C57BL/6, de 8 semanas de edad, suministrados por los laboratorios Janvier (Francia), recibidos y realojados en las instalaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, y se mantuvieron en condiciones estándares de estabulación a 24-25 °C, doce horas de luz al día y alimentación controlada. Se ha llevado a cabo un modelo de inflamación en el colon, basándose en los estudios previos que demuestran que la administración de DSS al 4% en el agua de bebida a los animales durante 7 días consecutivos induce una colitis aguda manifestada por ulceración de la mucosa del colon, acortamiento del mismo,

diarrea sanguinolenta y edema acompañada de una gran infiltración neutrofílica (**Perse y Cerar, 2012**).

## 2.1 Inducción de la colitis ulcerosa aguda y tratamientos

⇒ Grupos de animales ensayados

La inflamación aguda del colon fue inducida mediante la administración de DSS al 4% p/v siguiendo la técnica de **Perse y Cerar (2012)**. Tras un periodo de aclimatación, los ratones fueron separados aleatoriamente en 8 grupos experimentales conteniendo cada uno de ellos 10 ratones. Todos los grupos fueron pretratados, durante los tres días previos a la administración del DSS, con las sustancias asignadas para cada uno de ellos. Los diferentes tratamientos fueron administrados por vía oral mediante sonda intragástrica, en días alternos y de manera simultánea a la toma del DSS al 4% p/v en el agua de bebida (**Figura 8**).

-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
PT	PT	PT	DSS T	DSS	DSS T	DSS	DSS T	DSS	DSS T	S

**Figura 8: Esquema de los días de tratamiento del modelo.** Abreviaturas: PT, pretratamiento; T, tratamiento; S, sacrificio.

- 1. Control sano:** Los ratones recibieron la nanovesícula vacía recubierta por quitosán y nutriosa (a este grupo no se le administró DSS).
- 2. Control DSS puro:** Los ratones fueron tratados con la nanovesícula vacía recubierta por quitosán y nutriosa.
- 3. Control DSS:** Este grupo fue tratado únicamente con el vehículo (PBS).
- 4. DSS+5-ASA:** Los ratones fueron tratados con ácido 5-aminosalicílico a una dosis de 75 mg/Kg.
- 5. DSS+RA:** Los ratones fueron tratados con el polifenol libre a una dosis de 20 mg/Kg.
- 6. DSS+RA vehiculizado en nanovesículas:** Los ratones de los tres últimos grupos, fueron tratados con el polifenol vehiculizado en nanovesículas a dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg respectivamente.

Los animales fueron pesados y examinados diariamente con el fin de encontrar evidencias de inflamación en el colon. Al octavo día de la toma simultánea de DSS y el tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se extrajo el colon de cada animal para el análisis macroscópico, histológico y bioquímico.

### 3. EVALUACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LA COLITIS Y ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES

Durante todo el periodo experimental se valoraron las manifestaciones clínicas de la colitis para la determinación del índice de la actividad de la enfermedad (DAI), el cual engloba la presencia de diarrea, el sangrado rectal y la pérdida peso de los animales. Estos 3 parámetros se evaluaron por separado en una escala de 0 a 3 según el método propuesto por **Gommeaux et al., 2007 (Figura 9)** y el promedio de los 3 valores constituyó el DAI.

Escala	Sangrado	Pérdida de peso (%)	Consistencia de heces
0	Ninguno	<1	Deposiciones normales
1	Pequeñas manchas de sangre en heces; región anal sin sangre	1-4.99	Heces blandas no adheridas al ano
2	Grandes manchas de sangre en heces; sangre en orificio anal	5-10	Heces muy blandas adheridas al ano
3	Heces totalmente hemorrágicas; sangre extendida por todo el ano	>10	Diarrea intensa

**Figura 9: Escala propuesta por Gommeaux et al., 2007 para la determinación del índice de la actividad de la enfermedad (DAI).**

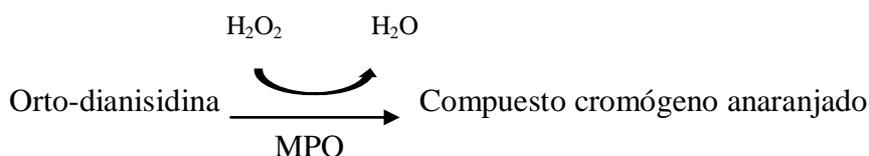
### 4. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MIELOPEROXIDASA

Los neutrófilos están implicados en distintas alteraciones gastrointestinales, entre las que se encuentra la CU. Estos leucocitos migran a la zona inflamada y se transforman en células que producen radicales libres de oxígeno, entre otros compuestos, que acaban produciendo el daño en el tejido (**Bjarnason et al., 1993**).

La determinación de la actividad de una de las proteínas constitutivas de los neutrófilos, como es la mieloperoxidasa (MPO), es un método adecuado para cuantificar el grado de infiltración de leucocitos en la zona inflamada. Esta enzima es liberada a los fluidos extracelulares, donde oxida a haluros y tiocianatos formándose los

correspondientes ácidos hipohalurosos, que entre otras actividades, participan en la génesis de potentes oxidantes como las cloraminas.

Para la medida de esta actividad enzimática se siguió el método propuesto por Bradley (**Bradley et al., 1982**), basado en la oxidación, dependiente de  $H_2O_2$ , usado como donador de hidrógeno, de un donador artificial de electrones, orto-dianisidina, con producción de un cromógeno de color naranja cuya absorbancia se mide por espectrofotometría a 450 nm (**Figura 10**).



**Figura 10: Reacción enzimática de la MPO sobre la orto-dianisidina en presencia de  $H_2O_2$ .**

Para la realización de esta técnica, las muestras fueron homogeneizadas en tampón fosfato potásico y centrifugadas (4800 rpm, 40 minutos, 4°C). El precipitado se volvió a homogeneizar en 10 volúmenes de tampón fosfato potásico pH 6.0, que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HETAB) 0.5% y EDTA 10 mM. La adición de HETAB ayudó a solubilizar completamente la MPO presente en las membranas. Seguidamente, el homogeneizado se sometió a un ciclo de congelación-descongelación, y a una sonicación de 2 a 3 segundos, lo cual favoreció la liberación total de la enzima.

Para la determinación espectrofotométrica, se pipetearon en una microplaca 50  $\mu$ L de las distintas muestras homogeneizadas en tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.0. Posteriormente, se añadieron consecutivamente 50  $\mu$ L de los diferentes reactivos, o-dianisina al 0.067 %,  $H_2O_2$  al 0.003% y HETAB 0.5%, y tras un tiempo de incubación de 5 minutos se midió la absorbancia en un lector de placa Labsystems Multiskan Ex. (Helsinki, Finlandia) a 450 nm. Los resultados se expresaron como Unidades de actividad enzimática por miligramo de tejido (U/mg tejido).

## **5. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS MEDIANTE ELISA**

Los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF-  $\alpha$  e IL-6 fueron determinados mediante una técnica de inmunoálisis enzimático cuantitativo (ELISA).

Las muestras de colon fueron homogeneizadas en PBS a pH 7.2 conteniendo EDTA 0.5 mM, pepstatina 0.01 mg/mL, aprotinina 0.01 mg/mL, leupeptina 0.01 mg/mL, y PMSF 1 mM a 4°C durante 20 segundos. Posteriormente, se centrifugaron a 12,000 g a 4°C durante 10 minutos, y los sobrenadantes se conservaron a -80°C hasta su uso.

Las cuantificaciones de los niveles de citocinas se realizaron siguiendo las instrucciones del kit comercial para cada una de ellas (Peprotech, USA). Los diferentes patrones y las muestras se pipetearon en pocillos recubiertos de un anticuerpo monoclonal específico para cada citocina en estudio. Tras el lavado, se adicionó un anticuerpo policlonal específico para la citocina unido a una peroxidasa y los sustratos, peróxido de hidrógeno y 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB). La reacción enzimática produjo un color azul que cambió a amarillo tras la adición de ácido sulfúrico 1M. La intensidad de color se midió a 450 nm en lector de placa Labsystems Multiskan Ex.

## **6. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT**

Los niveles de expresión proteica se midieron en las muestras de tejido colónico, pesadas y homogeneizadas en frío con tampón de lisis (Tris HCl 50 mM, pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, ácido etilen glicol-bis ( $\beta$ -aminoetiléter) tetracético (EGTA) 5 mM, EDTA 0.5 mM, leupeptina 0.01 mg/mL, pepstatina 0.01 mg/mL, aprotinina 0.01 mg/mL, fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM y NaCl 250 mM). Los homogeneizados fueron centrifugados (12,000 g, 15 min, 4°C) y los sobrenadantes fueron recogidos y mantenidos a -80°C. Para determinar la concentración de proteínas de los homogeneizados fue usado el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). El volumen de homogeneizado correspondiente a 50  $\mu$ g de proteínas se mezcló con el volumen necesario del reactivo de Laemmli (glicerol 10%, dodecil sulfato sódico (SDS), 10%, azul de bromofenol 0.02% y  $\beta$ -mercaptoetanol 2%, en tampón Tris 1 M pH 6.8). Posteriormente, se desnaturalizaron las proteínas mediante incubación durante 10 minutos en un termobloque a 100°C.

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS/PAGE (gel de electroforesis de acrilamida)), empleando geles discontinuos de acrilamida formados por un gel de empaquetamiento (5%) y otro gel de separación (10%). El gel de separación contenía acrilamida al 10%, persulfato de amonio (PSA)0.1%, SDS 0.1% y N,N,N',N' tetrametil etilendiamina (TEMED), 0.066% en Tris-HCl 1 M pH 8.8. El gel de empaquetamiento contenía acrilamida 5%,

PSA 0.1%, SDS 0.1% y TEMED 0.1% en Tris-HCl 1M pH 6.8. Las muestras desnaturalizadas se sometieron a electroforesis en una cubeta Mini Protean® Tetra Cell (Bio Rad, USA) a 60 voltios y temperatura ambiente, con un tampón de electroforesis compuesto por Trizma base 0.3%, glicina 1.88% y SDS 20%. Se emplearon como marcadores de masa molecular proteínas pre-teñidas de masa molecular conocida (BIO Rad, USA).

A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (1.5 horas, 4°C, 100 voltios, 0.35 amperios) en un aparato Mini Trans-Blot® Cell (Bio Rad, USA) con el tampón correspondiente (Trizma base 0.3%, glicina 1.88%, SDS 20% y etanol 96° al 25%). El grado de efectividad de la transferencia se monitorizó mediante la tinción de la membrana con Rojo Ponceau. Posteriormente, se incubó la membrana durante 2 horas con leche en polvo al 5% en solución octilfenilpolietilenglicol (Nonidet® NP-40, 0.5%) en PBS (pH 7.4) para bloquear las uniones no específicas. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario policlonal COX-2 (Cell Signaling, USA) a la dilución 1:1000, en leche en polvo al 5%, durante toda la noche a 4°C.

Tras varios lavados en NP-40 y PBS pH 7.4, se procedió a la incubación, durante 1.5 horas, con el anticuerpo secundario diluido en leche en polvo al 5%. El anticuerpo secundario usado fue Goat Anti-rabbit Ig G (H+L) HRP conjugated (Pierce, USA) a la dilución 1:1000.

Para comprobar la misma carga de proteína en todos los pocillos, se analizó la expresión de  $\beta$ -actina, la cual es una proteína constitutiva, usando un anticuerpo anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, USA) que se detectó con el anticuerpo secundario: Polyclonal Goat Anti-mouse Ig G/HRP (DakoCytomation, USA).

Para finalizar, el revelado de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó mediante un kit derevelado de quimioluminiscencia (SuperSignal-West Pico Chemiluminescent Substrate) suministrado por Pierce (USA).

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

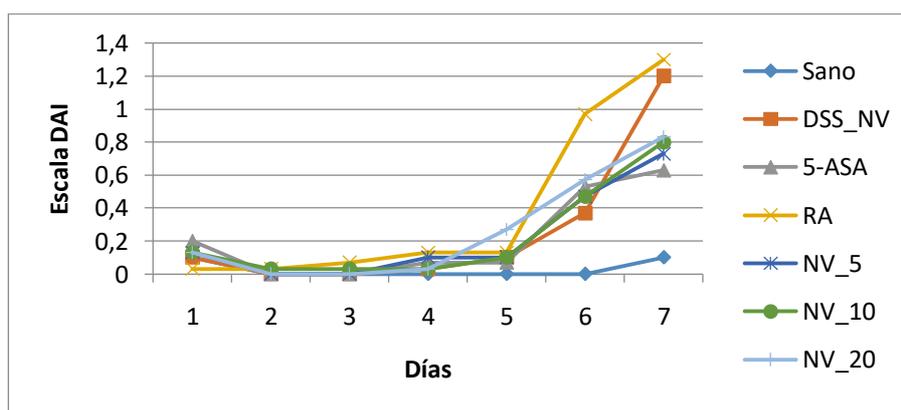
Todos los valores que aparecen en las figuras y en el texto están expresados como la media  $\pm$  error estándar de las valoraciones obtenidas en las muestras ensayadas. Los datos se han tratado con el programa GraphPad 5.0. En todos los casos, se usaron los tests D'Agostino-Pearson, Shapiro Wilk y Kolmorov-Smirnov para verificar la

normalidad de los datos. En poblaciones múltiples, con diferentes medias, se analizó la varianza de las mismas mediante el test ANOVA de una rama, comparando dichas medias mediante el test de Bonferroni. Un valor de p igual o menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

## IV. Resultados

### 1. VALORACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLITIS

La administración de DSS al 4% en el agua de bebida de los animales durante 7 días, dio lugar a una colitis aguda experimental, con evidentes síntomas clínicos, incluyendo la pérdida de peso de los animales, diarrea y sangre en heces. Estos parámetros se representan en la **Figura 11** que muestra el índice de actividad de la enfermedad (DAI). Los valores del DAI aumentaron significativamente al compararlo con los valores del grupo sano. Sin embargo, el empleo del polifenol encapsulado mejoró los valores de la escala DAI, con todas las dosis ensayadas, a diferencia del polifenol sin encapsular, que como se aprecia muestra valores parecidos a los del grupo control DSS tratado con la nanovesícula vacía.



**Figura 11: Valores de DAI de los distintos grupos con colitis aguda producida por dextrano sulfato sódico (DSS 4% p/v), tratados con el polifenol libre y encapsulado a dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg.**

El acortamiento de la longitud del colon fue seleccionado como parámetro morfológico de inflamación colónica. En la **Figura 12** se muestran fotografías representativas del tamaño del colon de los distintos grupos de animales.

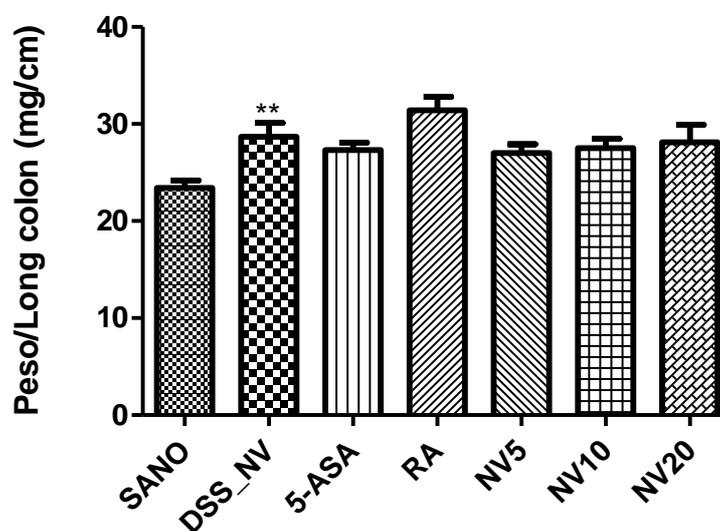


**Figura 12: Aspecto macroscópico del colon de ratones con colitis aguda producida por dextrano sulfato sódico (DSS 4% p/v) y tratados con los distintos tratamientos.** Abreviaturas: DSS NV, control DSS tratado con nanovesícula vacía; RA, grupo tratado con RA-303; 5-ASA, grupo tratado con ácido 5-aminosalicílico; NV-5, 10, 20, grupos tratados con nanovesículas conteniendo una dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg del polifenol respectivamente.

Como se puede observar en las imágenes, los grupos que sufrieron un acortamiento más acusado fueron el grupo control DSS puro y el grupo que recibió el polifenol sin encapsular, mientras que en el grupo tratado con el fármaco tradicional (5-ASA) y en los grupos que recibieron el polifenol encapsulado en distintas dosis, se consiguió paliar la reducción de la longitud del colon.

Como se muestra en la **Figura 13**, el tratamiento tradicional consiguió mejorar la relación peso/longitud del colon, al igual que el tratamiento con el polifenol encapsulado, siendo la dosis de 5 mg/Kg la que presenta mejores resultados, no obstante, estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Como se observa, el

grupo tratado con el polifenol libre apenas tuvo mejoría, incluso presenta valores de daño superiores a los del grupo control DSS con nanovesícula.



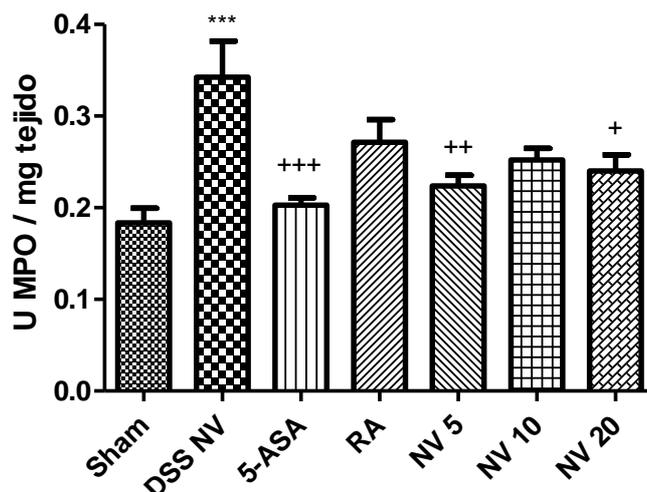
**Figura 13: Relación peso/longitud del colon (mg/cm) de ratones con colitis aguda por dextrano sulfato sódico (DSS 4%) y tratados con los distintos tratamientos.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar (n=10). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (\*\*) $p < 0.01$  vs. Control sano.

Abreviaturas: DSS NV, control DSS tratado con nanovesícula vacía; RA, grupo tratado con RA-303; 5-ASA, grupo tratado con ácido 5-aminosalicílico; NV-5, 10, 20, grupos tratados con nanovesículas conteniendo una dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg del polifenol respectivamente.

## 2. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA MUCOSA COLÓNICA

### 2.1 Actividad de la enzima mieloperoxidasa

Los resultados de este estudio colorimétrico, como medida directa del grado de infiltración neutrofílica en las muestras de mucosa colónica, indicaron que en el grupo tratado con DSS aumentó significativamente la actividad enzimática MPO con respecto a los animales sanos ( $p < 0.001$ ) (**Figura 14**). Tanto el 5-ASA como el tratamiento con el polifenol atenuaron significativamente el valor de este parámetro, siendo más efectivo en el caso de los grupos que recibieron el polifenol encapsulado a las dosis de 5 y 20 mg/kg.

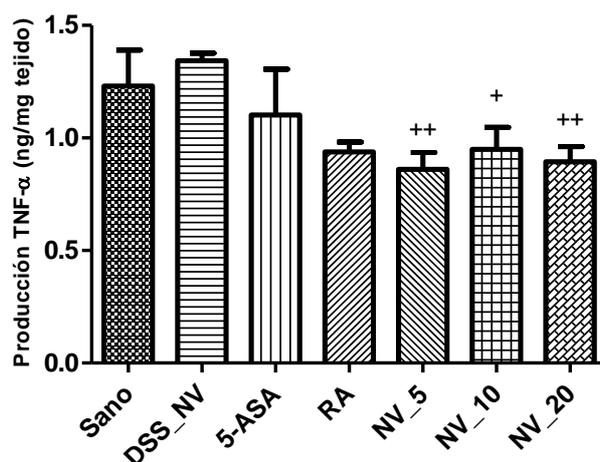


**Figura 14:** Actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO) en la mucosa colónica de ratones con colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS 4% p/v) y tratados con los distintos tratamientos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar (n=10). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. Sano; (+++)  $p < 0.001$ , (++)  $p < 0,01$  y (+)  $p < 0.05$  vs. DSS NV. Abreviaturas: DSS NV, control DSS tratado con nanovesícula vacía; RA, grupo tratado con RA-303; 5-ASA, grupo tratado con ácido 5-aminosalicílico; NV-5, 10, 20, grupos tratados con nanovesículas conteniendo una dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg del polifenol respectivamente.

## 2.2 Producción de la citocina TNF- $\alpha$

Los niveles de producción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en muestras de mucosa colónica se determinaron mediante la técnica de ELISA.

Los resultados correspondientes a la producción de TNF- $\alpha$  pusieron de manifiesto que la administración oral del polifenol encapsulado a las dosis de 5, 10 y 20 mg /Kg consiguieron reducir significativamente los niveles de TNF-  $\alpha$  en relación al grupo DSS (**Figura 15**).

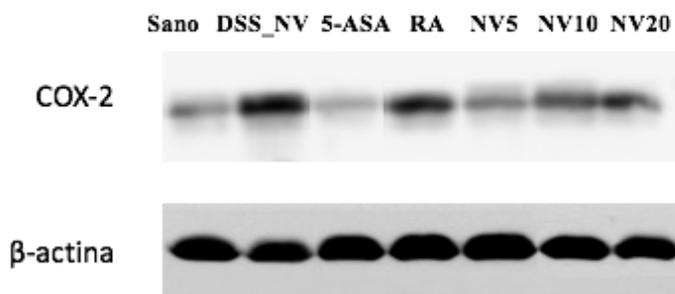


**Figura 15: Niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , ng/mg tejido) en la mucosa colónica de ratones con colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS 4% p/v) y tratados con los distintos tratamientos.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar (n=10). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (+)  $p < 0.05$  y (++)  $p < 0.01$ , vs. DSS NV. Abreviaturas: DSS NV, control DSS tratado con nanovesícula vacía; RA, grupo tratado con RA-303; 5-ASA, grupo tratado con ácido 5-aminosalicílico; NV-5, 10, 20, grupos tratados con nanovesículas conteniendo una dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg del polifenol respectivamente.

### 2.3 Expresión proteica de COX-2 en los tejidos de colon aislado

La expresión de la proteína COX-2 se determinó mediante la técnica de Western Blot y los resultados se muestran en la **Figura 16**.

Los niveles de expresión de la enzima COX-2 fueron muy elevados en el colon de ratones sometidos a colitis aguda por DSS respecto al grupo control sano, en el que la proteína era detectada a niveles basales. Tras el tratamiento con el polifenol libre no se detectaron cambios importantes en la expresión de COX-2 respecto al grupo DSS. No obstante, el polifenol encapsulado sí fue capaz de reducir los niveles de esta proteína con todas las dosis ensayadas. Los resultados que se muestran son datos obtenidos en un estudio preliminar, por lo que sería necesario realizar estudios futuros para completar estos resultados.



**Figura 16: Expresión de la proteína ciclooxigenasa-2 (COX-2) en la mucosa colónica de ratones con colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS 4% p/v) y tratados con los distintos tratamientos.** Abreviaturas: DSS NV, control DSS tratado con nanovesícula vacía; RA, grupo tratado con RA-303; 5-ASA, grupo tratado con ácido 5-aminosalicílico; NV-5, 10, 20, grupos tratados con nanovesículas conteniendo una dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg del polifenol respectivamente.

## V. Discusión

La EII es una patología que afecta a un porcentaje bastante importante y creciente de la población mundial, siendo mayor la incidencia en aquellos países con un alto nivel de desarrollo industrial. Se trata de una patología crónica y recidivante, que incluye a la CU y la EC y de la cual aún no se conoce su etiología. Investigaciones recientes sugieren que se desarrolla como consecuencia de una respuesta exagerada e incontrolada del sistema inmune, lo que da lugar a una inflamación de la mucosa intestinal, en aquellos individuos que son genéticamente susceptibles y a lo que se le une una mezcla de factores medioambientales, microbiológicos e inmunológicos. El objetivo principal del tratamiento de estas patologías es conseguir la remisión clínica, del paciente y mantener la nutrición, así como reducir la duración y el número de las recaídas.

En la actualidad se están evaluando nuevos tratamientos para estas patologías con base inflamatoria. La atención está puesta en compuestos de origen natural, que representan una fuente importante de compuestos base útiles para el desarrollo de nuevos fármacos. Dentro de estos productos naturales, se pueden destacar los polifenoles que son un grupo heterogéneo de sustancias químicas, que tienen en común grupos fenoles en su estructura y que se encuentran presentes en frutas y verduras. Estos

compuestos han mostrado tener efectos beneficiosos para la salud debido a sus actividades como son la antiinflamatoria, antioxidante o antitumoral.

Numerosas investigaciones han descrito el efecto beneficioso de los polifenoles en distintos modelos experimentales de EII (**Nunes et al., 2017; Salaritabar et al., 2017**). En este sentido, algunos estudios recientes han mostrado que el tratamiento con un extracto rico en polifenoles de *Ocimum gratissimum* es prometedor en el tratamiento de la CU, promoviendo la reparación del daño en la mucosa colónica (**Alabi et al., 2018**). Otros estudios han demostrado el efecto preventivo de la microalga *Chlamydomonas debaryana* en la fase aguda de la CU en ratas (**Ávila-Román et al., 2014**). Sin embargo, es necesario profundizar en los mecanismos moleculares asociados a estos efectos.

En base a estos antecedentes, el objetivo de nuestras investigaciones fue evaluar las propiedades del polifenol RA-303 encapsulado en niosomas recubiertos de nutriosina y quitosano para avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la inflamación que ocurre en un modelo animal de colitis ulcerosa aguda inducida por la ingestión de DSS en el agua de bebida.

Nuestros resultados mostraban que la administración de DSS al 4% en el agua de bebida de los animales durante 7 días reprodujo una colitis aguda experimental, coincidente con una pérdida de peso de los animales y un acortamiento del colon. El tratamiento con el polifenol encapsulado a distintas dosis inhibió la pérdida de peso y el acortamiento del colon, siendo más claro el efecto en el caso de la dosis más baja llegando incluso al mismo nivel que el tratamiento con 5-ASA.

La respuesta inflamatoria producida por el DSS provoca la activación de células Th1, de forma similar a lo que ocurre en la CU, iniciándose el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos (**Hsiung et al., 2014**). Debido a que el infiltrado celular tiene un papel importante en la EII, su control es extremadamente importante para la atenuación de esta enfermedad. Los niveles de actividad MPO son usados como una medida cuantitativa de la respuesta inflamatoria neutrofílica en una gran variedad de estudios experimentales. En nuestro estudio, se confirmó cómo el DSS aumentaba significativamente la actividad de la enzima MPO. El tratamiento con el polifenol encapsulado, redujo el grado de infiltración, siendo más efectivo cuando se administró la dosis más baja. Hallazgos similares se han descrito en animales que sufrían colitis y

que fueron tratados con magnolol (**Zhao et al., 2017**) o con un extracto de polifenoles del té verde (**Mazzon et al., 2009**).

Las células inmunes participan activamente en las respuestas inflamatoria e inmune de la mucosa mediante la producción de citocinas como el TNF- $\alpha$ , el cual tiene un papel crucial en el inicio y mantenimiento de la inflamación e inmunidad de la mucosa en la EII. Esta citocina está implicada en varios procesos celulares como la apoptosis o la inflamación. Una de las principales acciones del TNF- $\alpha$  es la inducción de moléculas de adhesión y de la expresión de quimiocinas dando lugar a un influjo de células inflamatorias. Un estudio previo mostró altos niveles de TNF- $\alpha$  en el plasma y la mucosa colónica de pacientes con EII (**Komatsu et al., 2001**). En nuestro estudio, dichos niveles se vieron reducidos al tratar a los animales con las dosis de RA-303, como ocurrió en otro estudio en el que se indujo la colitis con TNBS y se trató a los animales con las antocianinas de *Dioscorea alata* L. (**Chen et al., 2017**).

La enzima inducible COX-2 es un gen de respuesta temprana inmediata que normalmente se encuentra ausente en la mayoría de las células, pero que se induce principalmente en los sitios de inflamación en respuesta a estímulos inflamatorios como los producidos por el TNF- $\alpha$  (**Kanwar et al., 2009**). Esta enzima proinflamatoria está aumentada en la colitis experimental y en la EII humana activa, generando una gran cantidad de productos implicados en el daño oxidativo y la inflamación (**Yasukawa et al., 2012**). En el presente estudio, el daño del colon se asoció con una alta expresión de esta proteína. Sin embargo, el polifenol encapsulado administrado vía oral disminuyó la expresión de esta enzima en el tejido colónico después de la administración aguda de DSS. Resultados similares fueron obtenidos por **Sakthivel y Guruvayoorappan (2013)** tras la administración de amentoflavona, un biflavonoide, a ratas con CU. Lo mismo ocurrió al tratar ratones con colitis ulcerosa con polisacáridos de *Hericium erinaceus* (**Ren et al., 2018**).

En base a todo lo expuesto, nuestro estudio demuestra que los polifenoles, a pesar de ser un grupo muy heterogéneo y complejo, presentan una gran cantidad de propiedades muy interesantes para el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que podemos encontrar las de carácter inflamatorio. Hemos demostrado por primera vez el efecto beneficioso y las ventajas de encapsular el polifenol RA-303 para el tratamiento de la EII. Son necesarios estudios futuros para ampliar la visión de los efectos y mecanismos mediante los cuales estos compuestos mejoran la colitis

experimental y así apoyar el uso de los polifenoles como tratamiento de la EII.

## VI. Conclusiones

1. El polifenol RA-303 encapsulado en nanovesículas atenuó los signos externos de la colitis, tales como la presencia de diarrea, el sangrado rectal y la pérdida de peso, así como también disminuyó el acortamiento del colon observado en los animales que recibieron DSS.
2. El tratamiento con el polifenol indujo una importante reducción en el infiltrado neutrofílico, evidenciado por el descenso en la actividad de la enzima MPO, así como en los niveles de la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ .
3. Entre los mecanismos implicados destaca el descenso en la expresión de la enzima COX-2.
4. El tratamiento con el polifenol RA-303 vehiculizado en nanovesículas resultó ser más efectivo que cuando se encuentra en la forma libre, e interesantemente, la dosis de 5 mg/Kg demostró mejores resultados que las dosis mayores.

## VII. Bibliografía

Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol.* 2018;0(0):1–11.

Alabi QK, Akomolafe RO, Omole JG, Adefisayo MA, Ogundipe OL, Aturamu A, et al. Polyphenol-rich extract of *Ocimum gratissimum* leaves ameliorates colitis via attenuating colonic mucosa injury and regulating pro-inflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2018;103:812–22.

Ávila-Román J, Talero E, Alcaide A, De Los Reyes C, Zubía E, García-Mauriño S, et al. Preventive effect of the microalga *Chlamydomonas debaryana* on the acute phase of experimental colitis in rats. *Br J Nutr.* 2014;112(7):1055–64.

Basso P.J, Fonseca M.T.C, Bonfá G, Alves V.B.F, Sales-Campos H, Nardini V, Cardoso C.R.B.. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2014; 47(9): 727-37.

Berg D, Clemente JC, Colombel JF. Can inflammatory bowel disease be permanently treated with short-term interventions on the microbiome? *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology.* 2015; 9:781–95.

Bernink JH, Peters CP, Munneke M, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol.* 2013;14:221-9.

Bjarnason I, Hayllar J, MacPherson AJ Russell AS. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology.* 1993; 104: 1832-47.

Bradley PP, Christensen RD Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood.* 1982; 60:618-22.

Castangia I, Nácher A, Caddeo C, Merino V, Díez-Sales O, Catalán-Latorre A, et al. Therapeutic efficacy of quercetin enzyme-responsive nanovesicles for the treatment of experimental colitis in rats. *Acta Biomater.* 2015;13:216–27.

Chandrasekara A, Shahidi F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 2010; 58: 6706-14.

Chen T, Hu S, Zhang H, Guan Q, Yang Y, Wang X. Anti-inflammatory effects of *Dioscorea alata* L. anthocyanins in a TNBS-induced colitis model. *Food Funct.* 2017;8(2):659–69.

Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012; 23: 174–81.

Dasgupta, B.; Milbrandt, J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 7217–22.

De Souza HSP. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: Today and tomorrow. *Curr Opin Gastroenterol.* 2017;33(4):222–9.

Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2:731–43.

Fundación Española del aparato Digestivo. Información al paciente, servicio de gastroenterología. Hospital universitario Ramón y Cajal, Madrid [en línea]. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: [www.saludigestivo.es](http://www.saludigestivo.es)

Geier MS, Butler RN, Giffard PM, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and symbiotics. *Int J Food Microbiol.* 2007;115:1-11.

Ghosh N, Chaki R, Mandal SC. Inhibition of selective adhesion molecules in treatment of inflammatory bowel disease. *Int Rev Immunol.* 2012; 31:410-27.

Gil Hernández A, Sánchez de Medina Contreras F. Tratado de nutrición. *Medicina Panamericana*;2010.

Gkouskou KK, Deligianni C, Tsatsanis C, Eliopoulos AG. The gut microbiota in mouse models of inflammatory bowel disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2014; 4:28.

Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pébusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, Carrier A. Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol.* 2007;27:2215-28.

Hoon Lee S, Eun Kwon J, Mi-La C. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res.* 2018; 16(1):26-42.

Hsiung YC, Liu JJ, Hou YC, Yeh CL, Yeh SL. Effects of dietary glutamine on the homeostasis of CD4+ T cells in mice with dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *PLoS One.* 2014; 9:e84410:1-10.

Johnson, I.T.; Williamson, G.; Musk, S.R. Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients. *Nutr. Res. Rev.* 1994; 7: 175–204.

Kamada N, Seo SU, Chen GY, Nunez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology.* 2013; 13:321–35.

Kim DH, Cheon JH. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune Netw.* 2017;17(1):25.

Kim, H.P.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 2004; 96: 229–45.

Kim, J.; Hwang, J.S.; Cho, Y.K.; Han, Y.; Jeon, Y.J.; Yang, K.H. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB-induced skin damage. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2001; 14: 11–9.

Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, et al. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem* 47. 2001;1297–301.

Kotze PG, Ma C, Almutairdi A, Panaccione R. Clinical utility of ustekinumab in Crohn ' s disease. *Journal of inflammation research.* 2018; 35–47.

Lawson MM, Thomas AG, Akobeng AK. Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis [review]. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 3.

Li A, Li S, Zhang Y, Xu X, Chen Y, Li H. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. 2014;6020–47.

Lozano-Pérez AA, Ortiz-cullera V, Zorrilla P, Rodriguez- ME, Cenis JL. Silk fibroin nanoparticles constitute a vector for controlled release of resveratrol in an experimental model of inflammatory bowel disease in rats. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9 :4507–20.

Mantzaris GJ. Thiopurines and Methotrexate Use in IBD Patients in a Biologic Era. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2017;15(1):84–104

Mazzon E, Muià C, Di Paola R, Genovese T, Menegazzi M, De Sarro A, et al. Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radic Res*. 2005;39(9):1017–25.

Mosli MH, Feagan BG. Vedolizumab for Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2013; 13:455-63.

Nunes S, Danesi F, Del Rio D, Silva P. Resveratrol and inflammatory bowel disease: the evidence so far. *Nutr Res Rev*. 2017;1–13.

Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 718617-29.

Powell N, Walker AW, Stolarczyk E, et al. The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells. *Immunity*. 2012;37:674-84.

Ren Y, Geng Y, Du Y, Li W, Lu Z, Xu H, et al. Polysaccharide of *Hericium erinaceus* attenuates colitis in C57BL / 6 mice via regulation of oxidative stress, inflammation-related signaling pathways and modulating the composition of the gut microbiota. *J Nutr Biochem*. 2018;57:67–76.

Rodrigo, R.; Miranda, A.; Vergara, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta* 2011; 412: 410–24.

Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2

expression and modulates cytokine profile, NF- $\kappa$ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(3):907–16.

Salaritabar A, Darvishi B, HadjiakhoonDi F, Manayi A, Sureda A, Nabavi SF, et al. Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel Disease: A comprehensive review. *World J Gastroenterol.* 2017;23(28):5097–114.

Sato, M.; Ramarathnam, N.; Suzuki, Y.; Ohkubo, T.; Takeuchi, M.; Ochi, H. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 37–41.

Shanahan F. Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10 Suppl 1: S16-S24.

Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 1997; 337:1029-35.

Tavano L, Muzzalupo R, Picci N, De Cindio B. Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: Gastrointestinal release studies for nutraceutical applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;114:82–8.

Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231–46.

Yamamoto-Furusho J. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease: understanding treatment response and personalizing therapeutic strategies. *Pharmgenomics Pers Med.* 2017; 10:197–204.

Yasukawa K, Tokuda H, Tun X, et al. The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Res.* 2012; 46: 1427–36.

Zhao L, Xiao H, Mu H, Huang T, Lin Z, Zhong L, et al. Magnolol, a Natural Polyphenol, Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Molecules.* 2017;22(7):1218.