

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de
flavonoides. *Caenorhabditis elegans* y líneas celulares
como sistemas modelo.**

Laura Delgado Ciruelos

Salamanca, 2015



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA

Campus Miguel de Unamuno-37007 Salamanca
Teléf.: 923 294537 – Fax: 923 294515
e-mail: nutr@usal.es

Celestino Santos Buelga, Catedrático de Nutrición y Bromatología, Ana M. González Paramás, Profesora Titular de Nutrición y Bromatología y Susana González Manzano, Profesora Ayudante Doctor de la Universidad de Salamanca, directores del trabajo "*Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de flavonoides. Caenorhabditis elegans y líneas celulares como sistemas modelo*", realizado por **Laura Delgado Ciruelos** para optar al título de Doctor, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 15 de octubre de 2015

Celestino Santos Buelga

Ana M. González Paramás

Susana González Manzano



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**DPTO. QUIMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA**

Campus *Miguel de Unamuno*-37007 Salamanca
Teléf.: 923 294537 – Fax: 923 294515
e-mail: nutr@usal.es

M. Angeles Castro González, Coordinadora del Programa de Doctorado "Diseño, evaluación y obtención de fármacos" de la Universidad de Salamanca, informa que D^a Laura Delgado Ciruelos ha realizado el trabajo titulado "*Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de flavonoides. Caenorhabditis elegans y líneas celulares como sistemas modelo.*", " bajo la dirección de los doctores Celestino Santos Buelga, Ana M. González Paramás y Susana González Manzano y estima, como tutora, que el mencionado trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Salamanca, 15 de octubre de 2015

M. Angeles Castro González

AGRADECIMIENTOS

Tras el largo proceso que culmina con esta tesis doctoral me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible, tanto de manera directa como indirecta, la finalización de este trabajo.

En primer lugar al Dr. Celestino Santos Buelga, director de este trabajo, por acogirme en su departamento y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación durante estos años.

A la Dra. Susana González Manzano y la Dra. Ana María González Paramás directoras de esta tesis, por sus consejos y constante disposición, por ayudarme con su experiencia y por seguir de cerca mi trabajo a lo largo de estos años.

Me gustaría agradecer también la colaboración de la Dra. María Ángeles Castro, por ser cotutora de este trabajo mostrar interés y disposición para la lectura de esta tesis.

Por otra parte no puedo dejar de hacer mención al Dr. Nuno Mateus y a la Dra. Iva Fernandes, así como al Dr. Víctor de Freitas, ya que mi estancia en su laboratorio ha permitido desarrollar un capítulo de esta tesis doctoral, por lo que me siento enormemente agradecida.

Quisiera hacer una mención muy especial para la Dra. Montserrat Dueñas, por ser amiga y compañera tanto dentro como fuera del departamento y por ayudarme siempre con total sinceridad y disposición, ¡gracias Montse!

A todos los profesores del departamento: Concha, Maite, Julián, César, Pilar, Milagros, Alfonso, María Jesús, y Rafael con los que he compartido mi estancia en el departamento durante estos cuatro años, por su interés y amabilidad.

A las compañeras y compañeros de laboratorio: Felipe, Matilde, Rebeca, Nacho, Natalia, Begoña, José Miguel, Raúl, José Luis, Cristina, José Joaquín y María José, por los buenos ratos y por haberme animado y ayudado en todo lo posible durante mi estancia en Salamanca.

Un agradecimiento muy especial y con mucho cariño a mis compis de piso, tanto a Sofía como Virginia, que desde el principio me acogieron y me ayudaron en todo, como a Paula por las risas y buenos ratos que hemos pasado, por esos debates y charlas después de cenar sobre política, bellas artes y asesinos en serie ☺.

Cómo no mencionar a los profes del máster, con los que aprendí muchas cosas, sobre todo los diferentes caminos que puede llevar un investigador y los diferentes puntos de vista de la ciencia.

Pero si hay a alguien a quién quiero hacer mención es al Dr. Adolfo Sánchez Blanco, por su total disposición a la hora de resolver dudas, por sus magnificas charlas didácticas y por hacerme ver la ciencia como un cuento, y despertar mi curiosidad investigadora.

Al Dr. Juan Cabello y todo su equipo, por haberme ayudado en los ensayos con el gusano y por haberme enseñado un trocito de Logroño.

A mis amigos, los de Madrid, por estar ahí, por escucharme y comprenderme, por darme ánimos y por lo pesada que he sido durante este tiempo.

Pero sobre todo y por encima de todo, quiero agradecer a mi familia y a Luis todo el apoyo incondicional que me han dado, por hacerme sonreír en los momentos más difíciles, por enseñarme que la vida está llena de colores y mostrarme alternativas, por ser mis compañeros de viaje, ya que sin su apoyo este trabajo nunca hubiese llegado a su fin.

Y bueno... espero no olvidarme de nadie, y si lo hago que no lo tenga en cuenta (soy muy despistada). Muchas gracias a todos!

*A mi familia ,
por apoyar cada proyecto en mi vida de manera incondicional.*

*A Luis,
por hacerme sonreír y llenarme de amor cada mañana.*

El trabajo expuesto en la presente memoria ha dado lugar hasta la fecha a las siguientes publicaciones científicas y participaciones en congresos tanto internacionales como nacionales:

Publicaciones:

Gonzalez-Manzano, S.; Gonzalez-Paramas, A.M.; Delgado, L.; Patianna, S.; Surco-Laos, F.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C. Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 8911-8916 (2012).

Delgado, L.; Fernandes, I.; González-Manzano, S.; De Freitas, V.; Mateus, N.; Santos-Buelga, C. Antiproliferative effects of quercetin and catechin metabolites. *Food & Function* 5, 797-803 (2014).

Delgado, L.; Gonzalez-Paramas, A.M.; Gonzalez-Manzano, S.; Ayuda-Durán, B.; Santos-Buelga, C. Influence of flavonoids in ROS production and oxidative DNA damage in *Caenorhabditis elegans* submitted to thermal stress. *Planta Med* 2014; 80 - P2O5 (2014).

Comunicaciones a congresos:

Gonzalez-Manzano, S.; Gonzalez-Paramas, A.M.; Delgado, L.; Surco-Laos, F.; Dueñas, M.; SantosBuelga, C. Influence of epicatechin in the *Caenorhabditis elegans* oxidative status. 5th International Conference on Polyphenols and Health; Sitges, España, 17-20 octubre 2011. Póster seleccionado para presentación oral en la sesión de "poster talks"

Surco-Laos, F.; Gonzalez-Manzano, S.; Gomez-Orte, E.; Gonzalez-Paramas, A.M.; Delgado, L.; Cabello, J.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C. Activity and bioavailability of quercetin, catechins and their O-methylated metabolites on *C. elegans*. 5th International Conference on Polyphenols and Health; Sitges, España 17-20 octubre 2011. (Póster)

Patianna, S.; González-Manzano, S.; Delgado, L.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A. M. Lipid peroxidation as a biomarker to evaluate the epicatechin-protective effects against oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. XXVIth International Conference on Polyphenols, Florencia (Italia), 23-26 de julio 2012. (Póster)

Delgado, L.; González-Manzano, S.; Patianna, S.; Dueñas, M.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Influence of epicatechin in endogenous antioxidant defenses in *Caenorhabditis elegans* submitted to oxidative stress. XXVIth International Conference on Polyphenols, Florencia (Italia), 23-26 julio 2012. (Póster)

González-Manzano, S., Delgado, L., Dueñas, M., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. Lipid peroxidation products as biomarkers of oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. 4th Spanish Worm Meeting. Carmona (Sevilla), 14-15 marzo 2013. (Comunicación oral)

González-Manzano, S.; Ayuda, B.; Delgado, L.; Dueñas, M.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Evaluation of epicatechin and its-protective effects against oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. VI Conference on Polyphenols and Health, Buenos Aires (Argentina), 16-19 octubre 2013. (Póster)

Ayuda Durán, B.; González-Paramas, A.M.; González-Manzano, S.; Delgado Ciruelos, L.; SantosBuelga, C. Biochemical changes in *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. 8th World Congress on Polyphenols Applications, Lisboa (Portugal), 5-6 junio 2014. (Póster)

Delgado Ciruelos, L.; González-Paramas, A.M.; González-Manzano, S.; Ayuda Durán, B.; SantosBuelga, C. Influence of flavonoids in ROS production and oxidative DNA damage in *Caenorhabditis elegans* submitted to thermal stress. 62nd Internacional Congress and Annual Meeting of the Society of Medicinal Plant and Natural Product Research, Guimarães (Portugal) 31 August 4 September 2014. (Póster)

Delgado, L.; González-Manzano, S.; Ayuda-Durán, B.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Modulation of the antioxidant response by epicatechin in *C. elegans*. 5th Spanish Worm Meeting. Salamanca, 5-6 marzo 2015. (Póster).

Para la realización del presente trabajo se ha contado con una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) 2010 del Ministerio de Ciencia e Innovación (ref. BES-2010-036297), y con la financiación aportada por los proyectos AGL2009-12001 y BFU2012-35228 del MINECO

ABREVIATURAS:

3'MetEC: 3'-O-Metilepicatequina

8-OHAde: 8-hidroxiadenina

8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

8-OHGua: 8-hidroxi-guannina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN_m: ADN mitocondrial

ADP: Adenosin difosfato

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ATP: Adenosin trifosfato

BSA: Albúmina de suero bovino

CAT: Catalasa

CBG: β-glucosidasa citosólica

CDK: Ciclinas dependientes de kinasas

COMT: Catecol-*o*-metiltransferasa

COX: Enzima ciclooxigenasa

CTE: Cadena de transporte de electrones

CYP: Citocromo P450

DAD: Detector de fotodiodos alineados

DCFH-DA: Diclorofluoresceina.

dG: 2'-desoxiguanosina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTNB: 5,5'-ditiobis(2'-ácido nitrobenzoico)

EC: Epicatequina

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EGC: Epicatequina 3-O-galato

EGC: Epigallocatequina

EGCG: Epigallocatequina 3-O-galato

FAD: Dinucleótido de flavín-adenina

FBS: Suero fetal bovino

FudR: Fluorodesoxiuridina.

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GST: Glutación-S-transferasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HSP: Proteína de shock térmico

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

LC-MS: Cromatografía líquida-espectrometría de masas

LPH: Lactasa-floricín hidrolasa

m/z: Relación masa/carga

MEME: Minimun essential medium Eagle

MS: Espectrometría de masas

NGM: Medio de cultivo nematodo

Nrf2: Factor nuclear eritroide

O₂: Oxígeno

O₂[•]: Radical superóxido

OH[•]: Radical hidroxilo

PBST: PBS+Tween 20

Prxs: Peroxirredoxinas

Q: Quercetina

Q3Glc: Quercetina-3-O-glucósido

Q3GLcA: Quercetina-3-O-glucurónido

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDS: Dodecilsulfato sódico

Se: Selenio

SGLT-1: Transportador de glucosa sodio-dependiente

SOD: Superóxido dismutasa

SRB: Sulforrodamina B

t-BOOH: Ter-butil hidroperóxido

TCA: Ácido tricloroacético

TMX: Tamarixetina

tR: Tiempo de retención

Trx: Tiorredoxinas

UGT: UDP-glucuronisiltransferasa

UV: Ultravioleta

ÍNDICE

	Pág
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
2.1 Flavonoides	5
2.1.1. Descripción y características	5
2.1.2. Flavonoles	8
2.1.3. Flavan-3-oles (catequinas y proantocianidinas)	9
2.1.4. Actividad antioxidante	12
2.1.5. Biodisponibilidad y metabolismo	14
2.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo	18
2.3. Las teorías del envejecimiento	21
2.3.1. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	23
2.3.2. Tendencias actuales en el proceso de envejecimiento	26
2.3.3. Estrategias de defensa frente al estrés	29
2.3.3.1. Proteínas y enzimas antioxidantes	29
2.3.3.2. Factores de transcripción implicados en estrés y envejecimiento	33
2.4. Polifenoles y enfermedad	38
2.4.1. Polifenoles y enfermedades cardiovasculares	38
2.4.2. Polifenoles y neurodegeneración	39
2.4.3 Polifenoles y cáncer	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	47
3.1. Instrumentación y equipos	47

3.2. Material y reactivos específicos	49
3.3. Preparación de flavonoides y metabolitos	51
3.3.1. Preparación de quercetina-3-O-glucurónido.	51
3.3.2. Síntesis de sulfatos de quercetina y epicatequina	51
3.3.3. Síntesis y purificación de metabolitos metilados de epicatequina y catequina	52
3.4. Ensayos con líneas celulares	53
3.4.1. Condiciones de cultivo y mantenimiento	53
3.4.2. Evaluación de la proliferación celular	53
3.5. Ensayos con <i>C. elegans</i> .	55
3.5.1. Preparación del medio de cultivo para <i>C. elegans</i> (Nematode Growth Medium, NGM)	55
3.5.2. Preparación del medio de cultivo para <i>E. coli</i> OP50 y sembrado de las placas NGM	55
3.5.3. Sincronización de los gusanos	56
3.5.4. Preparación de placas para los ensayos con flavonoides.	57
3.5.5. Ensayos de estrés térmico	58
3.5.6. Ensayos de estrés oxidativo	59
3.5.7. Determinación de glutatión reducido (GSH)	59
3.5.8. Determinación de las actividades glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y	

superóxido dismutasa (SOD)	60
3.5.9. Determinación de proteínas totales	62
3.5.10. Determinación de sustancias reactivas de oxígeno (ROS)	62
3.5.11. Determinación de 8-hidroxi-2'-desoxigua- nosina (8-OHdG)	63
4. RESULTADOS	65
4.1. Ensayos en líneas celulares	65
4.1.1. Introducción	65
4.1.2. Resultados	67
4.1.3. Discusión	72
4.2. Estudios en <i>C. elegans</i>	77
4.2.1. Análisis de biomarcadores de estrés (ROS y ADN)	77
4.2.1.1. Introducción	77
4.2.1.2. Materiales y métodos específicos	81
4.2.1.3. Resultados	86
4.2.1.3.1. Influencia de flavonoides sobre niveles de ROS en <i>C. elegans</i>	86
4.2.1.3.2. Flavonoides y daño oxidativo de ADN en <i>C. elegans</i>	89
4.2.1.4. Discusión general	94
4.2.2. Influencia de epicatequina en resistencia frente a condiciones de estrés	101

4.2.2.1. Introducción	101
4.2.2.2. Ensayos de estrés térmico	104
4.2.2.2.1. Resultados	104
4.2.2.2.2. Discusión	109
4.2.2.3. Ensayos de estrés oxidativo inducido químicamente	113
4.2.2.3.1. Resultados	113
4.2.2.3.2. Discusión	116
4.2.2.4. Comentario final	119
5. CONCLUSIONES	125
6. REFERENCIAS	129

JUSTIFICACIÓN

Y

OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los polifenoles son uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos en el reino vegetal. Estos compuestos no están involucrados en su metabolismo primario, sin embargo son esenciales para la fisiología de la planta, ya que participan en el crecimiento, reproducción e incluso en su morfología. Se caracterizan por estar implicados en los mecanismos de defensa de las plantas, frente a predadores, patógenos, radiación ultravioleta y condiciones de estrés (Bravo, 1998). Los polifenoles se pueden subdividir en diferentes clases en función de su estructura química, su origen o su actividad biológica. El presente trabajo se centra en la subclase de los flavonoides, que a su vez se pueden clasificar en flavonas, flavonoles, flavanoles, antocianos, flavanonas, isoflavonas y calconas, entre otros.

Tradicionalmente estos compuestos se han estudiado debido a su interés en diversas industrias, ya que se han empleado en la producción de tintes, cosméticos, aditivos, etc. Asimismo, constituyen una parte importante en la dieta humana, al encontrarse de manera ubicua en gran cantidad de alimentos vegetales. Se ha estimado que la ingesta media de polifenoles, en una dieta en la que se consuman varias piezas de fruta y diferentes verduras, es de 1 g/día (Manach *et al.*, 2004).

En los últimos años el interés por los polifenoles ha crecido debido a que se les ha atribuido diferentes efectos beneficiosos para la salud, especialmente frente al desarrollo de distintas enfermedades asociadas al daño oxidativo (enfermedades neurodegenerativas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.) (Scalbert *et al.*, 2005). Así, el consumo habitual de flavonoides se ha relacionado con actividades anti-alérgicas, anti-inflamatorias, antivirales, antiproliferativas o cardioprotectoras (Nijveldt *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2005). Sin embargo los mecanismos subyacentes a estos efectos no están claros. Hasta ahora se habían

atribuido a su actividad antioxidante y su capacidad para captar radicales libres, pero estudios recientes demuestran que su actividad biológica podría estar relacionada con su estructura química y su capacidad para interactuar con diferentes receptores celulares y factores de transcripción.

La mayoría de los estudios sobre actividad biológica de flavonoides se han centrado en la evaluación de su actividad antioxidante, fundamentalmente mediante ensayos en sistemas *in vitro* o *ex vivo*. Los ensayos con líneas celulares son una importante herramienta que permite entender como interactúan los compuestos a nivel celular y permiten obtener resultados sobre los efectos directos, por ejemplo, sobre células tumorales, o sobre células sanas para evaluar citotoxicidad. Sin embargo, en el organismo, para llegar a sus objetivos biológicos los flavonoides deben ser absorbidos y posteriormente transformados a diversos metabolitos, que son los que luego se distribuyen a los tejidos, de manera que los compuestos presentes a nivel celular son diferentes a los que se localizan originalmente en los alimentos (Day y Williamson, 2001; Natsume *et al.*, 2003). Son todavía escasos los estudios *in vivo* que permitan establecer no sólo los efectos biológicos de los distintos compuestos sino también aspectos como su biodisponibilidad, metabolismo u objetivos biológicos. En este sentido, los ensayos con organismos modelo, como el nematodo *C. elegans*, constituyen una alternativa adecuada para evaluar los efectos en un organismo completo e intentar dilucidar los mecanismos de acción a nivel celular o molecular antes de proceder a la evaluación en animales superiores incluido el hombre.

El **objetivo principal** de este trabajo es evaluar los efectos de diferentes flavonoides en líneas celulares y en *C. elegans*, con el fin de contribuir a elucidar sus mecanismos de acción a nivel celular y/o molecular. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación de los efectos de diferentes flavonoides y sus metabolitos derivados, sobre diversas líneas celulares, tumorales y sanas.
2. Puesta a punto de un método para evaluar los niveles de daño en el ADN tras el tratamiento con diferentes flavonoides.
3. Desarrollo de metodologías para el análisis de la actividad de enzimas antioxidantes y de biomarcadores de daño oxidativo en *C. elegans*.
4. Ensayos para evaluar la influencia de flavonoides en la resistencia de *C. elegans* al daño oxidativo

Los ensayos que se realizarán con el nematodo *C. elegans* y con líneas celulares no presentan repercusiones de tipo ético

INTRODUCCIÓN

GENERAL

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1. Flavonoides

2.1.1. Descripción y características

Los flavonoides son uno de los grupos más numerosos de metabolitos secundarios de plantas que juegan papeles relevantes en ecofisiología vegetal, participando en los procesos de propagación y los mecanismos de defensa frente a factores de estrés bióticos y abióticos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la dieta humana y su consumo se ha relacionado con la prevención frente a diversas patologías crónicas, especialmente de tipo cardiovascular (Del Rio *et al.*, 2013). Esta familia agrupa varios miles de compuestos (se han descrito más de 8000 flavonoides diferentes de origen natural; Andersen y Markham, 2006) que comparten un esqueleto común, C₆-C₃-C₆, en el que dos anillos aromáticos (A y B) se encuentran ligados a través de un puente de 3 átomos de carbono que normalmente, aunque no siempre, forma un heterociclo (anillo C) dando lugar a una estructura fenilcromano (Figura 1).

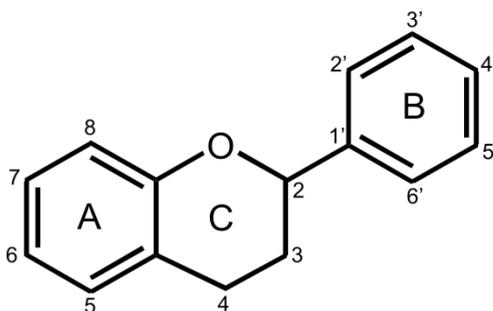


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.

En función del patrón de sustitución del anillo C se distinguen diferentes clases de flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianos, dihidroflavonoles e isoflavonas, existiendo también formas abiertas calcona y dihidrocalcona (Figura 2). Los flavonoides están habitualmente hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y/o 5', y pueden estar adicionalmente metilados, acetilados, prenilados o sulfatados. En sus fuentes naturales pueden encontrarse como agliconas libres, como derivados glicosilados o acilados y en forma de estructuras oligómeras o polímeras, como es el caso de los taninos condensados (o proantocianidinas) constituidos por la unión de un número variable de unidades flavan-3-ol. Excepto en el caso de los flavanoles (catequinas y proantocianidinas), la mayoría de los flavonoides existen habitualmente en sus medios naturales en forma de *O*-glicósidos o, menos frecuentemente, como *C*-glicósidos. Los restos glicosilo se encuentran normalmente unidos a los grupos hidroxilo en 3, 7 o 4' en el caso de los *O*-glicósidos, y directamente ligados a los carbonos C-6 o C-8 en el caso de los *C*-glicósidos. Los azúcares pueden estar adicionalmente esterificados con ácidos alifáticos (p.ej., ácidos malónico o acético) o aromáticos (p.ej., ácidos *p*-cumárico, cafeico o ferúlico) (Santos-Buelga y González-Paramás, 2014).

Por su relación con el objeto de este trabajo, a continuación se hace referencia particular a los grupos de flavonoles y catequinas.

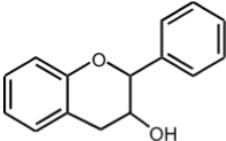
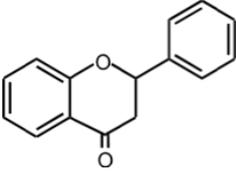
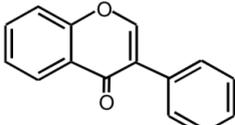
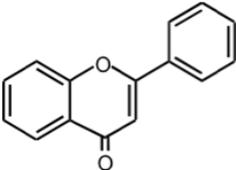
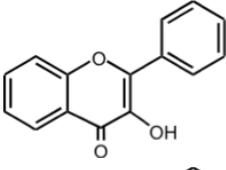
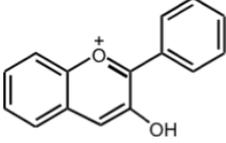
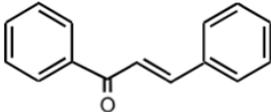
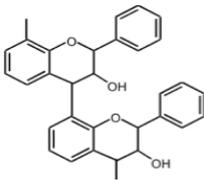
Clase de flavonoide	Estructura básica	Ejemplos
Flavan-3-oles monómeros (catequinas)		(Epi)catequina, (epi)galocatequina
Flavanonas		Naringenina, hesperidina, taxifolina, eriodictiol
Isoflavonas		Genisteina, daidzeina, biochanina A, puerarina
Flavonas		Apigenina, luteolina, crisina, crisoeriol
Flavonoles		Quercetina, kaempferol, miricetina, isoramnetina
Antocianos		Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, petunidina, peonidina
Calconas		Naringenin-chalcona, fletina, arbutina
Flavan-3-oles oligómeros y polímeros (taninos condensados o proantocianidinas)		Procianidinas, prodelfidinas

Figura 2. Estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides (Santos-Buelga y González-Paramás, 2014).

2.1.2 Flavonoles

Son una subclase de flavonoides que posee una estructura básica de tipo 2-fenil-3-hidroxi-cromona, caracterizada por la presencia de un grupo cetona en C₄, una insaturación entre C₂ y C₃ y un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C. Normalmente se encuentran en la naturaleza en forma de O-glicósidos, siendo las posiciones de sustitución más habituales 3-, 7-, 3'-, y 4'-. Los azúcares más comúnmente encontrados son glucosa, galactosa y ramnosa, y en menor medida xilosa, arabinosa y ácido glucurónico, así como algunos disacáridos como rutinosa o neohesperidosa. Están ampliamente distribuidos en plantas superiores, habiéndose identificado del orden de 900 flavonol glicósidos en la naturaleza (Zhang *et al.*, 2014), constituyendo junto con los flavan-3-oles el grupo de flavonoides mejor representados en dieta. Los azúcares pueden encontrarse adicionalmente esterificados con diversos ácidos, como *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, gálico, o acético. La presencia de flavonoles como aglicones en los medios naturales es menos frecuente, aunque no extraña. En la Figura 3 se recogen los aglicones de flavonoles más comunes en frutas y hortalizas.

Flavonoles	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '
Miricetina	OH	OH	OH
Quercetina	OH	OH	H
Kaempferol	H	OH	H
Isoramnetina	OCH ₃	OH	H
Tamarixetina	OH	OCH ₃	H

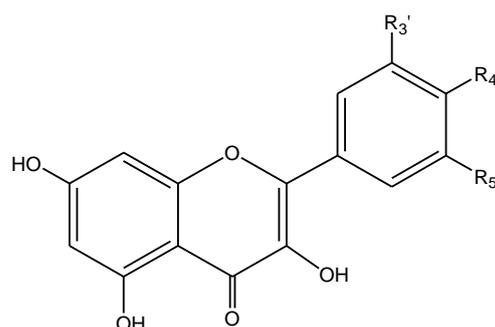
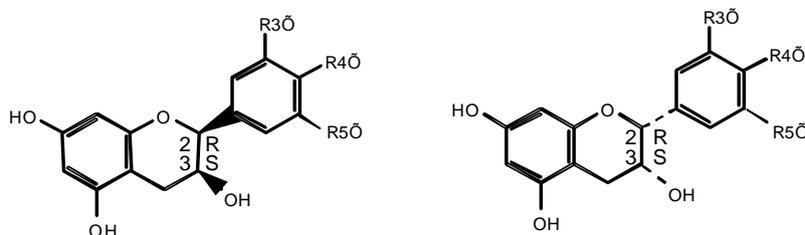


Figura 3. Estructura de los aglicones de flavonoles más habituales en alimentos vegetales.

La quercetina es el flavonol más abundante en la dieta, encontrándose presente en diversas frutas, hortalizas y productos derivados. Son fuentes especialmente importantes las cebollas, manzanas y bayas, así como té y vino. En cebolla puede alcanzar concentraciones muy elevadas, del orden de 200-1000 $\mu\text{g/g}$ (peso fresco) (Hertog *et al.*, 1992; Crozier *et al.*, 1997).

2.1.3 Flavan-3-oles (catequinas y proantocianidinas)

Los compuestos de esta familia presentan un esqueleto básico en el que los dos anillos bencénicos están unidos por un heterociclo no aromático hidroxilado en posición 3 (Figura 4). Pueden encontrarse en la naturaleza como monómeros o condensados entre sí formando compuestos con diverso grado de polimerización (taninos condensados o proantocianidinas). También pueden poseer restos acilo, siendo el ácido gálico el sustituyente más frecuente. Al contrario de lo que ocurre con otros flavonoides, las combinaciones de tipo heterosídico son poco habituales. Los flavan-3-ol monómeros se suelen designar genéricamente como "catequinas" y se diferencian entre sí según el grado de hidroxilación de su anillo B. La presencia de dos carbonos asimétricos (C2 y C3) da lugar a cuatro isómeros ópticos para cada catequina (Figura 4). Entre ellos los más comunes son los pares diastereoisoméricos (+)-catequina / (-)-epicatequina y (+)-galocatequina / (-)-epigalocatequina (Haslam, 1989).



Flavan-3-oles	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	C-2	C-3
(+)-Galocatequina	OH	OH	OH	R	S
(+)-Catequina	OH	OH	H	R	S
(+)-Afzelequina	H	OH	H	R	S
(-)-Epigalocatequina	OH	OH	OH	R	R
(-)-Epicatequina	OH	OH	H	R	R
(-)-Epiáfzelequina	H	OH	H	R	R

Figura 4. Estructura química de los principales monómeros de flavan-3-oles

Los flavan-3-oles pueden condensar entre sí a través de enlaces C-C y, ocasionalmente, C-O-C, dando lugar a los taninos condensados (Figura 5), que pueden clasificarse según el grado de polimerización que presenten en oligómeros (dímeros, trímeros y tetrámeros) y polímeros (con grado de polimerización igual o superior a 5). Los enlaces interflavánicos más usuales son los que se establecen entre el carbono 4 de una unidad flavanol (considerada "subunidad superior" o "de extensión") y los carbonos 8 ó 6 de otra (denominada "subunidad inferior" o "de iniciación"). Aunque menos frecuentes, existen también compuestos que, además de la unión C4-C8 ó C4-C6, presentan un enlace adicional de tipo éter entre las posiciones C2-O-C7 ó C2-O-C5 (unión de tipo A). En todos estos compuestos los tres carbonos del heterociclo flavánico (C2, C3 y C4) son asimétricos, por lo que pueden existir numerosas combinaciones de sustancias con diferentes configuraciones.

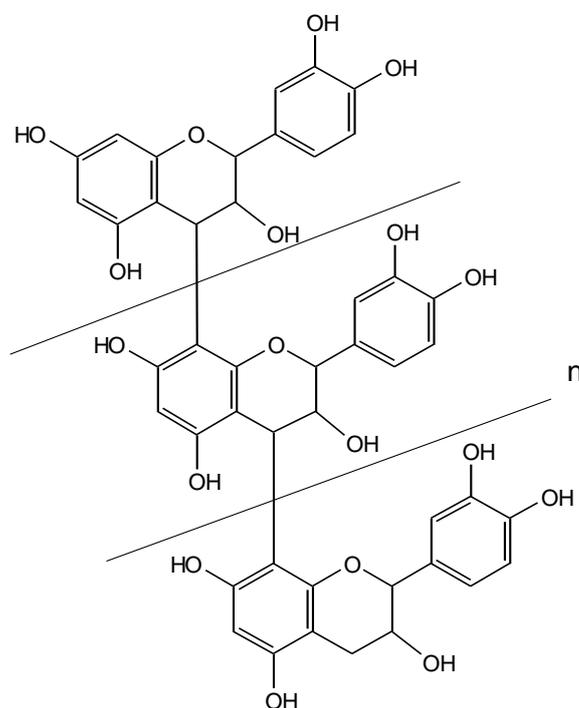


Figura 5. Estructura de los taninos condensados.

La reacción más característica de los taninos condensados es la ruptura en medio ácido del enlace interflavánico, que da lugar, por una parte, a las subunidades inferiores en su forma libre y, por otra, a los carbocationes correspondientes a las unidades de extensión que pueden oxidarse a antocianos (Figura 6), razón por la cual son también designados como proantocianidinas. Las proantocianidinas más comunes en alimentos son las procianidinas (con sustitución 3',4'-dihidroxi en el anillo B) y las prodelfinidinas (3',4',5'-trihidroxi), en cuya hidrólisis se liberan respectivamente los antocianos cianidina y delfinidina.

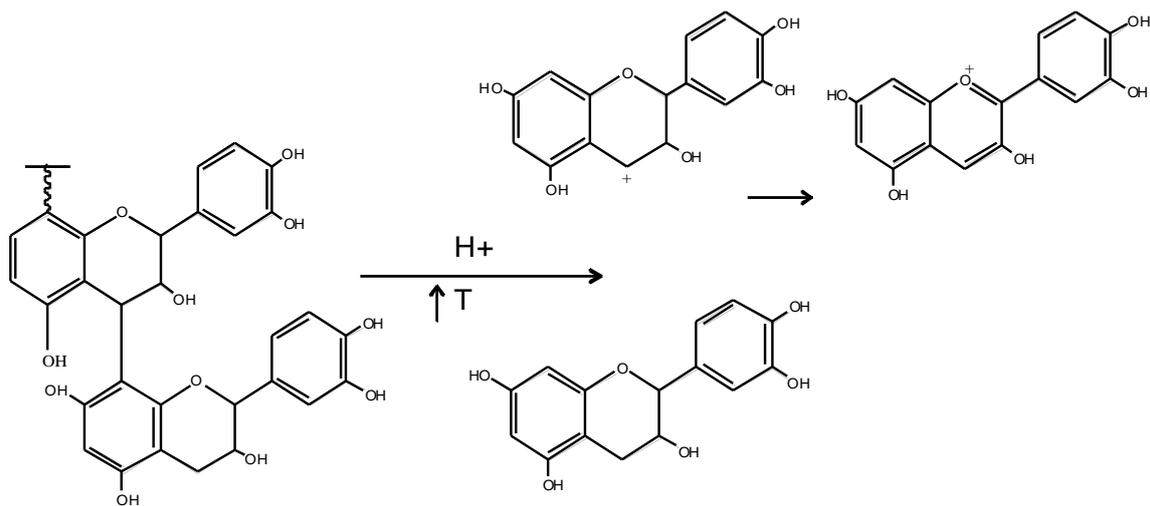


Figura 6. Hidrólisis de proantocianidinas

2.1.4 Actividad antioxidante.

Los flavonoides tienen la capacidad de donar electrones debido a la presencia de anillos aromáticos en su estructura, que son susceptibles de sufrir el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema π (Ramírez-Tortosa *et al.*, 2001). De esta forma su potencial antioxidante depende del número y de la posición de los grupos hidroxilo, así como de la presencia de grupos dadores de electrones en su estructura química (Miller, 1997). En los flavonoides la presencia de grupos hidroxilo en la posición 3' y 4' del anillo B se ha relacionado con un alto potencial antioxidante, debido a que al formarse el radical por pérdida de electrones, la molécula resultante presenta una alta estabilidad. Por otra parte, la presencia de donadores de electrones como el grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C, junto con los hidroxilos libres en la posición 3 del anillo C y 5 del anillo A, confieren a la molécula una mayor capacidad antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996). Se ha visto que los flavonoides que tienen mayor número de grupos hidroxilo presentan mayor actividad antioxidante. Sin embargo, la presencia de glicosilaciones en la molécula disminuye las propiedades antioxidantes de estos compuestos, y por lo tanto su mayor potencial se observa en los aglicones (Wang, 1997; Kuskoski *et al.*, 2004).

La actividad antioxidante *in vitro* de los flavonoides se ha evaluado en los últimos años por distintos autores. Estudios llevados a cabo en liposomas sintéticos (Duthie *et al.*, 2000; Cirico y Omaye, 2006), en homogeneizados de órganos completos (Hubbard *et al.*, 2004), en ensayos *ex vivo* con plasma humano (Valensi *et al.*, 1996; Halliwell y Gutteridge, 1998), en lipoproteínas de baja densidad (Widlansky *et al.*, 2005) o en líneas celulares (Young y Woodside, 2001) han demostrado la actividad antioxidante de los flavonoides. Sin embargo, los flavonoides también pueden actuar como prooxidantes. De acuerdo a la definición, un antioxidante es una molécula capaz de donar electrones o átomos de hidrógeno, dando lugar a un radical derivado de la deficiencia electrónica

adquirida, que se supone que debe ser menos reactivo e incapaz de propagar la cadena radicalaria de manera eficaz o eficientemente inactivado por otras fuentes de electrones, con el fin de prevenir el daño celular. En relación a los flavonoides, los radicales subproducto derivados de su actividad captadora de ROS son los radicales fenoxil flavonoide (FO^\bullet). La estabilidad de estos radicales primarios derivados de flavonoides es en ocasiones cuestionable, ya que pueden ser convertidos en otros radicales o productos muy reactivos, como radicales *o*-semiquinona que pueden reaccionar con O_2 en presencia de metales de transición para formar radicales superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ o ser transformados en *o*-quinonas, todos ellos pro-oxidantes y potencialmente citotóxicos (Pietta, 2000; Halliwell, 2008). Las quinonas derivadas de flavonoides presentan un alto grado de reactividad, aunque pueden ser inactivadas mediante su conjugación con moléculas como GSH, cisteínas o ácidos nucleicos (Awad *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2009).

Existen determinadas características que determinan el poder pro-oxidante de algunos flavonoides. Así, los flavonoides con alto número de hidroxilos en el anillo B poseen una estructura más susceptible de generar radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Heim *et al.*, 2002). Asimismo, se ha demostrado que los flavonoides con una estructura pirogalol en el anillo A son capaces de desencadenar la producción de peróxido de hidrógeno (Heim *et al.*, 2002) y como consecuencia conducir a un aumento de los radicales libres a través la ya mencionada reacción Fenton (Galey, 1997). Este efecto pro-oxidante de los flavonoides es importante en aquellas reacciones *in vivo* en las que estén implicados metales de transición, así como en los medios de cultivo que se utilizan experimentación, y no debe considerarse como una característica despreciable en los efectos producidos.

2.1.5. Biodisponibilidad y metabolismo

Los flavonoides probablemente representan el tipo de fitoquímicos más estudiado. Desde los años 90 el interés por analizar sus beneficios en la salud ha ido en aumento. Diversos estudios epidemiológicos han relacionado un consumo habitual de estos compuestos con una menor incidencia de diversas patologías, como cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes mellitus o determinados tipos de cáncer. Las recomendaciones del consumo habitual de frutas y verduras, con el fin de mantener una salud adecuada, son ampliamente conocidas. Sin embargo, un alto consumo de polifenoles en la dieta no garantiza una mayor biodisponibilidad de estos compuestos. Como biodisponibilidad se entiende la capacidad de un compuesto para alcanzar su diana o sitio de acción. Uno de los factores más influyentes en la biodisponibilidad de los polifenoles es su estructura química. En los alimentos, los polifenoles se encuentran en formas glicosiladas y, en ocasiones, en forma de polímeros, que no pueden ser absorbidos directamente y deben ser previamente transformados en el organismo. De esta forma las características del individuo receptor cobran una vital importancia. La mayoría de los flavonoides tienen una absorción limitada en el organismo. El grupo de las isoflavonas parece ser el que presenta mayor biodisponibilidad, seguido de catequinas, flavanonas y algunos flavonoles glicosilados. Los flavonoides con menor absorción en el organismo serían las proantocianidinas, las catequinas galoiladas y los antocianos (Kroon *et al.*, 2004; Williamson y Manach, 2005). Por otra parte, la concentración de flavonoides en los alimentos puede verse afectada por factores externos, como la exposición a la luz solar o el grado de madurez de las frutas y verduras. Igualmente, la interacción con otros componentes de la matriz alimentaria, como grasa o fibra, puede influir sobre la absorción de los flavonoides en el organismo. Otro factor condicionante está relacionado con el procesado de los alimentos antes de ser ingeridos (tratamientos térmicos, liofilización, homogeneización) que puede

modificar la estabilidad de los compuestos y dificultar o favorecer su biodisponibilidad.

En la mayor parte de los casos, sólo una pequeña proporción de los compuestos fenólicos ingeridos es absorbida en el intestino delgado. En el caso particular de los glicósidos de flavonoides (formas más abundantes en los alimentos) suele ser necesaria una hidrólisis para liberar el aglicón previa a su absorción. Esta hidrólisis comienza en la cavidad bucal y es producida por enzimas β -glucosidasas procedentes de la saliva y de la microbiota oral (Requena *et al.*, 2010). No obstante, el principal mecanismo de desglicosilación de los flavonoides tiene lugar por acción de la enzima formada por el complejo lactasa-floricin hidrolasa (LPH), que se encuentra en las vellosidades de las células epiteliales del intestino delgado (Day *et al.*, 2000; Day y Williamson, 2001). Tras la separación de los sustituyentes glicosídicos y el aumento de lipofobicidad, los aglicones pueden entrar al enterocito mediante difusión pasiva (Day *et al.*, 2000). Algunos flavonoides concretos, como quercetina-4'-O-glucósido, también podrían ser transportados por difusión activa al interior de las células epiteliales a través del transportador sodio dependiente de glucosa (SGLT1) y posteriormente ser hidrolizados dentro de la célula por la β -glucosidasa citosólica (CBG) (Gee *et al.*, 2000; Day y Morgan, 2003). Dentro del enterocito los aglicones flavonoides sufren una serie de reacciones de conjugación (metilación, glucuronidación y sulfatación), mediante la acción de enzimas como catecol-*o*-metiltransferasa (COMT), UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) y sulfotransferasa. Uno de los papeles de estas enzimas de fase II del metabolismo es conjugar los hidroxilos presentes en las posiciones 3' y 4' de algunos flavonoides, como es el caso de quercetina, con el fin de atenuar el efecto pro-oxidante y citotóxico de estos compuestos (Boersma *et al.*, 2002). La fracción absorbida y biotransformada en el enterocito es luego transportada al hígado por circulación sistémica, donde sufre procesos adicionales de conjugación por enzimas de fase II. Algunos compuestos

son susceptibles de sufrir recirculación enterohepática y ser devueltos al intestino. Algunos autores sugieren que los procesos de metilación y glucuronidación se producen tanto en células intestinales como en hígado, mientras que los procesos de sulfatación son llevados a cabo principalmente en el hígado (Scalbert y Williamson 2000; Rechner *et al.*, 2002). La mayor parte de los flavonoides, a excepción de algunas catequinas, derivados galoilados y ciertos antocianos, no se encuentran como tales en la sangre, sino que son los compuestos conjugados producto del metabolismo de las enzimas de fase II las formas circulantes que predominan.

Otro mecanismo implicado en el metabolismo de los flavonoides es la conjugación con glutatión. Como se ha descrito antes, los flavonoides que presentan un grupo catecol en su estructura son susceptibles de sufrir procesos de oxidación y dar lugar a quinonas reactivas que pueden desencadenar procesos de daño oxidativo en las células. El glutatión se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos y su conjugación con las quinonas derivadas de la oxidación de flavonoides es un mecanismo que pretende neutralizar el ataque nucleofílico de estos compuestos reactivos a otras moléculas como proteínas y ADN, evitando de esta forma el efecto pro-oxidante de los mismos (Galati *et al.*, 2001; Moridani *et al.*, 2003; Hong y Mitchell, 2006).

Los estudios realizados hasta ahora sugieren que los compuestos una vez conjugados presentan menor actividad, ya sea anti- o pro-oxidante, o incluso son totalmente inactivos. Esto sugiere que los metabolitos conjugados podrían no ser responsables del efecto *in vivo* de estas sustancias, al menos de un modo directo (Kroon *et al.*, 2004). No obstante, diferentes células presentan mecanismos capaces de producir la desconjugación de los metabolitos glucuronidados y sulfatados de los flavonoides, especialmente en determinadas situaciones como procesos inflamatorios (Sperker *et al.*, 1997; O'Leary *et al.*, 2003). De esta forma, se establece que el proceso de conjugación puede ser reversible, y por lo tanto en

determinados células o tejidos podrían llegar a estar presentes los aglicones y/o sus formas metiladas y ser, al menos en parte, responsables del efecto *in vivo* de los flavonoides. Algunos autores han sugerido que los glucurónidos de quercetina podrían actuar como una forma de transporte, y que posteriormente sufrirían un proceso de desconjugación en el lugar donde el aglicón sea necesario para producir el efecto *in vivo* (Menéndez *et al.*, 2011; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2012).

Una gran parte de los flavonoides que se ingieren no son absorbidos en el intestino delgado, y junto con los metabolitos que son devueltos al lumen intestinal mediante la recirculación enterohepática alcanzan el intestino grueso. En este punto los compuestos son sometidos a la acción de la microflora colónica. La bacterias presentes en el intestino son capaces de llevar a cabo procesos de desglicosilación y de degradación de compuestos fenólicos a productos más simples, que podrían ser eventualmente absorbidos en el intestino grueso y jugar un papel importante en la actividad biológica de los flavonoides de la dieta (Aura *et al.*, 2005) En la Figura 7 se recoge un esquema de los procesos de absorción y metabolismo de flavonoides.

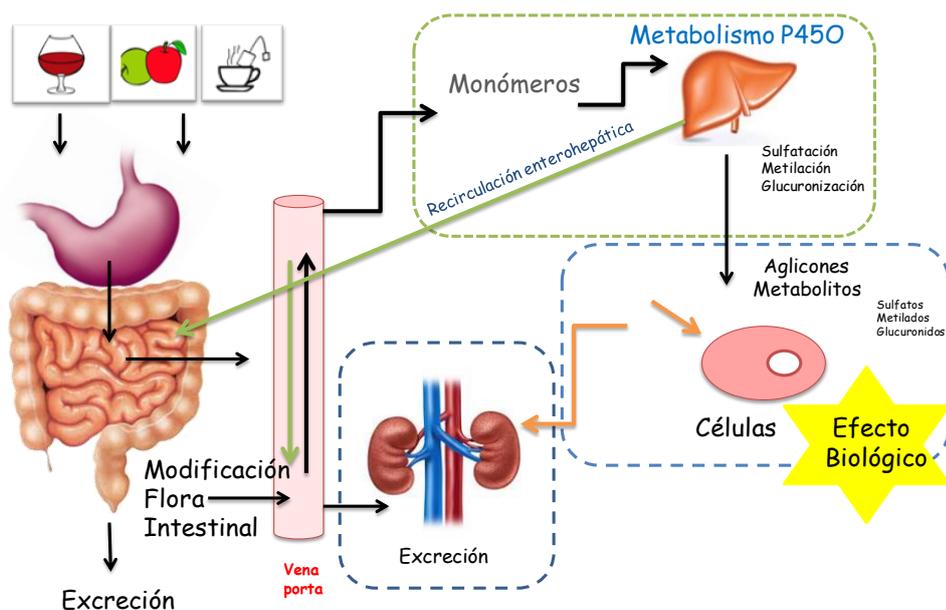


Figura 7. Metabolismo, absorción y excreción de flavonoides

2.2. *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo.

(Hope, 1999; Horvitz, 2004)

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) es un nematodo de vida libre, no parásito, que vive en el suelo y se alimenta de microorganismos. Requiere para su vida y reproducción una temperatura entre 10 y 25 °C, una humedad adecuada, oxígeno atmosférico y bacterias (ej. *Escherichia coli*) como fuente de alimento, por lo que es un organismo fácil de mantener en laboratorio. Es un organismo de pequeño tamaño, los adultos alcanzan 1 mm de largo y 70 µm de diámetro, lo que permite mantener el cultivo en poco espacio. No emiten olor intenso, su observación al microscopio resulta fácil y son relativamente sencillos de manipular. Se mueven formando leves ondas sinusoidales en un plano dorsoventral. Su carácter hermafrodita permite obtener gran cantidad de individuos tanto en medio sólido como líquido de manera rápida y barata.

Anatomía

C. elegans presenta dos sexos, masculino y, la forma predominante, hermafrodita. Los individuos hermafroditas producen tanto esperma como oocitos y por tanto pueden producir la autofecundación. Los oocitos también son fecundados por el esperma producido por los machos, de esta forma se producen cruces que dan lugar a machos y hermafroditas en las mismas proporciones. Un hermafrodita produce alrededor de 300 individuos hermafroditas, mientras que la fertilización cruzada puede producir más de 1000 individuos machos y hermafroditas en las mismas proporciones.

Importancia en investigación

En 1963 Sydney Brenner introdujo *C. elegans* como organismo modelo en el campo de la investigación en biología y neurología. Desde entonces, este nematodo ha sido ampliamente estudiado, lo que ha permitido el desarrollo de protocolos y métodos de investigación. Actualmente *C. elegans* es utilizado, entre otras cosas, para la realización de estudios *in vivo* con compuestos de origen vegetal farmacológicamente activos.

A continuación se señalan algunas de las características que hacen de *C. elegans* un modelo óptimo para el estudio de la funcionalidad y regulación de genes (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Guarente y Kenyon, 2000):

- Es un organismo eucariota, que presenta estructuras celulares y moleculares y rutas de control de organismos superiores.
- Es multicelular con un complejo proceso de desarrollo que incluye embriogénesis, morfogénesis y cambio de estado larvario a estado adulto. Permite extrapolar la información obtenida en su estudio a organismos más complejos y de uso más difícil en laboratorio, como pueden ser los modelos murinos.
- Permite la utilización de técnicas como manipulación del genoma por adición, silenciamiento o alteración de genes específicos, de una manera sencilla.
- Presenta un genoma relativamente pequeño ($9,7 \times 10^7$ pares de bases) que está completamente secuenciado y que posee al menos un 40% de genes ortólogos a genes humanos.
- Tiene un ciclo de vida rápido: la embriogénesis dura 12 horas y el paso de larva a adulto se produce en apenas 2,5 días. Además, como se ha señalado anteriormente, debido a su peculiar reproducción permite

obtener organismos genéticamente iguales o muy parecidos, lo que facilita su uso en laboratorio.

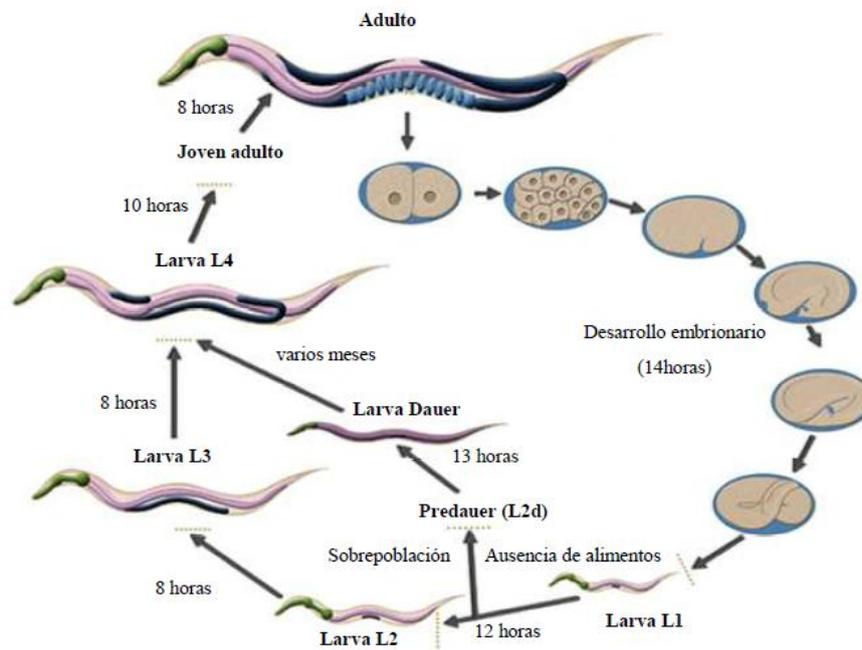


Figura 8. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C. Fuente: www.wormatlas.com

2.3 Las teorías del envejecimiento

Existen numerosas definiciones del proceso de envejecimiento, enfocadas cada una de ellas desde distintos puntos de vista. Una de las más aceptadas es la que considera el envejecimiento como el conjunto de transformaciones morfológicas, metabólicas, funcionales y psicológicas que el paso del tiempo ocasiona de forma irreversible en los organismos vivos. Dichas transformaciones dan lugar a una disminución en la capacidad de adaptación a los cambios del entorno y una mayor dificultad para mantener estable el medio interno, lo que origina un aumento de la vulnerabilidad y de la fragilidad (Queralt, 2014).

Con el objeto de intentar explicar cómo y por qué tienen lugar estos cambios, que conducen irreversiblemente a la muerte, se han postulado a lo largo de los años numerosas teorías que se conocen con el nombre genérico de “teorías del envejecimiento”. Muchas de las inicialmente propuestas han sido refutadas en base a resultados experimentales, mientras que otras han sido modificadas para adaptarse al nuevo conocimiento científico. Entre estas últimas se encuentran todas las variantes en las que se relaciona el envejecimiento con la desorganización celular producida por el estrés oxidativo causado por los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), teoría propuesta inicialmente por Harman en los años 50 (Harman, 1956).

En sus inicios, Harman postulaba que el envejecimiento, y algunas de las enfermedades degenerativas relacionadas, se podían atribuir a los efectos de los radicales libres en diferentes compartimentos celulares. Sin embargo, su trabajo no tuvo mucha repercusión ya que por aquel entonces no se había descrito la producción de radicales libres en las células. No fue hasta 1969 cuando McCord y Fridovich descubrieron la existencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), lo que produjo un cambio de tendencia; de esta forma, si existía una enzima encargada de destoxificar los radicales libres, éstos debían de generarse

in vivo dentro de la célula. Años después se descubrió la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas (Boveris y Chance, 1973). Este descubrimiento llevó a demostrar que durante la respiración mitocondrial de la célula se generan especies altamente inestables y reactivas debido a la incompleta reducción del oxígeno, que posteriormente fueron denominadas “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Apoyándose en estos resultados Harman estableció que era la mitocondria el lugar donde se producían los radicales libres y propuso que la desorganización de las mitocondrias causada por los radicales libres podría ser «el reloj del envejecimiento».

Miquel *et al.* (1980) redefinieron la teoría, que pasó a conocerse como “Teoría mitocondrial de envejecimiento por radicales libres”. A diferencia de Harman que proponía la desorganización de las mitocondrias de cualquier tipo de célula como el mecanismo fundamental del envejecimiento, la teoría propuesta por Miquel y colaboradores restringe la desorganización mitocondrial causante del envejecimiento sólo a las células somáticas diferenciadas, de manera que los ROS que se forman en las mitocondrias de las células diferenciadas lesionan su ADNmt, lo que produce una falta de regeneración mitocondrial debido a una progresiva desorganización oxidativa de los lípidos y proteínas de sus membranas que lleva a la digestión autofágica de las misma y provoca el correspondiente descenso de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) (Miquel, 2006). En cualquier caso, parece que de acuerdo a las teoría del daño oxidativo, de una u otra manera los ROS están íntimamente ligados al proceso de envejecimiento.

2.3.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas caracterizadas por presentar uno o más electrones desapareados en su orbital más externo y al menos una molécula de oxígeno, lo que las hace extremadamente reactivas. Atacan principalmente a moléculas con alta densidad o inestabilidad electrónicas, como pueden ser los átomos de nitrógeno de las proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados. Este tipo de interacciones produce alteraciones en la estructura de esas moléculas, lo que se traduce en una pérdida de funcionalidad. La generación de ROS se produce en diferentes lugares dentro de la célula y como resultado de diversas reacciones metabólicas en pequeñas concentraciones, sin embargo, la principal fuente de generación de ROS es la mitocondria y más concretamente la cadena de transporte de electrones (CTE). Algunos estudios sugieren que entre el 0,12% y 2% del oxígeno consumido es convertido a ROS.

La cadena respiratoria consiste en una serie de transportadores electrónicos que funcionan como pares redox y que se localizan en la membrana mitocondrial interna, y está formada por complejos multiproteicos (complejos I-IV). Las moléculas que se encargan de transportar los electrones son principalmente citocromos, centros hierro-sulfurados, quinonas y flavinas. Los electrones provenientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) son movilizados desde el complejo I (NADH deshidrogenasa/NADH ubiquinona oxidoreductasa) y transferidos a la ubiquinona (Coenzima Q). Durante la transferencia de electrones, se produce asimismo una transferencia de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana contribuyendo de esta forma a generar un gradiente electroquímico (Figura 9). Los electrones también se pueden transferir a la ubiquinona desde el complejo II (succinato deshidrogenasa) que recibe electrones desde el ciclo del ácido cítrico. El

complejo III (citocromo *bc₁*) se encarga de transferir electrones desde la coenzima Q hasta el citocromo C generando una transferencia de protones desde la matriz hasta la zona intermembrana. Finalmente el complejo IV (citocromo C oxidasa) transfiere los electrones desde el citocromo C hasta una molécula de oxígeno, generando agua y movilizand o protones al espacio intermembranal. De esta forma, el gradiente de protones producido mediante esta transferencia de electrones permite la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa (Complejo V). En diversos sitios a lo largo de la cadena de transporte, electrones provenientes de NADH o FADH pueden reaccionar directamente con el oxígeno o con otros aceptores de electrones y generar radicales libres. Se ha descrito que el complejo I y III contribuyen a la mayor parte de la generación de ROS en la mitocondria (Herrero y Barja, 2000; Muller *et al.*, 2000). El radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) se genera como resultado de la reacción entre los electrones procedentes de la cadena de transporte y el oxígeno. Es un radical no reactivo frente a macromoléculas, sin embargo, en presencia de metales de transición como Cu o Fe puede dar lugar al radical hidroxilo (OH^{\bullet} , reacción de Haber-Weiss), que es una molécula altamente reactiva con capacidad para producir daño oxidativo y que puede dañar macromoléculas en el lugar donde se genera. Por otra parte, tiene una vida media muy corta, lo que dificulta que propague el daño oxidativo en las células más allá de su lugar de origen. El radical superóxido puede también ser transformado dentro de la célula a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) cuando el oxígeno se reduce con dos electrones. No es una molécula reactiva, pero igualmente en presencia de metales de transición genera radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) mediante la reacción de Fenton.

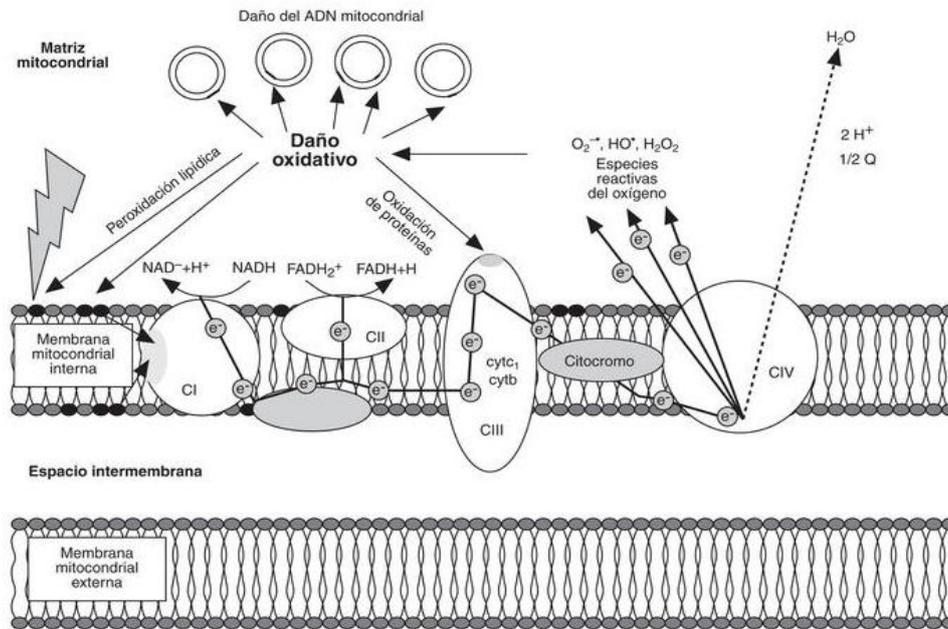


Figura 9. Funcionamiento de la cadena de transporte de electrones. Extraído de Cardellach y Miró (2004).

Hasta hace unos años, esta “fuga” de electrones de la cadena, se consideraba producto de un proceso ineficiente, sin embargo, actualmente se ha propuesto que las ROS mitocondriales podrían estar implicados en procesos de señalización dependientes de reacciones redox, así como en el reloj biológico del envejecimiento (Dada *et al.*, 2003; Nemoto *et al.*, 2005), e incluso actuar como un indicador del buen funcionamiento de la cadena de transporte de electrones. De hecho, dentro de la célula existen otras muchas reacciones que tienen como resultado la generación de ROS. El citocromo P450 por ejemplo, que se encarga de detoxificar sustancias en el organismo, puede llevar a cabo reacciones de oxidación que, como resultado, pueden llevar acoplada la generación de superóxido. Por otra parte, la enzima xantina oxidasa cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina hasta ácido úrico produciendo peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, la existencia de enzimas que como resultado de su actividad llevan acoplada una generación de ROS indica que la producción de estas especies no

es un hecho al azar, y que por lo tanto su producción en la célula debe de tener una finalidad concreta, más allá de generar daño.

2.3.2 Tendencias actuales en el proceso de envejecimiento

La teoría del envejecimiento basada en el efecto negativo que produce el estrés oxidativo, y concretamente las ROS, ha sido tradicionalmente utilizada por muchos investigadores para explicar el proceso de daño celular a lo largo de la vida de un organismo. Existen numerosos estudios donde se encuentra que el estrés oxidativo y las ROS aumentan con la edad (Cabreiro *et al.*, 2011). También se ha visto que disminuir los niveles de estrés oxidativo conlleva un aumento de la longevidad en diferentes organismos como levaduras o ratones (Kirkwood y Kowald, 2012). Sin embargo, actualmente existen tendencias que contradicen la teoría acerca del daño oxidativo causado por ROS y su papel fundamental en el envejecimiento. Las ROS son derivados del oxígeno y aún así el proceso de envejecimiento se sigue observando en organismos que viven en condiciones de anaerobiosis, por ejemplo en levaduras, donde la producción de ROS es más que limitada (Koc *et al.*, 2004). Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado que las ROS juegan un papel esencial en la señalización celular, a través de la modificación de quinasas, fosfatasa y factores de transcripción, o directamente mediante la inducción de la transcripción de promotores específicos (Ray *et al.*, 2012). A pesar de todo, un número creciente de autores sigue señalando que el daño oxidativo producido por ROS influye en el envejecimiento celular. De hecho, existen una gran cantidad de estudios que han centrado sus esfuerzos en utilizar diseños experimentales que permitan medir el daño producido por las ROS, así como diversos indicadores de estrés oxidativo, como enzimas antioxidantes (Stadtman, 1992). Sin embargo, en el

metabolismo celular existen también otros subproductos que escapan de la atención de los investigadores y que podrían ser responsables de la acumulación de daño a lo largo del proceso de envejecimiento (Stadtman, 1992). De esta manera, parece claro que el estrés oxidativo produce daño celular, pero no es la única causa de senescencia en la célula. Una de las principales carencias de la teoría del envejecimiento es su limitación para explicar la falta de equilibrio existente entre la generación de ROS y su eliminación de la célula por parte de los sistemas antioxidantes y de defensa (Sohal y Orr, 2012). De manera que actualmente no se puede explicar porqué una célula está destinada a sufrir un daño inevitable. Por lo tanto, no sólo la generación de ROS debe considerarse causa principal en el proceso de envejecimiento celular. Los fallos en los procesos biológicos (mutaciones, proteínas no funcionales, ineficiencias metabólicas) han de considerarse como factores de similar importancia a la del daño producido por ROS (Pérez *et al.*, 2009). La división celular resulta imprescindible como mecanismo para diluir el daño, hasta que las células no pueden dividirse más y alcanzan su senescencia programada. De esta forma, el daño oxidativo puede contribuir al envejecimiento, pero sólo como consecuencia del daño total producido por otros procesos biológicos ineficientes. Hay que señalar que hasta ahora muchos de los trabajos realizados y las conclusiones a las que se ha llegado se han obtenido de modelos en los que se modificaba positiva o negativamente la vida media de los organismos a través de intervenciones en la dieta, así como procesos de “Knock-out” y “Knock-down”, sobre-expresión de genes, etc. Todas estas aproximaciones implican una modificación en el metabolismo celular que afecta a las diferentes rutas a través de los mecanismos de respiración, glicolisis, metabolismo de ácidos grasos, etc., además de los mecanismos de regulación celular. Por tanto, se debe pensar que alguno de los daños observados serán similares a los que se producirían en el entorno habitual mientras que es previsible que otros de los

observados puedan ser consecuencia de la simple intervención (Gladyshev, 2014).

En definitiva, la tendencia actual lleva a interpretar el envejecimiento como el resultado de la acumulación de daño celular a diferentes niveles, siendo las ROS una de las principales causas de dicho daño pero no la única. Bajo esta premisa, las estrategias para prolongar la vida deberían ir encaminadas tanto a disminuir la acumulación de daño como a desplazar el metabolismo celular hacia estados en los que se generen diferentes tipos de daño, para minimizar su efecto.

2.3.3. Estrategias de defensa frente al estrés

2.3.3.1 Proteínas y enzimas antioxidantes

(Ďuračková, 2014)

A pesar de que, como se ha comentado, las ROS pueden actuar como señalizadores celulares, parece claro que un exceso de ROS contribuye a producir daños a diferentes niveles, por lo que el organismo cuenta con mecanismos de defensa antioxidante endógenos, principalmente proteínas y enzimas, para eliminar el exceso de ROS producido.

a) Superóxido dismutasa (SOD).

Tal y como se ha señalado anteriormente, la cadena transportadora de electrones favorece la producción principalmente de radical superóxido. Por tanto, parece lógico que la propia célula posea una primera línea de defensa consistente en una enzima, en mamíferos la SOD, capaz de transformar ese radical en una especie menos reactiva. Esta enzima cataliza la dismutación del radical superóxido a H_2O_2 que posteriormente puede ser transformado a agua

por la acción de otras enzimas como catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y/o peroxirredoxinas (Prxs) (Fridovich, 1995). SOD es la única enzima que puede detoxificar el anión superóxido y está presente tanto a nivel mitocondrial como en el citoplasma y el espacio extracelular (Fridovich, 1978). Hay tres isoformas, SOD1 (Cu/ZnSOD) es la captadora predominante de aniones superóxido y se localiza en el citoplasma, en el espacio intermembranal de la mitocondria, en el núcleo y en los lisosomas; SOD2 (MnSOD) y SOD3 se localizan en la mitocondria y en la matriz extracelular respectivamente (Trachootham *et al.*, 2008). De manera similar a los mamíferos, en *C. elegans* existen seis isoformas de SOD localizadas en diferentes compartimentos celulares. Es uno de los sistemas antioxidantes más importantes en la célula, sin embargo, una baja actividad de las mismas no siempre se relaciona con alguna patología, mientras que una alta actividad tampoco puede considerarse necesariamente como un fenómeno positivo (Ďuračková, 2014).

b) Glutatión peroxidasa (GPx)

Se encuentra localizada en el citosol y la mitocondria. Su importancia reside en que es considerada como el principal sistema antioxidante en niveles bajos de estrés oxidativo (Benner *et al.*, 2011). El término glutatión peroxidasa (GPx) se asocia a una familia de múltiples isoenzimas (GPx1–8) que cataliza la reducción de H₂O₂ a agua utilizando glutatión como donador de electrones (Margis *et al.*, 2008; Sena y Chandel, 2012). Las distintas isoformas se pueden clasificar en dependientes e independientes de Se. La forma independiente de Se, también conocida como glutatión-S-transferasa (GST), cataliza la detoxificación de varios xenobióticos, y en este caso el átomo de Se no participa en la reacción catalítica. La isoforma dependiente de Se, también conocida como GPx dependiente de Se, está compuesta por cuatro subunidades, y cada subunidad contiene un átomo de Se en el centro activo unido al aminoácido cisteína. Estas

enzimas se encargan de reducir peróxidos que son sustratos potenciales para la reacción tipo Fenton y que pueden dar lugar a radicales libres que son capaces de dañar otras macromoléculas. La mayor actividad de la GPx es detectada en el hígado, mientras que una actividad media se observa en el corazón y pulmones (Ďuračková 2014). La enzima GPx actúa en cooperación con el glutatión reducido (GSH), y se encuentra en las células en grandes concentraciones (milimoles). La enzima GPx descompone peróxidos a agua o alcohol, mientras que se produce una oxidación de GSH, de esta forma el glutatión reduce el Se del centro catalítico de la enzima. En *C. elegans*, de la misma forma que en humanos, existen diversos genes que codifican para GPx (*gpx-1* a *gpx-8*).

c) Catalasa

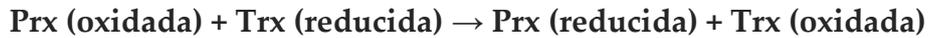
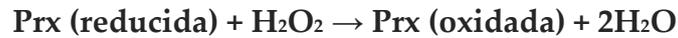
La mayoría de los organismos presentan catalasa, localizada en los peroxisomas de las células, como sistema de defensa antioxidante. Esta enzima se localiza en todos los órganos importantes, incluyendo el hígado, y en los glóbulos rojos. Se encarga de la descomposición de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. En *C. elegans* existen tres genes que codifican para tres catalasas, *ctl1*, *ctl2*, *ctl3*.

d) Peroxirredoxinas (Prx) y Tiorredoxinas (Trx)

Las Prx son una gran familia de enzimas antioxidantes que poseen cisteína en su centro activo (Rhee *et al.*, 2005). Estas enzimas se encargan de controlar los niveles de peróxidos y actúan como reguladores de señalización, mediante la modulación de los niveles de ROS en cada lugar específico dependiente de procesos redox (Trachootham *et al.*, 2008). En el caso de *C. elegans* existen tres Prx codificadas en su genoma.

Las Trx son proteínas que actúan como antioxidantes facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína.

Presentan un papel importante en la reactivación de las peroxirredoxinas a través de la reacción:



Las tiorredoxinas son reactivadas a través de su reducción por parte de la enzima tiorredoxin reductasa (TrxR) y NADPH. Su presencia es principalmente citosólica. En *C. elegans* se han encontrado un total de ocho Trx y dos TrxR.

e) *Glutación*

Es un tripéptido que juega un papel importante en la protección del organismo frente al daño oxidativo. Como ya se ha señalado anteriormente, el glutatión actúa como cofactor de algunas enzimas del sistema antioxidante (glutatión peroxidasa, glutatión transferasa, etc) y además puede reducir directamente moléculas reactivas. El glutatión oxidado es reducido por la enzima glutatión reductasa (GR) en cooperación con NADPH. Su principal fuente es el hígado donde la mayor parte del glutatión circulante se sintetiza *de novo*. Tiene un papel importante en procesos de detoxificación celular y la relación entre glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) contribuye al estatus redox de la célula.

Además de las enzimas y los péptidos antioxidantes existen otro tipo de compuestos exógenos, de diferente naturaleza que actúan como defensas antioxidantes. Muchas de estas defensas son moléculas simples que son más fácilmente oxidadas en la célula que el resto de componentes funcionales. Por ejemplo, la vitamina E, cuya naturaleza es lipídica, que se encarga de la protección de las membranas celulares frente a la oxidación. Por otra parte, la vitamina C es un compuesto hidrosoluble y protege a los compuestos polares

de su oxidación. Además de estas vitaminas en la célula pueden existir otros compuestos que actúan como antioxidantes, entre los que se incluyen la vitamina A, ubiquinol y citocromo C, entre otros (Van Raamsdonk y Hekimi 2010).

2.3.3.2 Factores de transcripción implicados en estrés y envejecimiento.

a) Ruta de la insulina y factor IGF-1

Una de las rutas metabólicas que se ha relacionado con el envejecimiento y la resistencia al estrés es la ruta de la insulina, ampliamente conservada en los organismos eucariotas. La insulina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) regulan una amplia variedad de procesos metabólicos y actividades relacionadas con el crecimiento en los tejidos diana, así como el transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno, la transcripción y traducción de genes, el proceso antiapoptótico y la replicación celular, entre otros. Esta ruta incluye, además, muchos de los genes y factores de transcripción que regulan la capacidad del organismo para sobrevivir durante estados de metabolismo reducido, la resistencia a estrés y a las formas de crecimiento detenido (formas *Dauer*).

En *C. elegans* esta ruta fundamental está regulada por péptidos semejantes a la insulina que se unen al receptor DAF-2, ortólogo del receptor transmembrana insulina/IGF1 (IGFR). DAF-2/IGFR controla la actividad de la vía de transducción de señales PI(3)K/PDK1/Akt que culmina en la regulación, mediante fosforilación, de los factores de transcripción DAF-16/FoxO, HSF-1 y SKN-1/Nrf, que gobiernan la mayor parte de las funciones de la ruta. La

fosforilación de dichos factores de transcripción regula su interacción con otras proteínas que controlan su localización subcelular e impiden su entrada al núcleo celular (Figura 10).

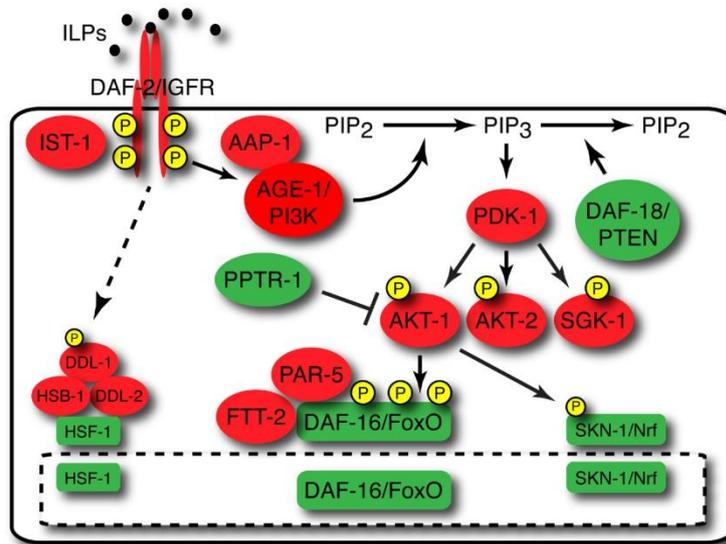


Figura 10. Ruta de la insulina en *C. elegans*. Fuente: www.wormbook.org.

Existen mutantes *daf-2* que presentan una mutación en el receptor de la insulina/IGF-1 (Kimura *et al.*, 1997) que son capaces de vivir hasta dos veces más que la cepa silvestre N2. Algunos ensayos con estos mutantes han demostrado que poseen una alta resistencia al estrés oxidativo cuando son sometidos a un generador de aniones superóxido como es el paraquat (Houthoofd *et al.*, 2003; Honda *et al.*, 2008), además de mostrar un aumento en los niveles de expresión de los genes *sod* y *ctl*, y de glutatión-S-transferasas (Van Raamsdonk y Hekimi, 2010). El aumento en la expresión de dichos genes se traduce en un incremento en la actividad de las enzimas SOD y catalasa. El aumento en los niveles de estas enzimas antioxidantes, por otra parte, produce una disminución en los niveles de glutatión en los gusanos mutantes respecto de la cepa silvestre (Brys *et al.*, 2007).

Diversos estudios han intentado evaluar si el aumento de las defensas antioxidantes es la causa principal del aumento de la longevidad en los

mutantes *daf-2*. Así, cuando se procede a la delección de los genes *sod* en mutantes *daf-2* con el objeto de eliminar la resistencia al estrés de estos gusanos, se encuentra que, a diferencia de lo que cabe esperar, la longevidad de los mismos no disminuye sino que, por el contrario, se ve aumentada (Yang *et al.*, 2007). Esta observación pone de manifiesto que la resistencia al estrés no condiciona una mayor longevidad, y por tanto lo que hace que los mutantes *daf-2* vivan más tiempo no es su capacidad para resistir mejor a los efectos negativos del daño oxidativo (Van Raamsdonk y Hekimi, 2010), por lo que debe ser otro mecanismo el que regula la longevidad a través de la ruta de la insulina.

b) *age-1*

El mutante *age-1* fue la primera cepa de *C. elegans* para la que se encontró una larga longevidad. Más tarde se descubrió que este gen codificaba una proteína relacionada en la ruta de la insulina/IGF-1 (Morris *et al.*, 1996). Los mutantes *age-1* presentan una longevidad 1,5-2 veces mayor que la cepa silvestre (Friedman y Johnson, 1988) y, en algunos casos, incluso 10 veces mayor (Ayyadevara *et al.*, 2008). Además, los mutantes *age-1* muestran un incremento de la resistencia al estrés oxidativo (Larsen, 1993; Johnson *et al.*, 2001) y, de manera consistente con el mismo, un aumento en las actividades de las enzimas SOD y catalasa (Larsen, 1993; Vanfleteren, 1993). El aumento de la actividad enzimática se relaciona con la edad de los organismos, de manera que al poseer una edad más avanzada presentan mayor actividad enzimática, por lo que no existe una relación causal entre el aumento de la resistencia a estrés y el de la longevidad, mientras que el aumento de la longevidad sí que proporciona mayor resistencia al estrés oxidativo (Larsen, 1993). De la misma forma, Adachi *et al.* (1998) demostraron que los mutantes *age-1* presentaban menor concentración de proteínas carboniladas y que los niveles de éstas no aumentaban con la edad, en comparación con lo que ocurría en la cepa silvestre.

Los mutantes *age-1* no sólo eran resistentes a estrés oxidativo inducido químicamente, sino también a otras forma de estrés, como estrés térmico (Lithgow *et al.*, 1995), radiación UV (Murakami y Johnson, 1996) y exposición a metales pesados (Barsyte *et al.*, 2001), lo que también contribuiría a una mayor longevidad. En definitiva, el aumento en la duración de vida de los mutantes *age-1* está asociado con una mayor resistencia al estrés oxidativo y por lo tanto un menor daño. Sin embargo, el aumento en la resistencia al estrés no sería el único factor que contribuiría a su longevidad, sino que la misma sería el resultado de un conjunto de factores con repercusión sobre el envejecimiento.

c) Factores relacionados con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) y el elemento de respuesta antioxidante (ARE)

Uno de los mecanismos de defensa antioxidante de la célula consiste en la inducción coordinada de genes que codifican proteínas de fase II. Todas las secuencias de este tipo de proteínas detoxificantes coinciden en la existencia de una región específica de unión denominada ARE (*Antioxidant Response Element*). El elemento ARE es una región amplificadora (“enhancer”) con una secuencia definida como 5'-TGACnnnGCA-3'. Esta región se activa por diversos compuestos oxidantes como quinonas, difenoles, metales pesados, etc (Lee y Johnson, 2004; Lee y Surh, 2005), regulando de esta forma las defensas antioxidantes de la célula en situaciones de estrés oxidativo.

Los factores relacionados con el factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) se conocen como Nrf (*Nuclear Factor Erythroid 2-related factors*) y se han relacionado con su respuesta a elevados niveles de estrés oxidativo. En condiciones normales, la ruta de Nrf2 está suprimida mediante el secuestro de Nrf2 en el citoplasma a través de la interacción con la proteína de unión a actina Keap1. Cuando el complejo Nrf2/Keap1 interactúa con ROS o productos de oxidación de lípidos, Keap1 sufre un cambio conformacional y libera Nrf2 (Kaspar *et al.*, 2009;

Dinkova-Kostova *et al.*, 2002), de esta forma Nrf2 se transloca al núcleo donde puede interactuar con ARE y regular la expresión de múltiples genes (Jaiswal, 2004; Kaspar *et al.*, 2009), promoviendo la síntesis de proteínas necesarias para la síntesis de glutatión y otros electrófilos detoxificadores (Nioi *et al.*, 2003). Adicionalmente el gen que codifica Nrf2 contiene dos secuencias ARE en su región promotora, de manera que Nrf2 puede autorregularse y mediar la respuesta de expresión de genes antioxidantes (Kwak *et al.*, 2002; Kensler *et al.*, 2007). Paralelamente, la ruta Nrf2/Keap1/ARE puede ser activada por proteínquinasas intra o extracelulares (PKC, ERK), fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y p38 MAP quinasa (MAPK) vía fosforilación. Se ha descrito que algunos compuestos bioactivos pueden igualmente activar el complejo Nrf2/Keap1 precisamente a través de la fosforilación inducida por ERK o PI3K.

En *C. elegans*, el factor de transcripción SKN-1 es el ortólogo al Nrf-2 en mamíferos y, de la misma forma, se activa en respuesta a altos niveles de estrés oxidativo, o frente a compuestos como H₂O₂, paraquat o juglona, y la activación de genes de transcripción de enzimas de fase II encargadas de detoxificar elementos nocivos (An y Blackwell, 2003; Tullet *et al.*, 2008). De hecho, se ha sugerido que el aumento de longevidad en *C. elegans* bajo los efectos de la restricción calórica se produce debido a la activación de SKN-1, mediante el aumento de la tolerancia al estrés al disminuir la actividad en la ruta de las enzimas de fase II (Honda y Honda, 1999; Kaletsky y Murphy, 2010). La regulación de los mecanismos de SKN-1 son diferentes en el caso de *C. elegans*, ya que se regulan mediante la proteína WDR-23, que actúa como homóloga de Keap1, produciendo la translocación nuclear.

2.4. Polifenoles y enfermedad

En los últimos años, diversos estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en polifenoles está asociada con un menor riesgo de incidencia de enfermedades cardiovasculares y degenerativas (Checkoway *et al.*, 2002), y algunos tipos de cáncer (Kuriyama *et al.*, 2006). En concreto el grupo de los flavonoides ha sido objeto de muchos estudios, especialmente *in vitro*, mostrando un alto potencial en estudios con animales y humanos (Schroeter *et al.*, 2001).

2.4.1 Polifenoles y enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), y en particular el infarto de miocardio, son la mayor causa de mortalidad en los países desarrollados (OMS). Las ECV se caracterizan por estar afectadas por un amplio abanico de factores, tanto genéticos como ambientales, que hacen que sea difícil establecer las causas concretas de su desarrollo. A pesar de todo, muchos estudios sugieren que una dieta regular rica en polifenoles, presentes en alimentos como frutas, vegetales, cacao, té o vino tinto, podría ejercer un efecto beneficioso frente a las enfermedades cardiovasculares (Hertog *et al.*, 1997; Arts *et al.*, 2001; Mink *et al.*, 2007).

Algunos estudios han relacionado el consumo de polifenoles con una menor incidencia de enfermedad arterio-coronaria y una menor tasa de mortalidad por accidente cardiovascular. Por ejemplo, se observó que el consumo de al menos tres tazas de té al día se asociaba a un 11% menos de incidencia de enfermedad coronaria, mientras que el consumo moderado de vino tinto, la reducía en un 32% (Arts y Hollman, 2005). Sin embargo, existe una controversia sobre cuáles serían los compuestos activos, ya que existen multitud de factores que impiden

concluir sobre este punto, como las diferentes dietas y estilos de vida de los participantes en los distintos estudios, la forma de administrar los compuestos, o las dificultades metodológicas para determinar los compuestos o sus metabolitos en el organismo. Del mismo modo, los diferentes tipos de flavonoides investigados y el tipo de población sobre la cual se realiza el estudio pueden modificar los resultados observados (Vita, 2005).

Algunos autores han propuesto que los polifenoles podrían ejercer su efecto mediante la inducción de defensas antioxidantes endógenas (Stein *et al.*, 1999; Rein *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 2001), disminuyendo la tensión arterial (Desch *et al.*, 2010; Taubert *et al.*, 2007), mejorando la función endotelial (Grassi *et al.*, 2005), inhibiendo la agregación plaquetaria o disminuyendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Wan *et al.*, 2001). Uno de los mecanismos de acción de los polifenoles respecto a la función cardiovascular, se relaciona con su capacidad para modular la actividad y los niveles de la enzima óxido-nítrico sintasa endotelial (eNOS) y, por lo tanto, la biodisponibilidad de óxido nítrico en el endotelio (Leikert *et al.*, 2002). Además, también se ha descrito la capacidad de estos compuestos para interactuar con la ruta de señalización de las quinasas, como la PI3K/Akt que se encarga de la fosforilación y consecuente producción de NO (Lorenz *et al.*, 2004).

2.4.2 Polifenoles y neurodegeneración

Las enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson y el Alzheimer, representan un problema creciente en las sociedades envejecidas (Nussbaum y Ellis, 2003). Este tipo de enfermedades aparecen propiciadas por un compendio de factores, que incluyen neuroinflamación, aumento del estrés oxidativo o disminución de los sistemas de defensa antioxidante, entre otros (Barzilai y Melamed, 2003). En estudios epidemiológicos se ha observado que una ingesta regular de flavonoides en la dieta se relaciona con una reducción en el riesgo de padecer demencia, un retraso en la aparición de Alzheimer y una disminución en la incidencia de Parkinson (Commenges *et al.*, 2000; Checkoway *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2006).

La biodisponibilidad de los flavonoides en el cerebro es todavía un proceso poco conocido. Diversos estudios han identificado la presencia de algunas flavanonas, como la hesperina y narigenina, y antocianos y sus metabolitos derivados en el cerebro de animales de experimentación. Esto sugiere que algunos flavonoides podrían ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica pudiendo actuar como neuroprotectores o modular la función neuronal (Youdim *et al.*, 2004; Passamonti *et al.* 2005; Kalt *et al.*, 2008). En sistemas modelo se ha demostrado la capacidad de determinados flavonoides para proteger el cerebro mediante el aumento de la función neuronal, la estimulación de la regeneración de las neuronas dañadas (Youdim y Joseph, 2001) y la protección de las neuronas frente al estrés oxidativo (Inanami *et al.*, 1998).

Estudios llevados a cabo con *Ginkgo biloba* (extractos con alto contenido en flavonoides) utilizando líneas celulares encontraron un efecto neuroprotector mediante la protección de las neuronas frente al óxido nítrico (Bastianetto *et al.*, 2000). En ensayos con animales se observó que antocianos e isoflavonas reducían la neurodegeneración asociada a la edad (Shan *et al.*, 2009), y que la

flavanona tangeretina producía una mejora en las patologías asociadas a la enfermedad de Parkinson (Datla *et al.*, 2001). En el mismo sentido, flavonoides como como quercetina, rutina y fisetina (Maher *et al.*, 2006; Pu *et al.*, 2007) mostraron efectos positivos a la hora de revertir los efectos causados por el envejecimiento en ratas tratadas con estos compuestos.

2.4.3 Polifenoles y cáncer

Estudios llevados a cabo tanto en animales de experimentación como en líneas celulares sugieren la eficacia de los flavonoides de la dieta en la protección contra diferentes tipos de cáncer (Watson *et al.*, 2000; Wenzel *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios realizados en humanos han conducido a resultados contradictorios o no tan beneficiosos (Goldbohm *et al.*, 1996; Tsubono *et al.*, 2001). Los estudios en líneas celulares representan una potente herramienta para tratar de identificar los mecanismos de acción de los flavonoides, así como potenciales dianas moleculares que permitan el tratamiento de las células cancerosas. Los polifenoles podrían tener efectos quimioprotectores frente a diversos tipos de cáncer, actuando en etapas tempranas de iniciación de los tumores o interviniendo en las rutas de proliferación de los mismos (Manson, 2003; Surh, 2003). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la actividad quimioprotectora de un compuesto puede ser efectiva para un tipo de célula cancerosa y no mostrar efecto ninguno en otro tipo de tejido. Por ello, los estudios realizados en este sentido deben tener en cuenta el compromiso entre el efecto citotóxico de los flavonoides frente a células tumorales y el efecto citoprotector en células sanas. Además, se ha observado que el efecto de los flavonoides muestra un comportamiento dosis-dependiente diferente en cada tipo de célula.

Estudios con quercetina mostraron una reducción en la actividad tumoral en diferentes líneas celulares de adenocarcinoma de cáncer de colon (Gee *et al.*,

2002; Dolara *et al.*, 2005; Goss *et al.*, 2005; Barth *et al.*, 2007). En el mismo sentido, flavonoides del té verde demostraron propiedades anticarcinogénicas frente a lesiones gástricas (Meia *et al.*, 2005) y en la inhibición de la proliferación y la metástasis en estadios tempranos en ratas (Liu *et al.*, 2001). Flavonoides, especialmente flavonas, mostraron en intestino e hígado un aumento en la actividad de enzimas como glutatión-S-transferasa (GST) que se encargan de inactivar radicales y ROS que pueden desencadenar mutagénesis en los tejidos (Nijhoff *et al.*, 1993; Vander *et al.*, 2003). Sin embargo, otros flavonoides como genisteína, isoflavona abundante en la soja, ha demostrado promover la iniciación del cáncer de mama en ratones (Hsieh *et al.*, 1998).

La presencia de ROS puede contribuir al proceso de iniciación tumoral (Hanahan y Weinberg, 2000). Los flavonoides debido a su actividad antioxidante podrían impedir el desarrollo del cáncer en su etapa más temprana, además de prevenir el daño oxidativo al ADN producido por las ROS (Surh, 2003). Los flavonoides podrían actuar a través de varios mecanismos: 1) captación directa de ROS, 2) quelación de metales implicados en reacciones de Fenton, y 3) modulación de enzimas y demás defensas antioxidantes frente al estrés oxidativo (Surh, 2003). Se ha demostrado que flavonoides como quercetina, rutina y epicatequina-3-O-galato (EGCG) son capaces de disminuir la aparición de tumores en su fase de iniciación al modificar los niveles de GSH y modular la actividad de diferentes enzimas antioxidantes (GPx, SOD y catalasa) en distintos estudios sobre líneas celulares (Murakami *et al.*, 2002; Alia *et al.*, 2006b; Vasquez-Garzón *et al.*, 2009).

Durante el proceso de iniciación tumoral, los flavonoides pueden también intervenir sobre el metabolismo de los agentes carcinogénicos mediante la inhibición e interacción con enzimas antioxidantes de fase I, como el citocromo P450 (CYP), que se encarga de activar metabólicamente muchos compuestos que pueden interactuar con neutrófilos celulares y desencadenar carcinogénesis,

además de modular la actividad de las enzimas CYP1A1 y CYP1A2 (isoenzimas de P450) relacionadas con las primeras etapas de la carcinogénesis (Tsyrllov *et al.*, 1994; Marchand *et al.*, 2000). También se ha descrito que pueden intervenir en la activación o modulación de la expresión génica de enzimas detoxificantes de fase II implicadas en reacciones de glucuronidación, sulfatación, acetilación o metilación (Surh, 2003; Ramos, 2008)

La modulación de las vías de transducción de señales PI3K/AKT, MAPKs (ERKs, JNKs, p38 MAPKs), PKCs, AP-1 y NF- κ B está relacionada con la regulación de la supervivencia, proliferación celular y muerte celular programada (Ballif y Blenis, 2001; Nicholson y Anderson, 2002). El efecto antiproliferativo de los flavonoides se ha descrito por muchos autores. En ocasiones esta reducción en la progresión de las células tumorales está relacionada con la inhibición del agente oxidante que promueve el desarrollo del tumor. Así, algunos autores han demostrado que los polifenoles son capaces de inhibir la enzima xantina oxidasa (Chang *et al.*, 1993) y la ciclo-oxigenasa (COX; Mutoh *et al.*, 2000), que son importantes en la progresión tumoral. Del mismo modo, existen evidencias sobre efectos de flavonoides en el ciclo celular que podrían explicar su efecto antiproliferativo. Varios tipos de cáncer están relacionados con la hiper-activación de ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) debido a mutaciones o represiones en los genes codificantes de esas ciclinas. Por ello, encontrar inhibidores o moduladores de la actividad de CDKs representa un nuevo reto en el tratamiento contra el cáncer. Algunos autores han demostrado que la inhibición en el ciclo celular por el alcaloide de naturaleza flavonoide flavopiridol podría estar mediada por la inhibición de CDKs (Senderowicz, 1999; Wang, 2000).

La apoptosis celular es otro efecto en el que podrían intervenir los flavonoides. Estudios con líneas celulares han demostrado que los flavonoides pueden inducir apoptosis en células cancerosas, mientras que el efecto no se observa en

células sanas. Algunos autores han relacionado la capacidad de inducir apoptosis por parte de los flavonoides con una alteración en la expresión de proteínas de shock térmico (HSP; Rong *et al.*, 2000), con la disminución de ROS (Lee *et al.*, 2002) y con la modificación de las rutas de señalización molecular (Yin *et al.*, 1999).

Por otra parte, los flavonoides pueden actuar como pro-oxidantes dependiendo de la célula tratada, así como de la dosis y el tiempo de exposición. Este efecto pro-oxidante se debe a la alta reactividad de algunos compuestos derivados del metabolismo de flavonoides y que pueden dar lugar a la apoptosis celular de manera que puede evitar y prevenir el desarrollo de tumores. En estudios en células tumorales de mama y de adenocarcinoma pulmonar se ha demostrado la capacidad de epigallocatequina (EGC) y de quercetina para inducir la apoptosis mediante un aumento de los niveles intracelulares de ROS, traducido en la formación de H_2O_2 (Yang *et al.*, 2000).

MATERIALES
Y
MÉTODOS GENERALES

3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1. Instrumentación y equipos

- Incubadoras refrigeradoras Velp modelo FTC 901.
- Autoclave Selecta modelo Presoclave II.
- Campana de flujo laminar Telstar modelo AV-30/70.
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453 acoplado a un ordenador HP LE 2001 con programa de procesamiento de datos Agilent ChemStation para espectroscopía UV-visible.
- Baño ultrasonido Branson modelo 5510.

Sonicador Microson™ XL2000 100

- Lupa Leica M250 FA con cámara Leica DFC420C y software de aplicación V3.
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies) compuesto por bomba cuaternaria, inyector automático, sistema de termostatación de columnas y detector de diodos en circuito integrado, dotado de una celda de flujo para altas presiones, y acoplado a una estación de control y tratamiento de datos HP ChemStation (rev. A.05.04).
- Equipo de cromatografía líquida semi-preparativa, Agilent Technologies 1260 Infinity, acoplado a una bomba binaria, inyector automático, detector de diodos y a una estación de control y tratamiento de datos (openLAB CDS Chem station)
- Liofilizador Telstar modelo LyoQuest.

- Espectrómetro de masas Applied Biosystems modelo API 3200 Qtrap, equipado con fuente de ionización por electrospray y analizador de masas triple cuadrupolo/trampa de iones lineal controlado por el software Analyst 5.1.
- Agitador Vortex IKA Genius 3.
- pHmetro Crisol Basic 20.
- Agitador magnético SBS.
- Baño maría Bunsen.
- Rotavapores Büchi R-124, con baño de agua termostatizable B-480 y bombas de vacío B-270.
- Incubador de CO₂ Thermo Scientific™ serie 8000.
- Lector de microplacas FLUOstar Omega (BGM LABTECH, Ser.415-1562)
- Ultracentrífuga refrigerada Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments).
- Centrífuga para tubos eppendorf (Thermo Scientific heraeur Fresco 17)
- Balanza analítica Mettler Toledo AG245
- Concentrador rotatorio Genevac modelo Mivac DNA .
- Sistema de producción de agua ultra pura Direct-QTM 3 de Millipore

3.2 Material y reactivos específicos.

- **Sigma Aldrich:** ampicilina sódica, nistatina, colesterol, epicatequina, extracto de levadura, quercetina, catequina, agar, triptona, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (juglona), seroalbúmina bovina, reactivo de Bradford, SDS, fluorodesoxiuridina (FUdR), 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), glutatión reducido (GSH), NADPH, glutatión reductasa, *minimum essential medium eagle* (MEME), RPMI-1640 AQmedia, suero fetal bobino (FBS), 0,25% tripsina-EDTA, azul de tripano, sulforrodamina B (SRB), tris-HCl y soluciones antibióticas y antimicóticas.
- **Scharlau:** dimetil sulfóxido de grado espectroscópico, ácido trifluoroacético.
- **Merck:** acetonitrilo, fosfato di-hidrógeno de potasio, sulfato de magnesio, hidróxido de sodio, fosfato mono-hidrógeno de potasio, fosfato mono-hidrógeno de sodio, Tween 20, ácido tricloroacético,
- **VWR Prolabo:** etanol, ácido fórmico, ácido acético. placas microtiter Brand 96 pocillos pureGrade, base transparente con fondo plano y placas Petri Ø 90 mm y Ø 35 mm.
- **Extrasynthèse:** quercetina-3-O-glucopiranosido, isoramnetina, tamarixetina.
- **Fluka Analytical:** peptona de soja, medio Triptona, ácido acético glacial, dimetil sulfóxido (DMSO)
- **Epigentek:** Kit para la determinación de 8'-OHdG.
- **Roche:** Nucleasa P1.
- **Biorad:** ARNasa, fosfatasa alcalina.
- **Panreac:** *ter*-butil hidroperóxido (t-BOOH), Hipoclorito sódico, cloruro de sodio.

- Los gusanos *C. elegans* y las bacterias *Escherichia coli* OP50 utilizadas como fuente de alimento para el nematodo, fueron obtenidos del *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC) de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, EEUU).
- Las líneas celulares utilizadas fueron suministradas por TPP (Trasadingen, Switzerland).

3.3. Preparación de flavonoides y metabolitos

3.3.1. Preparación de quercetina-3-O-glucurónido.

La quercetina-3-O-glucurónido (Q3GlcA) se aisló de judías verdes como se describe en Dueñas *et al.* (2011). El material vegetal se extrajo con metanol 70%. Una vez preparado el extracto, se eliminaron los componentes liposolubles con n-hexano. Posteriormente el extracto se depositó en una columna de poliamida, se realizaron lavados sucesivos con *buffer* fosfato (pH 7,0- 0,1 M) y metanol, el compuesto de interés se eluyó con una mezcla de metanol-hidróxido amónico (99,5:0,5 v/v), y finalmente se purificó mediante HPLC-semipreparativa. La identidad y pureza del compuesto obtenido se comprobaron por HPLC-DAD-ESI/MS y mediante comparación con un patrón previamente aislado e identificado mediante RMN (Dueñas *et al.*, 2011).

3.3.2. Síntesis de sulfatos de quercetina y de epicatequina

Estos compuestos fueron sintetizados químicamente mediante una adaptación del método de Jones *et al.* (2005) previamente descrita por nuestro grupo (González-Manzano *et al.*, 2009; Dueñas *et al.*, 2012). La quercetina o epicatequina comerciales se disolvieron en dioxano y se dejaron reaccionar con un complejo trióxido de azufre-N-trietilamina en una concentración molar diez veces mayor a la de quercetina o epicatequina. La reacción se llevó a cabo en baño de agua a 40 °C durante 90 min bajo una atmósfera de argón, con el fin de evitar el contacto con el aire. Posteriormente el dioxano se decantó y el producto obtenido se redisolvió en una mezcla de metanol-agua 10:90. A continuación, los compuestos se fraccionaron en columna de Sephadex LH-20

mediante eluciones con etanol-agua 10:90 v/v y 20:80 v/v sucesivamente, con el fin de separar monosulfatos, disulfatos y aglicones de quercetina o epicatequina. Las fracciones que contenían los monosulfatos se concentraron a sequedad bajo vacío, se redisolvieron en agua ultrapura y se sometieron a purificación mediante HPLC-semipreparativa. Se pudo así obtener epicatequina-3'-O-sulfato y quercetina-4'-O-sulfato con una impureza de quercetina-3'-O-sulfato (11,5%). La pureza e identidad de los compuestos se comprobaron por HPLC-DAD-ESI/MS y comparación con patrones previamente aislados e identificados en nuestro laboratorio (Dueñas *et al.*, 2012).

3.3.3. Síntesis y purificación de metabolitos metilados de epicatequina y catequina

Los derivados metilados de epicatequina se obtuvieron por semisíntesis química mediante el protocolo descrito por González-Manzano *et al.* (2009), que es una adaptación del método descrito previamente por Donovan *et al.* (1999). Se prepararon mezclas de catequina o epicatequina (250 mg), carbonato potásico (500 mg) y yoduro de metilo (1 mL) en acetona, se sometían a irradiación en un baño de ultrasonidos durante 3,5 h y transcurrido este tiempo se filtraba y se llevaba a sequedad en rotavapor. Los residuos recuperados con agua ultrapura se fraccionaron por HPLC semipreparativa para la obtención de compuestos puros (3'- y 4'-metiléteres de catequina y epicatequina).

3.4 Ensayos con líneas celulares.

3.4.1 Condiciones de cultivo y mantenimiento.

Se utilizaron tres líneas celulares tumorales: Caco-2 (colon), BxPC-3 (páncreas) y MCF-7 (mama), y una línea de células sanas de fibroblastos humanos (HFF-1).

Las células se mantuvieron en monocapas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Como procedimiento de rutina, las células Caco-2 y HFF-1 se cultivaban en placas de 25 cm² como monocapas en *Minimum Essential Medium Eagle* (MEME), enriquecido con 15% de suero fetal bovino (FCS) y con L-alanina-L-glutamina (2 mM), y las células BxPC-3 y MCF-7 en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de suero fetal bovino (SBS) inactivado térmicamente. En todos los casos se añadía un 1% de una solución con mezcla de antibióticos y antimicóticos (100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0,25 µg/mL de anfotericina B).

Las células se recogían y se separaban mediante tripsinización una vez a la semana. Para el proceso de tripsinización se utilizaba una solución de 0,25%, w/v, de tripsina-EDTA₄-Na.

3.4.2 Evaluación de la proliferación celular.

El efecto de los compuestos en el crecimiento de las líneas celulares se evaluó mediante el procedimiento adoptado por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI, USA) mediante tinción con sulforrodamina B (SRB) (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991). Las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos en una concentración de $1,5 \times 10^5$ células/mL para las células tumorales (Caco-2, MCF-7, BxPC-3) y de $0,25 \times 10^5$ células/mL para las células no tumorales (HFF-1). Las placas se incubaron durante 24 h para permitir su

crecimiento antes de añadir los compuestos. El efecto del disolvente DMSO se evaluó en todos los experimentos mediante la exposición de células control a la máxima concentración de DMSO (0,1%) usada en los ensayos. Una solución *stock* de cada compuesto estudiado se preparó en DMSO y se almacenó a -20 °C para su posterior uso. Antes de cada ensayo se prepararon disoluciones frescas de cada compuesto por dilución de la solución madre. Posteriormente cada línea celular era incubada con su respectivo compuesto durante 2 días, con una concentración máxima de DMSO de 0,1%. La incubación de las células se detenía mediante la adición de una disolución de ácido tricloroacético (TCA, 50%) manteniendo luego durante 1 hora a 4 °C. A continuación las placas se lavaban sucesivamente con agua (4 veces) para eliminar los posibles restos de TCA, y se dejaban secar a temperatura ambiente durante toda la noche, o una hora a 37 °C.

Las placas se teñían con una solución al 0,4% de SRB durante 30 min en oscuridad. El exceso de colorante se eliminaba con una solución de ácido acético al 1%. Una vez que las placas estaban teñidas y completamente secas, el exceso de colorante se lavaba con Tris-buffer (10 Mm, pH 10,5) y se procedía a la cuantificación por medida espectrofotométrica a 492 nm. La actividad antiproliferativa se expresa como el porcentaje de supervivencia de las células calculado como la relación entre la medida obtenida en las células tratadas y la obtenida en las células control (%T/C).

3.5. Ensayos con *C. elegans*.

Todos los ensayos realizados en esta tesis doctoral fueron llevados a cabo usando la cepa silvestre N2 de *C. elegans*.

3.5.1 Preparación del medio de cultivo para *C. elegans* (Nematode Growth Medium, NGM)

Se mezclan 3 g de NaCl, 17 g de agar, 2,5 g de peptona en 975 mL de H₂O destilada y se autoclava durante 50 min para su posterior uso. Al medio preparado se le añade 1 mL de CaCl₂ 1M, 1 mL de colesterol (5 mg/mL en etanol), 1 mL de MgSO₄ 1M, 25 mL de buffer KPO₄ 1M, pH 6,0 (108,3 g KH₂PO₄ + 35,6 g K₂HPO₄ en 1L de H₂O), 1 mL de ampicilina sódica (50 µg/mL) y 1,75 mL de nistatina (4%), todos ellos previamente esterilizados mediante autoclavado. El agar fundido se añade a placas Petri de Ø 90 mm (20 mL) en condiciones de esterilidad y en campana de flujo laminar, donde se dejan enfriar durante 24 horas.

3.5.2 Preparación del medio de cultivo para *Escherichia coli* OP50 y sembrado de las placas. NGM

Las bacterias (*E. coli* OP50) se cultivan en medio L. Broth, que contiene: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g NaCl en 1L de H₂O destilada. El pH se ajusta a un valor de 7,0 con NaOH 1M, y el medio de cultivo se esteriliza en autoclave. Se coge alrededor de 100 mL de este medio en un erlenmeyer previamente autoclavado, se inocula una colonia aislada de *E. coli* y se deja toda

la noche a temperatura de 37 °C. Este cultivo de *E.coli* se almacena a 4 °C y puede ser usado durante varias semanas.

Las colonias aisladas de *E. coli* OP50 se almacenan en placas de LB Agar preparado con 3,4 g de agar, 2 g de medio triptona, 1 g de extracto de levadura, 1 g de cloruro sódico y 200 mL de agua destilada. Todo ello esterilizado en autoclave. Tras mantenerlo 20 min en un baño a 60 °C se añaden 200 µL de ampicilina.

Las placas con medio NGM estéril, previamente preparadas y secas, se inoculan con aproximadamente 200 µL del cultivo de *E. coli*. crecidas en el medio de cultivo L Broth y se dejan durante 24 horas a temperatura ambiente con el fin de obtener un césped de bacterias.

La siembra de gusanos se hace transfiriendo un trozo de agar con gusanos desde una placa antigua a una placa fresca con ayuda de un bisturí o de una espátula esterilizados. Para transferir gusanos individualmente se usa un asa de siembra de alambre de platino de calibre 32.

3.5.3. Sincronización de los gusanos.

La sincronización de *C. elegans* se llevó a cabo para obtener individuos de la misma edad o estado larvario. Para ello se partía de una placa con alto número de nematodos en edad fértil y que tuvieran alta cantidad de huevos en su interior. Los gusanos eran recogidos en un tubo *Falcon* con buffer M9 (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl , 1 mL MgSO_4 1M, H_2O hasta 1 L, esterilizado por autoclavado) y se centrifugaba durante 2 min a 3000 rpm con el fin de lavar los gusanos. El sobrenadante se retiraba y sobre el residuo de gusanos previamente centrifugados se añadía 20 mL de una solución de hipoclorito sódico al 12% con el fin de destruir todas las larvas y la carcasa de los gusanos

adultos sin afectar a los huevos. La mezcla se agitaba vigorosamente durante 10 min (alternando cada minuto un ciclo de agitación con un ciclo de reposo del tubo en hielo). Pasados los 10 min, la mezcla se centrifugaba durante 1 min a 3000 rpm y 4 °C y a continuación se eliminaba el sobrenadante. Este proceso se repetía una vez más con otros 20 mL de hipoclorito sódico.

El pellet de huevos se lavaba varias veces con buffer M9 para eliminar completamente los residuos de hipoclorito sódico y finalmente se resuspendía en 1 mL de solución M9 y almacenaba a 15 °C para su posterior utilización.

3.5.4 Preparación de placas para los ensayos con flavonoides.

Los medios de cultivo enriquecidos en flavonoides se prepararon en placas de agar NGM donde se incorporaba el compuesto a ensayar. Para ello se partía de una disolución madre de cada flavonoide (200 mM) en DMSO de la que se añadía a la placa el volumen necesario para obtener la concentración deseada en el medio de cultivo (200 µM). En todos los casos las placas contenían una concentración final de 0,1% de DMSO en el medio de cultivo, incluyendo las placas control libres de flavonoides, donde se incorporaba esa misma proporción de disolvente para mantener la composición constante en todos los casos. Las placas además eran inoculadas con *E. coli* OP50 como se ha descrito previamente.

3.5.5 Ensayos de estrés térmico.

Para los ensayos de estrés térmico se partía de una población de *C. elegans* que se sometía al proceso de sincronización con el objeto de obtener huevos del nematodo y tener todos los individuos en las placas en el mismo estadio de desarrollo. Los huevos se sembraban en las placas que contenían el compuesto que se pretendía ensayar (200 μ M) y en placas control (carentes del flavonoide). Ambos tipos de placas habían sido sembradas con *E. coli* previamente, que se dejaron crecer 24h. Para llevar a cabo el sembrado de los huevos se utilizaba una pipeta de manera que se añadía el mismo volumen de suspensión a cada placa, para intentar obtener una mayor homogeneidad entre réplicas. Los gusanos se dejaban crecer hasta alcanzar la fase L4, momento a partir del cual eran transferidos cada dos días a placas frescas, que además contenían FUDR (2'-desoxi-5-fluorouridina) con el fin de prevenir la puesta de huevos y evitar una mezcla de generaciones. Las placas se mantenían en esas condiciones hasta que los gusanos alcanzaban el sexto día de adulto, o la biomasa necesaria para realizar el ensayo, en el caso de la determinación de ADN oxidado. En ese día las placas se colocaban en estufa para someter a los gusanos a shock térmico (5 h, 35 °C) A continuación se recolectaban todos los gusanos procedentes de tres placas y se introducían en un tubo con solución M9 (alrededor de 1500-3000 individuos). En paralelo se realizaban ensayos con gusanos no sometidos a estrés, que se recogían y se trataban del mismo modo. La suspensión se centrifugaba (12000 g, 5 min) y el pellet se lavaba con PBST (PBS + 0,01% Tween 20) dos veces, y una tercera vez sólo con PBS. Posteriormente las muestras se disgregaban con la ayuda de un Vortex y se sonicaban seis veces en un disruptor celular para obtener un homogeneizado; a continuación se centrifugaba (13000 g, 5 min, 4 °C) y se recolectaba el sobrenadante para la determinación de glutatión y de las distintas actividades enzimáticas como se describe en los apartados 3.5.7 y 3.5.8.

Para cada tratamiento se realizaron tres ensayos independientes, y en cada experimento las determinaciones se hicieron por triplicado a partir de tres homogeneizados diferentes.

3.5.6 Ensayos de estrés oxidativo.

En estos ensayos se procedió de la misma forma que para los ensayos de estrés térmico, aunque, en este caso, cuando los gusanos alcanzaban el estadio L4 se transferían a placas con juglona (500 μ M) durante 20 min con el objetivo de someterlos a un estrés oxidativo inducido químicamente. Transcurrido ese tiempo se lavaban sucesivamente, primero con agua, posteriormente con PBST y PBS y, por último, nuevamente con agua. La mezcla se centrifugaba y el pellet se resuspendía en 1 mL de PBS y almacenaba a -20 °C durante 12 h. A continuación las muestras se disgregaban con la ayuda de un Vortex y se sonicaban seis veces en un disruptor celular para obtener un homogeneizado; seguidamente se centrifugaba (13000 g, 5 min, 4 °C) y se recolectaba el sobrenadante para la determinación de glutatión y de las distintas actividades enzimáticas (apartados 3.5.7 y 3.5.8).

3.5.7 Determinación de glutatión reducido (GSH).

Los niveles de GSH en los gusanos se determinaron según el método de Beutler *et al.* (1963) en el sobrenadante obtenido tras homogeneización de las muestras como se describe en los apartados 3.5.5 y 3.5.6. Este método se basa en la formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzóico a partir del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) en presencia de GSH. Se añadían 150 μ L de ácido tricloroacético 15% a 300 μ L de homogeneizado de gusanos y seguidamente se centrifugaba a 13000 g durante 5 min a 4 °C. Posteriormente se tomaba una

alícuota de 100 μ L del sobrenadante y se mezclaba con 400 μ L de EDTA 3,4 mM preparado en PBS. A continuación se añadía 1 mL de PBS y 250 μ L de DTNB (preparado en PBS, 20 mg/mL) y las muestras se incubaban 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se medía la absorbancia a 412 nm. La concentración de GSH total en las muestras se determinó por interpolación de las medidas de absorbancia en una recta de calibrado de GSH (0,5-0,010 mM).

3.5.8 Determinación de las actividades glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).

Las actividades enzimáticas GPx, CAT y SOD se determinaron en los sobrenadantes obtenidos tras homogeneización de las muestras, como se describe en los apartados 3.5.5 y 3.5.6

La determinación de la actividad glutatión peroxidasa se basa en la oxidación de GSH por GPx usando *ter*-butil hidroperóxido (t-BuOOH) como sustrato en la reacción, acoplado a la desaparición de NADPH, por parte de la enzima glutatión reductasa. Para ello se preparaba una mezcla con 0,9 mL de tampón fosfato potásico 50 Mm, 20 μ L de Glutatión reductasa y 20 μ L de NADPH 9,6 mM. A la mezcla se le añadía 50 μ L de la muestra y se medía la absorbancia a 340 nm durante 2 min. A continuación se añadían 20 μ L de t-BOOH 30 mM y se volvía a medir la absorbancia durante 2 minutos más para monitorizar la desaparición de NADPH (Alia *et al.*, 2005).

La actividad catalasa se determinó como el ratio de desaparición de peróxido de hidrógeno, para ello se tomaba una alícuota de la muestra (0,750 mL) y se le añadía H₂O₂ (0,375), monitorizando la disminución en la absorbancia a 240 nm, durante 2 min a intervalos de 10 s (Aebi, 1987).

La actividad superóxido dismutasa se midió mediante ensayo con lucigenina. El sistema xantina/xantina oxidasa usado en este método genera un flujo de aniones superóxido en el medio; la lucigenina reacciona con el superóxido generado produciendo quimioluminiscencia. La enzima SOD compite con la lucigenina por los aniones superóxido y reduce intensidad en la luminiscencia. De esta forma la actividad de SOD puede determinarse como la reducción en la quimioluminiscencia de la lucigenina (Houthoofd *et al.*, 2003). Para ello, se tomaban alícuotas de 6,7 μL de diluciones seriadas de las muestras (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 preparadas en PBS) y se añadían por triplicado a un pocillo de una placa de 96 pocillos. Como blanco se utilizaba agua. A continuación se añadían 20 μL de xantina oxidasa diluida 1:5 en agua destilada y, por último, 174 μL de mezcla de reacción (5,2 mL de glicina 0,1 M, 1mL de EDTA 1 mM, ajustado a pH 9,0 con NaOH, 10 mL de xantina 0,108 mM, 2,1 mL de lucigenina 1 mM y 1,2 mL de agua hasta un total de 18,5 mL) rápidamente incorporados con ayuda de una pipeta multicanal. La luminiscencia se medía a 25 °C durante el tiempo requerido para medir 25 ciclos.

3.5.9 Determinación de proteínas totales

Se determinó el contenido de proteínas en los homogeneizados de *C. elegans*, obtenidos del modo que se describe en los apartados 3.5.5 y 3.5.6, con el objeto de normalizar los resultados en algunos de los ensayos expresándolos con relación al contenido proteico total. Para ello se utilizó el método descrito por Bradford (1976), con una digestión previa de las muestras con NaOH. La concentración de proteína de las muestra se calculó por interpolación de los valores de absorbancia en la recta de calibrado obtenida con disoluciones estándar de BSA.

3.5.10 Determinación de sustancias reactivas de oxígeno (ROS)

Los niveles de ROS intracelulares se cuantificaron mediante el método de la diclorofluoresceína (Wang y Joseph, 1999), usando un lector de microplacas. Los ensayos fueron realizados a diferentes edades (L4, 5^o día de adulto o 6^o día de adulto) según el experimento. Una vez que los gusanos (tratados con flavonoides o control) alcanzaban la edad necesaria para realizar el ensayo, eran transferidos individualmente a placas de 96 pocillos (un gusano por pocillo). En cada pocillo se añadía previamente 75 μ L of PBS. Para los ensayos de estrés oxidativo los gusanos eran tratados con juglona en placas Petri, como se describe en el apartado 3.5.6, antes de ser transferidos a la placa multipocillo. En los ensayos de estrés térmico los gusanos eran colocados en la placa de 96 pocillos y una vez en la misma sometidos a estrés térmico (2 h, 35 $^{\circ}$ C). Tras el tratamiento se añadía a cada pocillo 25 μ L de diclorofluoresceín-diacetato (DFCH-DA) disuelto en metanol, alcanzando una concentración de DFCH-DA en cada pocillo de 62,5 μ M.

Cuando el colorante entra en las células del gusano, los grupos acetato del colorante son separados enzimáticamente. Posteriormente el compuesto es oxidado por los ROS presentes y produce el pigmento fluorescente DCF. La fluorescencia producida en cada pocillo se medía a 35 °C inmediatamente después de la incorporación del compuesto y luego a intervalos de 10 min, con 1 s de tiempo de integración, usando 485 y 535 nm como longitudes de onda de excitación y de emisión respectivamente. Simultáneamente también se medía la fluorescencia en gusanos control no estresados. Se realizaron cinco experimentos independientes por cada tratamiento, y en cada experimento los niveles de ROS se determinaron al menos en 36 individuos.

3.5.11. Determinación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)

Para la determinación de los niveles de 8-OHdG se utilizó el kit EpiQuik™ de la casa comercial Epigentek. La técnica consiste en una cuantificación colorimétrica del ADN oxidado mediante la detección de 8-OHdG. El kit utiliza ADN extraído directamente de diferentes especies, como plantas, hongos y mamíferos, y mediante un ensayo con anticuerpos permite cuantificar los niveles de 8-OHdG y extrapolarlos a una recta de calibrado. Los detalles experimentales se recogen en el capítulo 4. 2. de esta tesis doctoral.

RESULTADOS

4.1. Ensayos en líneas celulares

4.1.1. Introducción

Es comúnmente asumido que los flavonoides ejercen efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades crónicas, degenerativas y algunos tipos de cáncer (Hertog *et al.*, 1993; Scalbert *et al.*, 2005; Hooper *et al.*, 2008). Esos efectos se han atribuido a su actividad bioquímica y farmacológica, especialmente a su actividad antioxidante. Sin embargo, los mecanismos implicados en los efectos biológicos de los flavonoides son más complejos que los que pueden atribuirse a su simple actividad antioxidante. Estudios recientes han demostrado que los flavonoides pueden interactuar con proteínas específicas implicadas en rutas de señalización intracelulares y regular la expresión de genes (Kong *et al.*, 2000), modulando de este modo la expresión de defensas antioxidantes de la célula, como las enzimas antioxidantes o GSH (Halliwell, 2011). Algunos estudios con animales y modelos celulares sugieren que ciertos flavonoides podrían inhibir tanto la iniciación tumoral como su progresión (Tanaka *et al.*, 1997; Sah *et al.*, 2004) mediante apoptosis y parálisis del ciclo celular (Sah *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2000). Además los flavonoides podrían inhibir la inflamación y la invasión de las células cancerosas en los tejidos (Porath *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2007; Siddiqui *et al.*, 2008).

Catequinas y glicósidos de quercetina son los flavonoides más abundantes en alimentos y se han relacionado con el efecto beneficioso de dietas ricas en frutas y hortalizas. Sin embargo, los mecanismos de acción *in vivo* implicados en el beneficio producido por su consumo no están aún elucidados. Tras la ingesta de flavonoides, éstos son químicamente transformados y modificados, tanto por enzimas del tracto gastrointestinal como por la flora del colon, para posteriormente ser absorbidos y biotransformados a diferentes formas

conjugadas (derivados metilados, sulfatados o glucuronidados). Estos metabolitos conjugados son los que principalmente se detectan en plasma (Baba *et al.*, 2001; Donovan *et al.*, 2001; Fernández-Pérez *et al.*, 2012) y por lo tanto constituyen las formas potencialmente capaces de alcanzar las dianas biológicas. Los metabolitos conjugados poseen propiedades biológicas diferentes a las de los compuestos de origen, por lo que los estudios *in vitro* deben de considerar trabajar con metabolitos en vez de los compuestos nativos encontrados en los alimentos (Kroon *et al.*, 2004).

Diferentes estudios han demostrado una disminución en la capacidad antioxidante *in vitro* de los derivados metilados de catequinas y quercetina (Lemańska *et al.*, 2004; Dueñas *et al.*, 2010; Dueñas *et al.*, 2011). Por otra parte, en algunas células y tejidos o bajo algunas condiciones fisiopatológicas, como estrés oxidativo o inflamación, algunos metabolitos conjugados pueden sufrir desconjugación a sus aglicones, mediante la acción de enzimas β -glucuronidasas o sulfatasas, mientras que las formas metiladas se mantienen intactas (Manach *et al.*, 2005). De este modo, tanto aglicones como sus derivados metilados podrían llegar a interactuar con receptores en las células diana.

En este capítulo se evalúa el efecto antiproliferativo de tres aglicones de flavonoides (quercetina, catequina y epicatequina) y algunos de sus metabolitos conjugados, incluyendo derivados metilados (ver Figura 10) en diferentes líneas celulares tumorales, de adenocarcinoma de mama (MCF-7), colon (Caco-2) y páncreas (BxPC-3), y una línea de células sanas procedentes de fibroblastos humanos (HFF-1). Los metabolitos ensayados fueron obtenidos como se indica en el apartado 3.3.

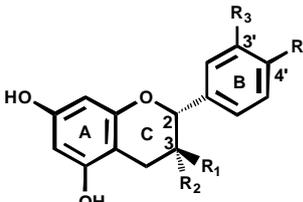
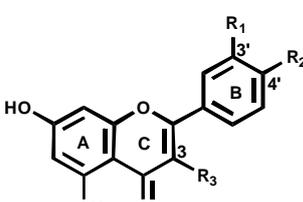
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
Flavan-3-oles 	Catequina	H	OH	OH	OH
	3'-O-metil-catequina	H	OH	OCH ₃	OH
	Epicatequina	OH	H	OH	OH
	3'-O-metil-epicatequina	OH	H	OCH ₃	H
	4'-O-metil-epicatequina	OH	H	OH	OCH ₃
	Epicatequina-3'-O-sulfato	OH	H	OSO ₃ H	OH
Flavonoles 	Quercetina	OH	OH	OH	-
	Quercetina-3'-O-sulfato	OSO ₃ H	OH	OH	-
	Quercetina-4'-O-sulfato	OH	OSO ₃ H	OH	-
	Quercetina-3-O-glucósido	OH	OH	OC ₆ H ₁₁ O ₅	-
	Quercetina-3-O-glucurónido	OH	OH	OC ₆ H ₉ O ₆	-
	3'-O-metil-quercetina (Isorhamnetina)	OH	OCH ₃	OH	-
	4'-O-metil-quercetina (Tamarixetina)	OCH ₃	OH	OH	-

Figura 10. Estructura de los flavonoides y metabolitos estudiados.

4.1.2 Resultados

Los ensayos en líneas celulares fueron realizados utilizando 5 niveles de concentraciones en el intervalo 6,3–100 μM para todos los compuestos ensayados y tiempos de incubación de 48 h. Estos niveles de concentración estarían muy por encima de las concentraciones fisiológicas que podrían esperarse en células de mama y de páncreas. Sin embargo, representan una importante herramienta de aproximación con el fin de evaluar el mecanismo de acción y establecer una relación entre estructura y actividad. Por otra parte, aunque la exposición a los compuestos durante 48 h puede considerarse extrema es el tiempo mínimo requerido para la duplicación de las células de origen. Esto permite que los compuestos intervengan en los mecanismos implicados en la división celular, que han sido propuestos como una de las principales rutas de actuación de los flavonoides.

En la Figura 11 se recogen los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad en fibroblastos humanos (HFF-1). En el caso de los flavonoles, quercetina, tamarixetina (4'-*O*-metilquercetina) y quercetina-3-*O*-glucósido mostraron efectos citotóxicos en esta línea celular HFF-1. Entre las catequinas sólo los metabolitos metilados de epicatequina (4'-*O*-metilepicatequina y 3'-*O*-metilepicatequina) presentaron efecto citotóxico en células humanas sanas. Sin embargo, el efecto citotóxico sólo fue observado en la concentración más alta ensayada (100 μM).

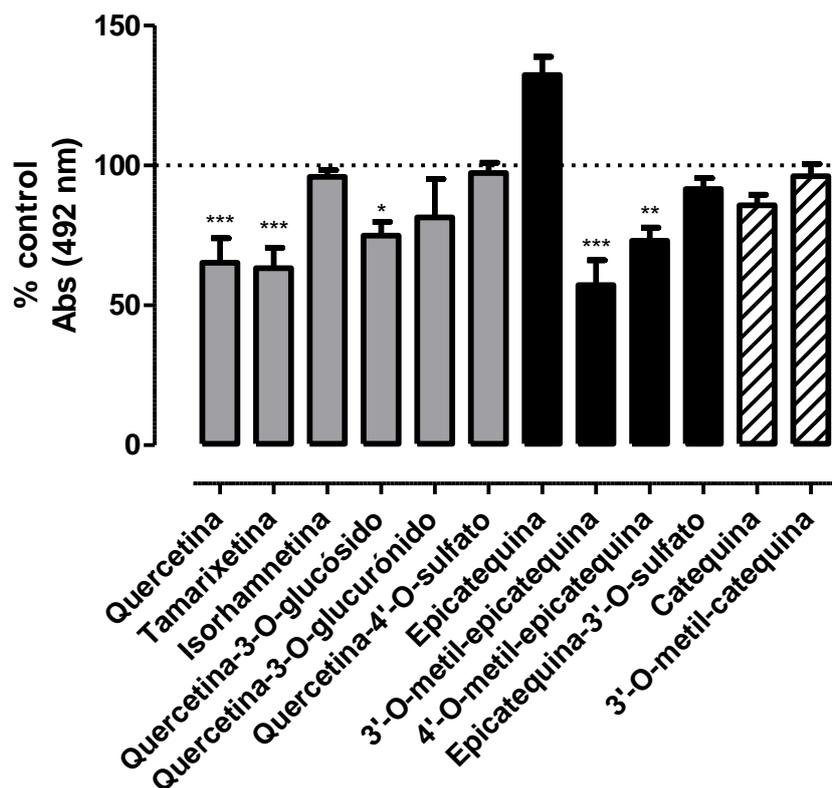


Figura 11. Porcentaje de crecimiento de células HFF-1 tratadas con diferentes flavonoides y sus metabolitos derivados respecto del control (línea de puntos, 100%). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y tratadas con cada uno de los compuestos (100 μ M) durante 48 h. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo SRB. Cada valor representa la media \pm SEM (n = 6–12). * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 (disminución significativa respecto del control).

En los ensayos con líneas tumorales las concentraciones más bajas a las que se encontraron efectos significativos fueron 50 μ M y 100 μ M, para flavonoles y flavan-3-oles respectivamente (ver figuras 12 y 13). El efecto de los derivados de quercetina en el crecimiento de las líneas MCF-7, Caco-2 y BxPC-3 se representa en la Figura 12. Quercetina y tamarixetina fueron los únicos compuestos que mostraron efecto anti-proliferativo en las tres líneas celulares estudiadas. La mayor actividad se produjo en el tratamiento con quercetina, con un IC₅₀ de 19,90 μ M en BxPC-3, 34,47 μ M en MCF-7, y 85,21 μ M en Caco-2. No se observaron diferencias significativas entre el efecto de tamarixetina (IC₅₀: 81,95

μM) y quercetina en células Caco-2, mientras que en el resto de células quercetina resultó más activa que tamarixetina (IC_{50} : $50,45 \mu\text{M}$ en MCF-7, y $59,04 \mu\text{M}$ en BxPC-3).

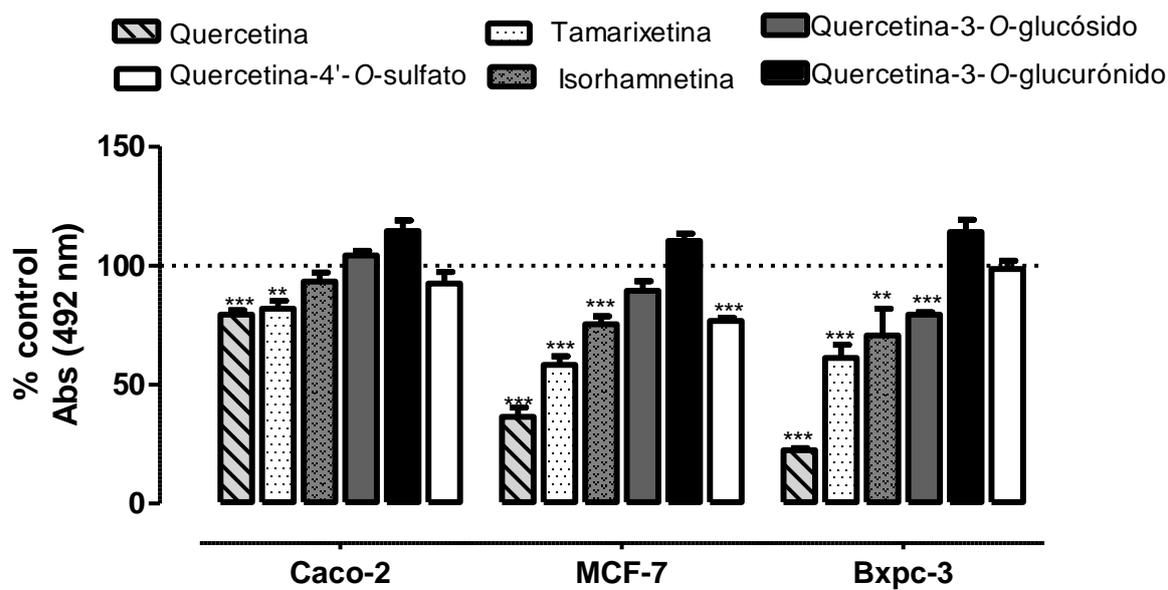


Figura 12. Porcentaje de crecimiento de las líneas celulares Caco-2, MCF-7 y BxPC-3 tratadas con quercetina y sus metabolitos derivados respecto a controles no tratados (línea de puntos, 100%). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y tratadas con cada compuesto ($50 \mu\text{M}$) durante 48 h. La proliferación celular se evaluó con el ensayo SRB. Cada valor representa la media \pm SEM ($n = 6-12$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (disminución significativa respecto del control).

Isorhamnetina (3'-O-metilquercetina), el otro derivado metilado derivado de quercetina que se utilizó en estos ensayos, sólo mostró efectos significativos en la inhibición de la proliferación en las células BxPC-3 (IC_{50} : $58,6 \mu\text{M}$) y MCF-7 (IC_{50} : $50,5 \mu\text{M}$), pero no en Caco-2. Por otra parte, quercetina-3-O-glucósido (Q3Glc) y quercetina-4'-O-sulfato sólo mostraron efectos significativos en BxPC-3 (IC_{50} : $75,89 \mu\text{M}$ y $94,61 \mu\text{M}$, respectivamente) y MCF-7 (IC_{50} : $90,24 \mu\text{M}$ y $95,03 \mu\text{M}$, respectivamente). El glucurónido ensayado (quercetina-3-O-

glucurónido) no mostró efectos sobre el crecimiento en ninguna de las células tratadas en estos estudios.

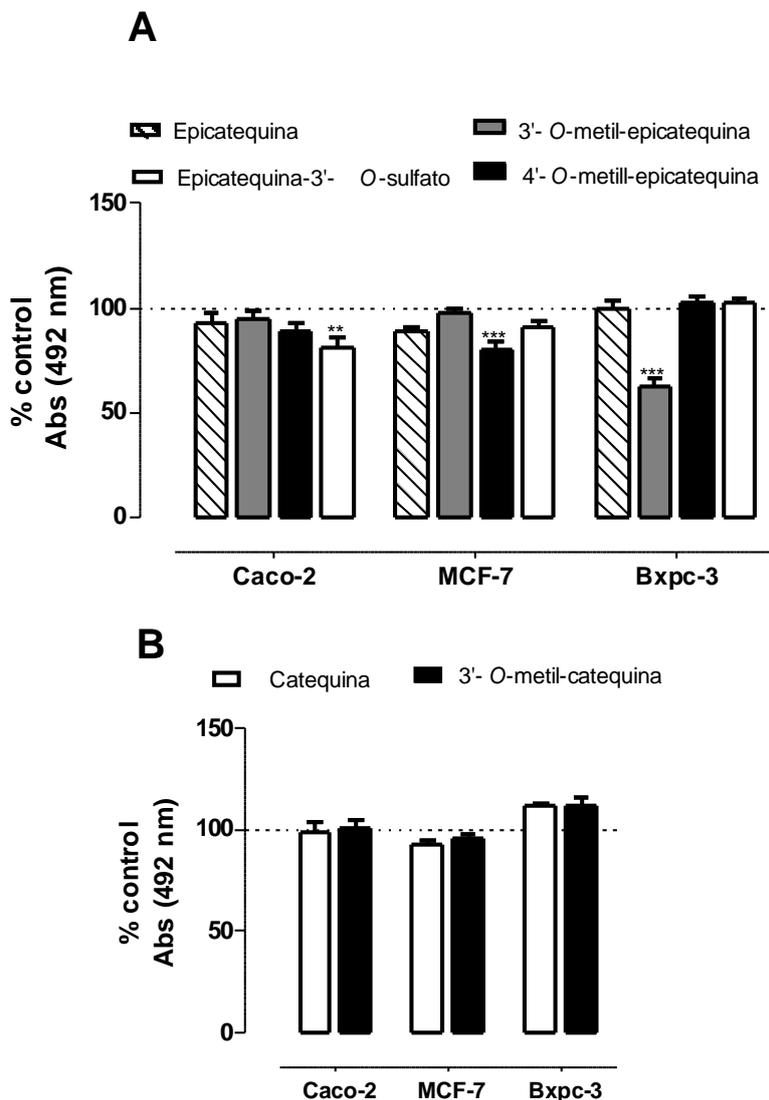


Figura 13. Porcentaje de crecimiento de las líneas celulares Caco-2, MCF-7 y BxPC-3 tratadas con epicatequina (A), catequina (B) y sus metabolitos derivados comparado con células no tratadas (línea de puntos, 100%). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y tratadas con cada compuesto (100 μ M). La proliferación celular se evaluó con el ensayo SRB. Cada valor representa la media \pm SEM (n = 6–12). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (disminución significativa respecto del control)

Los resultados obtenidos en las líneas tumorales en los ensayos con catequinas se recogen en la Figura 13. En general, el efecto en la reducción en proliferación de los compuestos derivados de catequinas fue menor que el que se observó

para quercetina y derivados. Ninguno de los compuestos ensayados fue capaz de reducir la población celular por debajo del 50%. Sólo los metabolitos sulfatados y metilados de epicatequina mostraron cierto efecto sobre el crecimiento en algunas de las líneas celulares utilizadas. Epicatequina-3'-O-sulfato solo mostró efecto significativo en células Caco-2, mientras que 4'-O-metil-epicatequina y 3'-O-metil-epicatequina inhibieron el crecimiento en células MCF-7 y BxPC-3 respectivamente. Sin embargo el efecto observado para esos compuestos metilados, fue el mismo que el observado en células no cancerosas (línea celular no proliferativa). No se observó ningún efecto antiproliferativo sobre las líneas tumorales ensayadas en los casos de catequina, epicatequina, y 3'-O-metil-catequina.

4.1.3 Discusión

Tanto quercetina como catequinas son flavonoides ampliamente distribuidos en los alimentos y se encuentran entre los que demuestran mayor actividad antioxidante en estudios realizados *in vitro* (Frank *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2010). En el organismo humano estos compuestos son ampliamente metabolizados para ser transformados en derivados metilados, sulfatados y glucuronidados. Estos metabolitos se encuentran circulantes en la sangre y serían, por tanto, capaces de alcanzar los lugares de acción. Sin embargo, la formación de este tipo de metabolitos conjugados trae consigo una reducción en el número de grupos hidroxilo presentes en los flavonoides originales y por lo tanto puede afectar a su actividad biológica. De hecho, la capacidad antiproliferativa de los flavonoides se ha relacionado con el número de grupos hidroxilos libres en el anillo B de su estructura (Saeki *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2010), además de verse reducida su capacidad antioxidante tras el proceso de conjugación (Lemańska *et al.*, 2004; Dueñas *et al.*, 2010).

En este capítulo se evalúa el efecto de quercetina, catequina y epicatequina, junto con algunos de sus metabolitos derivados sobre tres líneas celulares cancerosas. Aunque todos los compuestos fueron ensayados en el mismo intervalo de concentraciones, hay que tener en cuenta que *in vivo* las células de páncreas, colon y mama pueden estar sometidas a diferentes concentraciones de las aquí ensayadas, en función del tejido y de las características de biodisponibilidad y estructura de los compuestos. Para alcanzar el páncreas u otros órganos los flavonoides deben ser absorbidos en el tracto gastrointestinal, punto en el que se alcanzan altas concentraciones de flavonoides; sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que los metabolitos de flavonoides alcancen y/o se bioacumulen en tejidos particulares. Los resultados mostraron que quercetina posee actividad antiproliferativa en las tres líneas ensayadas, mientras que catequina y epicatequina no poseían actividad. La metilación de uno de los hidroxilos del anillo B en quercetina produjo una pequeña reducción la capacidad antiproliferativa, aunque los compuestos metilados todavía presentaban significativa capacidad antiproliferativa en todas las líneas celulares, a excepción del derivado metilado isorhamnetina en células Caco-2. Una observación interesante fue que la disminución en la actividad antiproliferativa de quercetina era mayor cuando la metilación se producía en el hidroxilo en posición 3' (isorhamnetina) que en 4' (tamarixetina). El efecto de la metilación de los hidroxilos del anillo B fue diferente en el caso de epicatequina, cuyos derivados metilados mostraron ser activos en las células MCF-7 (4'-O-metil-epicatequina) y BxPC-3 (3'-O-metil-epicatequina).

La conjugación de quercetina con glucosa o con ácido glucurónico eliminaba, en general, el efecto antiproliferativo del aglicón, excepto en el caso del glucósido de quercetina (Q3Glc) que mostró cierta actividad sobre las células BxPC-3. Una posibilidad para explicar este efecto es que este tipo de células poseyera actividad glucosidasa, lo que llevaría a liberar el aglicón (quercetina), que sí muestra un destacado efecto antiproliferativo sobre esta línea celular (Figura

12). Se debe resaltar que la carencia de actividad antiproliferativa de los derivados glicosilados se observó aún cuando el grupo *orto*-dihidroxilo del anillo B de quercetina no estaba sustituido, como ocurre en el caso de Q3Glc y quercetina-3-*O*-glucurónido (Q3GlcA).

Los metabolitos sulfatados por su parte fueron inactivos en la mayoría de las células ensayadas, aunque quercetina-4'-*O*-sulfato y epicatequina-3'-*O*-sulfato mostraron cierto efecto antiproliferativo en células MCF-7 y Caco-2 respectivamente. De manera general, las células MCF-7 y BxPC-3 resultaron ser más sensibles a los compuestos ensayados que las Caco-2, especialmente a quercetina y derivados. Algunos flavonoides y sus metabolitos conjugados son buenos sustratos para los transportadores de membrana MRP2 (*multidrug resistance protein 2*) (O'Leary *et al.*, 2003; Williamson *et al.*, 2007) y BCRP (*breast cancer resistance protein*) (Sesink *et al.*, 2005). Esas proteínas pueden transportar xenobióticos conjugados cargados negativamente, como ocurre con los conjugados de flavonoides (Jonker *et al.* 2000; Nakatomi *et al.*, 2001; Chen y Chen, 2003). Se ha indicado que ambos transportadores de membrana pueden modular la biodisponibilidad de estos compuestos al limitar su captación intestinal (Dietrich *et al.*, 2003). Walle *et al.* (1999) demostraron que en células Caco-2 el transportador MRP2 se expresa apicalmente, y se ha demostrado también que MRP2 está implicado en el flujo apical de glucurónidos y sulfatos de quercetina y en la eliminación de estos últimos de sangre a bilis, reduciendo de esta forma la biodisponibilidad de quercetina (O'Leary *et al.*, 2003). Por lo tanto parece probable que esos transportadores puedan contribuir al eflujo de metabolitos de flavonoides a través de la zona apical de la membrana en células Caco-2, dando lugar a una menor acumulación dentro de esas células, lo que podría explicar la baja actividad sobre las mismas observada en este estudio. Por otra parte, Wong *et al.* (2012) también demostraron la capacidad de quercetina-3'-*O*-sulfato para interactuar con transportadores de aniones orgánicos (OATs) y/o polipéptidos transportadores de aniones orgánicos

(OATPs) en células HepG2, los cuales podrían actuar como transportadores de eflujo, dando lugar a la excreción de metabolitos generados previamente en el intestino, contribuyendo de esta forma a reducir la biodisponibilidad de quercetina.

El proceso de metilación de quercetina a isorhamnetina (3'-O-metil-quercetina) o a tamarixetina (4'-O-metil-quercetina) juega un papel importante en el metabolismo de quercetina (Manach *et al.*, 2005). Aunque la metilación redujo la actividad antiproliferativa de quercetina en las tres líneas celulares estudiadas, isorhamnetina y tamarixetina continuaron mostrando efectos sobre la proliferación celular, por lo que se puede especular que, de manera similar a quercetina, serían capaces de ingresar en la célula e inducir la muerte celular. Sin embargo, lo contrario parece ocurrir en el caso de otros metabolitos de quercetina ensayados, que mostraron actividad anti-carcinogénica reducida y limitada a algunas líneas celulares (quercetina-4'-O-sulfato en MCF-7 y Q3Glc en BxPC-3). En los ensayos realizados no se observaron efectos anti-proliferativos cuando las células eran tratadas con Q3GlcA, lo que sugiere que este compuesto no se acumulaba ni podía ser desconjugado en las mismas. La interacción de glucurónidos de quercetina con algunos transportadores como ABCC2 ha sido previamente descrita por algunos autores (Petri *et al.*, 2003; Williamson *et al.*, 2007), que hipotetizan que la misma limita la acumulación de estos compuestos en las células al forzar su salida hacia el lumen intestinal o bilis.

Los mecanismos implicados en la actividad antiproliferativa de quercetina y sus derivados son aún desconocidos. Algunos autores han sugerido que el efecto inhibitorio de quercetina sobre el crecimiento celular podría estar mediado por un aumento en los procesos de apoptosis. Los mecanismos más comúnmente discutidos incluyen la activación de AMPK (proteín quinasa activada por AMP) y la inactivación de la proteína quinasa B (Akt) y del factor nuclear kB (NF-kB) (Granado-Serrano *et al.*, 2006; Ramos, 2007; Vidya-Priyadarsini *et al.*, 2010).

Aunque los derivados de quercetina no pudieran penetrar en el citosol a través de la membrana celular, podrían modular el estado redox de las membranas celulares a través de su interacción con las bicapas lipídicas (Adachi *et al.*, 2007), con lo que la actividad antiproliferativa no tendría necesariamente que implicar la absorción de los compuestos. Por otra parte, la conjugación de las moléculas podría prevenir la oxidación enzimática y, de este modo, facilitar la existencia de un 'pool' de compuestos, extendiendo su vida media en el sistema y manteniendo sus propiedades biológicas (Pasqualini y Chetrite, 2005). La capacidad de algunas células para desconjugar metabolitos liberando los aglicones podría luego contribuir a explicar la actividad biológica en determinados tejidos y/o bajo condiciones fisiopatológicas, como se ha demostrado recientemente para los efectos vasculares de conjugados de quercetina (Menéndez *et al.*, 2011; Galindo *et al.*, 2012).

Con respecto a los flavan-3-oles, Vaidyanathan y Walle (2001) no observaron transporte basolateral de epicatequina en monocapas de células Caco-2 en un intervalo de concentraciones entre 5 y 50 μM , mientras que Salucci *et al.* (2002) encontraron que este compuesto era solamente absorbido en células Caco-2 tras 72 horas de incubación mostrando una baja actividad anticarcinogénica. En general, en el presente estudio las catequinas no mostraron efectos sobre las líneas celulares tratadas, sugiriendo que su absorción por estas células es limitada, aunque algunos de los metabolitos de epicatequina fueron capaces de inhibir el crecimiento celular a concentraciones de 100 μM . Estos compuestos podría interactuar con transportadores como MRP1 y MRP2, transportadores monocarboxilato (MCT) y transportadores SGLT1 (Walle, 2004), lo que podría contribuir a su actividad biológica.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que tanto quercetina como sus metabolitos derivados son más activos frente a las líneas de células tumorales ensayadas que catequinas y sus metabolitos derivados. Por otra parte, la

metilación en el anillo B de quercetina produce una disminución en sus efectos antiproliferativos, aunque los metabolitos metilados todavía poseen una actividad antiproliferativa significativa en las células tratadas. Sin embargo, los metabolitos sulfatados y glicosilados muestran, en general, baja o nula actividad antiproliferativa, sugiriendo que esos compuestos tienen dificultades para entrar y acumularse dentro de las células.

4.2. Estudios en *C. elegans*

4.2.1. Análisis de biomarcadores de estrés (ROS y ADN)

4.2.1.1. Introducción

Como se ha indicado en la introducción, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son metabolitos de oxígeno altamente reactivos, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}). Su vida media en los sistemas biológicos comprende rangos desde nanosegundos a segundos dependiendo de su reactividad y de los antioxidantes presentes en la célula. Debido a su alta reactividad y a la respuesta frente a estos compuestos que existe en los sistemas biológicos, estos metabolitos se encuentran en concentraciones muy bajas (entre picomolar y nanomolar). Se generan normalmente en la mitocondria, y más concretamente en la cadena de transporte de electrones, además de ser subproducto de algunos procesos metabólicos en el organismo, y son también producidos debido a factores externos como la radiación ultravioleta. Si bien una elevada concentración de ROS se considera nociva para el organismo, una concentración basal de ROS es necesaria para el mantenimiento de las funciones vitales de la célula como la proliferación, apoptosis, inflamación y la respuesta inmune (Seifried *et al.*, 2007). De hecho, las ROS juegan un importante rol en el desarrollo de los procesos biológicos, ya que permiten a la célula activar los mecanismos de defensa antioxidante, los procesos de reparación de ADN y diferentes cascadas de señalización (Halliwell, 2006).

Cuando se produce un desequilibrio entre los niveles de ROS producidos y los que son capaces de eliminar las defensas antioxidantes en la célula se origina una acumulación de estrés oxidativo que puede producir daño a diferentes

macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Finkel y Holbrook, 2000). Por tanto, el daño oxidativo no es necesariamente producido porque exista una mayor producción de ROS, sino también debido a una disminución en la actividad de los sistemas de defensa antioxidante. Este daño oxidativo ha sido ampliamente relacionado con problemas cardiovasculares, cáncer, diabetes e incluso enfermedad de Alzheimer (Halliwell, 2006).

No todas las especies reactivas de oxígeno son capaces de dañar macromoléculas. Por ejemplo, H₂O₂ y el radical superóxido (O₂^{•-}) necesitan reaccionar con metales de transición, especialmente con Fe y Cu, para producir, a través de la reacción de Haber–Weiss (Figura 14), el radical hidroxilo (OH[•]), altamente reactivo y capaz de producir daños en los sistemas biológicos.

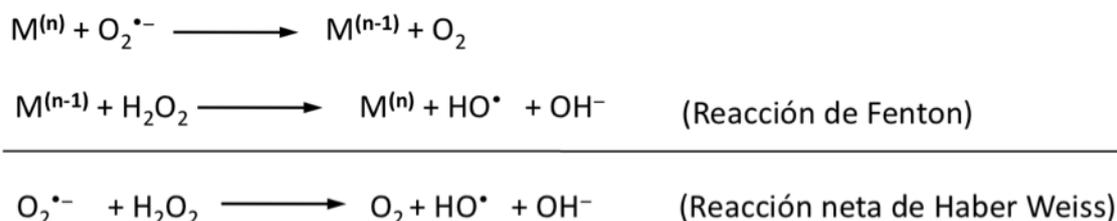


Figura 14. Reacción de Habber-Weiss

De entre todos los posibles daños producidos por ROS en macromoléculas, se ha prestado mayor atención a aquellos que implican al ADN. Esto es debido a que la célula puede reponer los lípidos y proteínas dañadas, ya que dispone de procesos para su síntesis, mientras que el ADN debe ser reparado.

El daño producido en el ADN puede presentarse de diversas formas: ruptura de cadenas en la cromatina, aberraciones cromosómicas en metafase e intercambios en las cromátidas, y formación de aductos en su estructura (Morimoto y Wolff, 1980; Erexson *et al.*, 1985). La aparición de aductos derivados del daño oxidativo en el ADN origina la formación de diferentes moléculas, no todas ellas conocidas. Entre las moléculas que han sido descritas

hasta ahora se incluyen: 8-hidroxiadenina (8-OHAde), 8-hidroxi guanina (8-OHGua) y su desoxinucleósido equivalente (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, 8-OHdG), 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timina glicol, Tg), y otras derivadas de lesiones que producen apertura de anillos como 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyAde) y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua) (Dizdaroglu, 1993).

El producto más comúnmente estudiado es la 8-hidroxi guanina (8-OHGua) que se genera mediante la oxidación del C-8 de la guanina y presenta un alto potencial mutagénico. Se ha demostrado que en los procesos de replicación de ADN que contienen este aducto, las hebras hijas presentan incorporaciones de timinas, en vez de guaninas (Mayne, 2003). Este hecho condiciona la importancia del análisis de 8-OHGua o de su desoxinucleósido (8-OHdG). En los estudios de estrés oxidativo el biomarcador 8-OHdG es el más utilizado ya que presenta una elevada tasa relativa de mutación, entre 2,5–4,8% en mamíferos (Cheng *et al.*, 1992). Diversos estudios sobre el estrés oxidativo han tratado de cuantificar los niveles de 8-OHdG. La determinación de este biomarcador se ha llevado a cabo en orina (Pedret *et al.*, 2012), plasma (Álvarez-Suárez *et al.*, 2014) y otros tejidos (Li *et al.*, 2010). Algunos autores han también evaluado también el efecto de distintos flavonoides en la producción de ROS y en el daño producido en el ADN en diferentes líneas celulares (Sgambato *et al.*, 2001; Granado-Serrano *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2011).

Existen diversos métodos para cuantificar estos biomarcadores. Los más utilizados son las técnicas de detección directa, como HPLC con detección electroquímica (HPLC-ECD), la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), y en menor medida HPLC-MS (Harri *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2012). También se han desarrollado ensayos de aproximación indirecta (de tipo ELISA, entre otros) con el objetivo de determinar aductos en diferentes medios (Santella, 1999). Los métodos directos en primer lugar

requieren la extracción de ADN desde las células y una posterior hidrólisis, ya sea mediante métodos químicos o enzimáticos, de la molécula de ADN. De esta manera se pueden obtener nucleótidos, nucleósidos o bases nitrogenadas (Ravanat, 2005). La principal limitación de estas técnicas es la posible formación de aductos debido a la oxidación de ADN durante la extracción. Los métodos indirectos, como los métodos ELISA, presentan la limitación de la especificidad de los anticuerpos usados, ya que en muchos casos no es lo suficientemente alta para determinar el nivel de lesión debido a la similitud entre la base nitrogenada oxidada y la base sin modificar.

En este capítulo se pretende estudiar el efecto de metabolitos de flavonoides, en particular epicatequina, quercetina y sus metabolitos metilados 4'-O-metilquercetina (Tamarixetina) y 3'-O-metilepicatequina, en la producción de ROS y daño oxidativo en ADN en el nematodo *C. elegans*, ya que en la bibliografía que ha sido revisada no existen ensayos que incidan en dichos efectos. Sin embargo, en otros modelos sí se ha evaluado el efecto de algunos flavonoides sobre los niveles de 8-OHdG, como en el caso de ratas (Magielse *et al.*, 2014), donde como resultado del tratamiento se observaba una disminución en los niveles de 8-OHdG. En el mismo sentido, el tratamiento de células HepG2 pretratadas con quercetina y luteolina reducía la formación de 8-OHdG en un 25% y 15%, respectivamente (Kanazawa *et al.*, 2006).

4.2.1.2. Materiales y métodos específicos

Algunos de los métodos utilizados en este capítulo, como los referidos a la determinación de ROS y el cultivo de *C. elegans* se encuentran desarrollados en el capítulo 3 de métodos generales.

1. Extracción de ADN de *C. elegans*.

Los gusanos control así como los tratados con los diferentes compuestos objeto de estudio eran propagados en placas de NGM a 20 °C, como se describe en el apartado de métodos. Las placas (al menos 5 por tratamiento) eran incubadas hasta alcanzar una biomasa de gusanos suficiente para realizar el ensayo, momento en el cual una parte de las placas eran sometidas a estrés térmico (5h, 35 °C) mientras que el resto se mantenían a la temperatura de cultivo habitual. De esta forma, se tenía gusanos sometidos y no sometidos a estrés, tanto en el grupo control como en los diferentes tratamientos objeto de estudio. Tras el estrés térmico los gusanos se recogían con agua MiliQ en un tubo de 15 mL, se centrifugaba a 3000 rpm durante un minuto para eliminar el sobrenadante, se resuspendían en 0,5 mL de TEN (Tris 20 Mm, EDTA 50 Mm, NaCl 100 Mm, pH 7,5) y se congelaban a -20 °C para su posterior uso.

*a) Extracción de ADN total de *C. elegans* mediante el método de fenol/cloroformo.*

En el momento de proceder a la extracción del ADN, el pellet de gusanos se transfería a un tubo eppendorf de 1,5 mL al que se añadían 25 µL de *buffer* SDS al 10% y 25 µL de proteinasa K (0,1 mg/mL) y las muestras se incubaban a 55 °C durante 1 hora. Durante la incubación las muestras eran agitadas en vortex cada 10 min para facilitar la lisis de los gusanos. Transcurrido ese tiempo se añadían

otros 25 μ L de proteinasa K y se volvía a incubar durante otra hora. A continuación, las muestras eran sometidas a sucesivas etapas de extracción/purificación. Inicialmente, se extraían con fenol, realizándose una mezcla por inversión. Minutos después se centrifugaba durante 5 min a 12.000 rpm y se recuperaba el sobrenadante, que es donde se encuentra el ADN. El siguiente paso consistía en un lavado del sobrenadante con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y posteriormente con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Una vez recuperado el sobrenadante libre de restos, se añadían 45 μ L de acetato de sodio 3M y 0,8 mL de etanol para precipitar el ADN, dejándolo durante toda la noche a -20 °C para al día siguiente centrifugar durante 5 min a 12.000 rpm y lavar con etanol al 70%. Una vez precipitado el ADN se eliminaba el sobrenadante, se dejaba secar completamente y posteriormente se resuspendía en 50 μ L de agua MiliQ. La pureza del ADN aislado de cada muestra era medida en un Nanophotometer (Implen Múnich, Alemania). Para ello se comprobaba que la relación entre las absorbancias de una muestra a 260/280 nm estaba en torno a 1,8.

b) Extracción de ADN total de C. elegans mediante un Kit comercial

La aplicación del método señalado en el epígrafe anterior no siempre llevaba a obtener ADN en cantidad y pureza suficientes para la determinación de 8-OHdG, por lo que también se utilizó un proceso de extracción para el aislamiento de ADN total de *C. elegans* utilizando el kit Dneasy Blood and Tissue de Quiagen, siguiendo las instrucciones indicadas en su protocolo. Al igual que en el caso anterior, se comprobaba la pureza del ADN aislado confirmando que la relación entre las absorbancias a 260/280 nm se encontraba en torno a 1,8.

2. Digestión del ADN de *C. elegans*.

Una vez aislado el ADN, las muestras se incubaban una hora a 50 °C con el fin de desnaturalizar el material genético para posteriormente ser digerido por diferentes enzimas. Inicialmente se añadían 20 µL de nucleasa P1 (5 U/muestra) y se incubaba a 50 °C durante 30 min. La nucleasa P1 se disolvía previamente en acetato sódico 20 mM, pH 4,8, que contenía cloruro de zinc 10 mM y 15% de glicerol. A continuación, se añadían 10 µL de DNAsa I (4 U/muestra) junto con 20 µL de fosfatasa alcalina (4 U/muestra), y se repetía la incubación a diferentes tiempos (1, 2 ó 24 horas) a 37 °C. Seguidamente las muestras se incubaban con RNAsa (4U por muestra) durante 1 hora a 37 °C y, por último, se centrifugaban a 13.000 rpm durante 20 min en tubos eppendorf, se filtraban a través de papel Whatman y el filtrado resultante se inyectaba en HPLC.

3. Análisis de ADN por HPLC-DAD-ESI/MS

Tras la digestión de las muestras de ADN con las diferentes enzimas se llevaba a cabo la separación cromatográfica y su posterior análisis por espectrometría de masas. La separación de los diferentes fragmentos de ADN se realizó en un equipo de HPLC Agilent Technologies 1200 series, equipado con una bomba cuaternaria, inyector automático, sistema de termostatación de columnas y detector de diodos en circuito integrado, conectado a un espectrómetro de masas y acoplado a una estación de control y tratamiento de datos HP Chemstation. La separación se realizaba en una columna Poroshell 120 EC-C18 2,7 µm (4,6x150 mm). Las fases móviles eran (A) acetato de amonio (20 mmol/L, pH 6,5) y (B) metanol, con un flujo de 0,2 mL/min, estableciendo el siguiente gradiente: 10% a 20% de B en 15 min, 20% a 30% B en 5 min, de 30% a 40% B en 5 min, 40% a 70% B en 5 min, y un período isocrático final de 5 min a 70% B. Los

cromatogramas se registraban a las longitudes de onda seleccionadas de 250 nm, 280 nm y 300 nm.

Para el análisis de espectrometría de masas se empleaba un espectrómetro de masas API 3200 Qtrap (Applied Biosystems), equipado con una sonda de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas triple cuadrupolo que puede actuar además como trampa iónica, acoplado al software de tratamiento de datos Analyst 5.1. La detección se realizaba en modo de ionización positivo, registrando iones o fragmentos con una relación masa/carga (m/z) desde 50 hasta 350. Se empleaba aire Zero como gas nebulizador (12 psi) y gas turbo (300 °C, 30 psi) para la eliminación del eluyente, y nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión.

El método empleado para la detección fue *MRM* (*Multiple reaction monitoring*) en modo positivo de ionización, con los siguientes parámetros: voltaje del capilar, 5500V; *declustering potential* (DP) 76V; potencial de entrada (EP) 12V; y energía de colisión (CE) 10V. Las transiciones utilizadas para la determinación de 8-OHdG fueron de m/z 284 (ión pseudomolecular $[M+H]^+$) al producto de m/z 168. Otro de los iones producto ensayado para la cuantificación de 8-OHdG fue m/z 140 (Yue et al, 2007). Para la cuantificación de dG se utilizó el ión pseudomolecular $[M+H]^+$, m/z 268, que origina un ión producto en *MRM* m/z 152. Además, las transiciones 268/135 y 284/152 también fueron analizadas para la posible cuantificación. Se realizaba también un análisis de tipo *Enhanced Product Ion* (EPI) para obtener la fragmentación de los iones mayoritarios obtenidos en modo EMS (*Enhanced Mass Spectrum*). Las condiciones empleadas eran: DP 20V, EP 10V, CE 10V, y *collision energy spread* (CES) 0V.

4. Determinación de 8-OHdG y bases nitrogenadas totales mediante métodos ELISA

Paralelamente, para la determinación de los niveles de 8-OHdG se utilizó el kit EpiQuik™ de la casa comercial Epigentek. La técnica consiste en una cuantificación colorimétrica del ADN oxidado mediante la detección de 8-OHdG. El kit es válido para evaluar ADN extraído directamente de diferentes especies, como plantas, hongos o mamíferos, sin necesidad de digestión por enzimas de restricción. El método se basa en un ensayo con anticuerpos que permite cuantificar los niveles de 8-OHdG y extrapolarlos a una recta de calibrado elaborada con patrones de 8-OHdG. El ADN se añade a una placa multipocillo previamente tratada para fijarlo. A continuación se lleva a cabo el lavado de los pocillos y se añade el anticuerpo de captura. Seguidamente, se procede a un nuevo lavado de la placa para posteriormente añadir el anticuerpo que se utilizará para detectar el ADN. En este mismo paso se añade una solución amplificadora o “enhancer”. Posteriormente se añade la solución encargada de reaccionar y que proporciona el color que a continuación se mide en un espectrofotómetro a 450 nm.

4.2.1.3. Resultados

4.2.1.3.1. Influencia de flavonoides sobre niveles de ROS en *C. elegans*

Para este trabajo el método utilizado para la detección de ROS fue el descrito por Wang y Joseph (1999), en el que se emplea 2,7-diclorofluorescein-diacetato (DFCH-DA). Este compuesto es un éster permeable a la membrana plasmática y que, una vez en el interior celular, es convertido a una forma fluorescente por eliminación de los grupos acetato por acción de esterasas intracelulares y oxidación (por actividad de las ROS). Este reactivo ha sido ampliamente utilizado por la comunidad científica para cuantificar niveles de ROS, aunque en los últimos años han surgido opiniones controvertidas respecto a su uso. En primer lugar, se ha visto que no es capaz de reaccionar directamente con H_2O_2 , lo que dificultaría la cuantificación directa de este compuesto. En segundo lugar, existe la posibilidad de que cualquier radical pueda oxidar DCFH a DCF y, por lo tanto, no sólo se cuantificarían niveles de ROS propiamente dichos. Por otra parte, se ha descrito que la propia DCF es capaz de producir aniones $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 al reaccionar con oxígeno produciendo una sobrevaloración en la cuantificación de ROS que puede llevar a resultados erróneos. Por último, la presencia de metales, peroxidasas y citocromos C pueden oxidar el reactivo y producir fluorescencia que también sería medida (Dikalov y Harrison, 2014). Sin embargo, la interferencia de este último tipo de moléculas se limita bastante al trabajar con animales vivos en lugar de lisados (Labuschagne, 2013). A pesar de todas estas controversias, en el presente trabajo se ha utilizado este método ya que es ampliamente usado, lo que puede permitir la comparación con estudios realizados por otros autores. En los resultados que aquí se presentan

no se muestran valores absolutos de fluorescencia, sino que los datos son siempre presentados como porcentajes respecto al control bajo las mismas condiciones. Este tipo de correlación permite normalizar los datos, evitando los posibles sesgos producidos por el método utilizado.

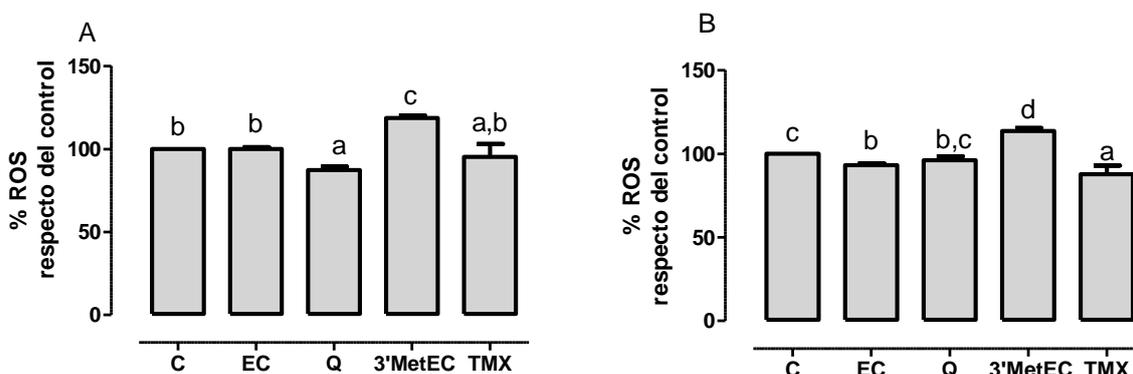


Figura 15. Niveles de ROS representados como porcentaje respecto del control, en *C. elegans* tratados con flavonoides, no sometidos (A) y sometidos a estrés térmico (B). Cada valor representa la media de tres ensayos por triplicado. Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Figura 15 se representan los niveles de ROS en *C. elegans* pretratados con quercetina (Q), epicatequina (EC) o sus derivados metilados tamarixetina (4'-O-metilquercetina, TMX) y 3'-O-metilepicatequina (3'MetEC), respectivamente, comparados con gusanos control (C) no tratados en condiciones normales de cultivo (A) y sometidos a estrés térmico (B). En general, se puede observar una tendencia a la disminución en los niveles de ROS en los gusanos tratados con la mayoría de los flavonoides respecto de los controles, con la excepción de los cultivados en presencia de 3'-O-metilepicatequina que mostraron un aumento significativo en la cantidad de ROS intracelulares de manera independiente a si habían sido o no sometidos a estrés.

En el caso de gusanos no sometidos a estrés (Figura 15A) la disminución en los niveles de ROS sólo era significativa en el tratamiento con quercetina, mientras que el descenso respecto del control no fue significativo en el caso de

epicatequina y tamarixetina. Diferentes resultados se observaron en los gusanos sometidos a estrés térmico (Figura 15B), donde el tratamiento con EC y TMX sí conducía a una reducción significativa en el nivel de ROS con respecto al control.

4.2.1.3.2. Flavonoides y daño oxidativo de ADN en *C. elegans*

a) Ensayos analíticos preliminares

Antes de proceder a la evaluación del daño oxidativo en ADN se realizaron una serie de ensayos con el objeto de intentar establecer un método analítico adecuado para su determinación mediante la cuantificación de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), en relación con su base no modificada 2'-desoxiguanosina (2'dG), utilizando como técnica la cromatografía líquida de alta resolución con doble detección por espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS). Para ello se partió del protocolo descrito por Yue *et al.* (2007) para el análisis de 8-OHdG en secciones de hígado, modificando algunas de las condiciones experimentales. Inicialmente se procedió al aislamiento directo del ADN de *C. elegans* y para el posterior análisis por HPLC-DAD-MS se utilizó una columna Poroshell 120 EC-C18 2,7 μm (4,6x150 mm) y una elución en gradiente en vez de isocrática. En la Figura 16 se representa un cromatograma del resultado obtenido tras la digestión del ADN de *C. elegans* extraído mediante el método del fenol/cloroformo y posterior análisis por el protocolo ensayado.

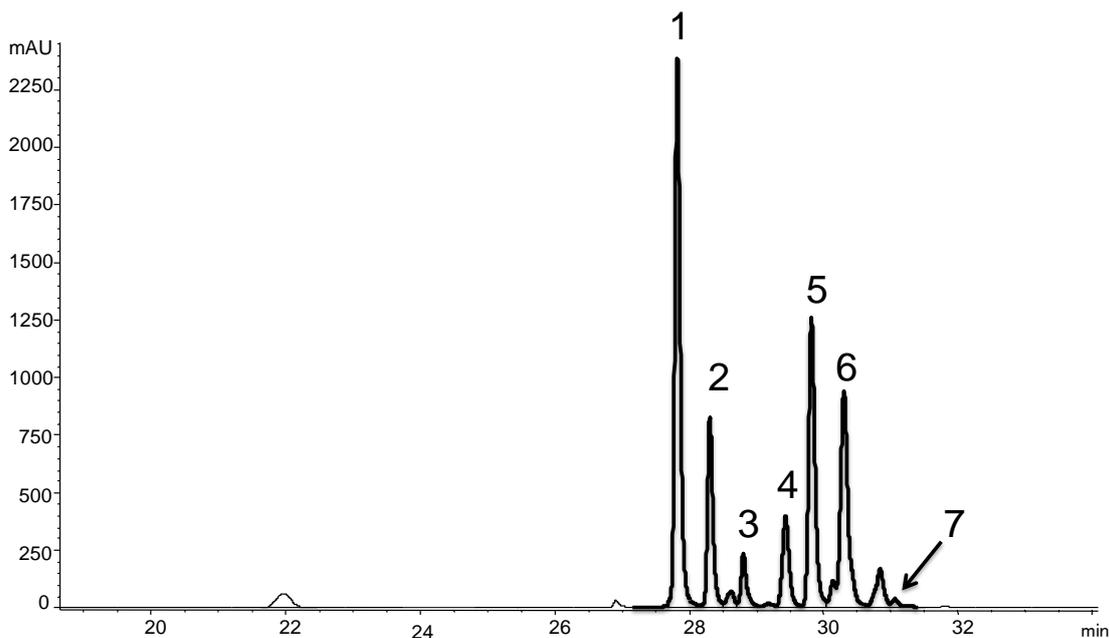


Figura 16. Cromatograma (zoom) de HPLC registrado a 250 nm correspondiente a la digestión de ADN obtenido de *C. elegans* cultivado en placas de NGM.

Como puede observarse, la separación de picos obtenida con las condiciones utilizadas era buena, observándose tras la digestión del ADN la presencia de 7 picos cromatográficos que podían ser atribuidos a los diferentes nucleósidos presentes en la molécula de ADN (tabla 1), identificados de manera preliminar de acuerdo a los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas (ión pseudomolecular y fragmentos MS^2). Sin embargo, la detección de la base oxidada 8-OHdG resultaba equívoca, por cuanto los resultados obtenidos por espectrometría de masas no eran siempre suficientemente claros para su identificación, ya que no en todas las ocasiones se observaba claramente su ión pseudomolecular o su señal se encontraba solapada por otras de masa diferente que aparecían al mismo tiempo de retención.

Tabla 1. Características cromatográficas y espectrales e identificación tentativa de nucleósidos de ADN procedente de *C. elegans*.

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Ión precursor [M+H] ⁺ (m/z)	Fragmentos (m/z)	Identificación preliminar
1	27.8	250	284	152	Guanosina
2	28.3	250	268	151	Desoxiguanosina
3	28.6	250	152	135	Guanina
4	29.4	250	243	126	Timina
5	29.8	250	268	135	Adenosina
6	30.3	250	332	251	Desoxiadenosina
7	31.2	???	284	168	8-OHdG

Inicialmente se pensó que los rendimientos en la cantidad de ADN obtenidos mediante la extracción tradicional no eran suficientes para conseguir una recuperación cuantitativa satisfactoria del nucleósido. Por esa razón, se procedió a ensayar la utilización de un kit comercial de extracción de ADN para intentar mejorar la calidad y el rendimiento del proceso. Con esta aproximación se comprobó que los rendimientos obtenidos en la extracción de ADN eran ligeramente mayores. Sin embargo, al llevar a cabo el análisis de ADN mediante HPLC-DAD-MS los resultados obtenidos fueron igualmente insatisfactorios con

relación a la detección de 8-OHdG, que no siempre resultaba posible y/o ofrecía dudas en cuanto a su identidad real, de modo similar a lo encontrado en la extracción con fenol/cloroformo. Se probó a inyectar un patrón de 8-OHdG para intentar confirmar su tiempo de retención, encontrando ligeras diferencias de elución entre el pico obtenido para el mismo y el del pico detectado en las muestras atribuido tentativamente a 8-OHdG, aunque quizás podría explicarse por un efecto matriz debido a la complejidad de las muestras. Se procedió, por otra parte, a realizar una serie de ensayos adicionales aumentando el número de gusanos de partida utilizados para la extracción y probando distintos tiempos de digestión enzimática, para ver si era posible mejorar el porcentaje de ADN extraído y digerido, obteniendo también resultados no totalmente satisfactorios. De este modo, se llegó a la conclusión de que el método de LC-MS no presentaba la sensibilidad necesaria para detectar los niveles de este nucleósido en las condiciones experimentales empleadas, dando lugar a una señal en el espectro de masas para este analito demasiado baja con relación al nivel de ruido, lo que no permitía confirmar con exactitud la identidad de la molécula de 8-OHdG. Los niveles de 8-OHdG descritos en la bibliografía en células animales oscilan entre 0,1 y 100 por cada 10^5 guaninas usando ADN celular (Halliwell, 2000), por lo que es posible que no se alcancen los niveles adecuados para una correcta detección de 8-OHdG en las condiciones de análisis utilizadas. Son, por tanto, necesarios mayores esfuerzos y posiblemente otro tipo de aproximaciones para identificar ADN oxidado en *C. elegans* mediante HPLC-MS.

Dado que no fue posible llegar a resultados totalmente satisfactorios se desistió de recurrir al análisis de 8-OHdG y daño oxidativo de ADN mediante la técnica de HPLC-MS y se continuó con los objetivos planteados en este capítulo empleando un kit comercial basado en la técnica ELISA, como se describe en el epígrafe siguiente. Se debe destacar, no obstante, las dificultades de esta

aproximación metodológica basada en HPLC-MS, con relación a la cual no se han encontrado en la bibliografía métodos para la determinación de 8-OHdG en *C. elegans*.

b) Evaluación de daño oxidativo de ADN

Daño oxidativo al ADN mediante el análisis de 8-OHdG

Dadas las dificultades encontradas para la cuantificación mediante HPLC-MS, finalmente la estimación del daño oxidativo en el ADN se llevó a cabo mediante la medida del biomarcador 8-OHdG utilizando el kit comercial EpiQuik™. En la Figura 17 se representa el porcentaje de 8-OHdG respecto del total de bases nitrogenadas en el ADN obtenido usando esa metodología en los diferentes ensayos llevados a cabo con *C. elegans*.

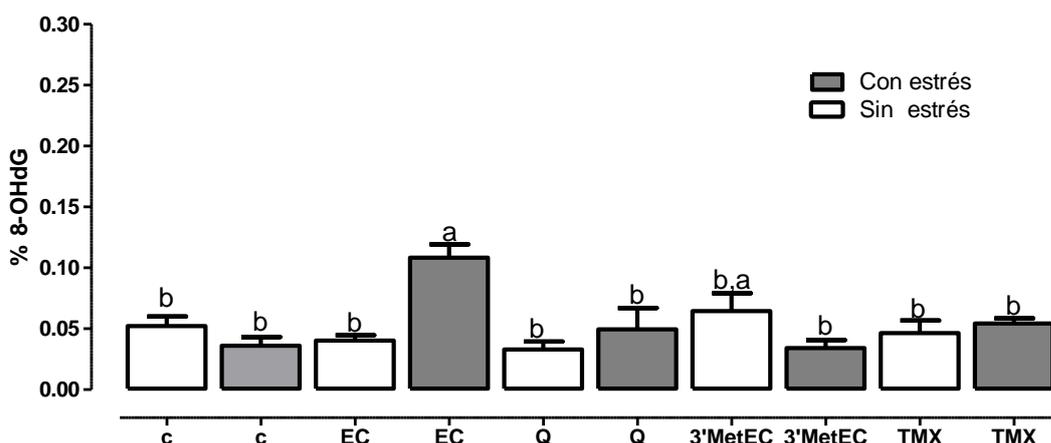


Figura 17. Porcentaje de 8-OHdG respecto del total de nucleósidos en *C. elegans* tratados con diferentes flavonoides y sometidos o no a estrés térmico. Cada valor representa la media de tres ensayos realizados por triplicado. Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$). Abreviaturas: c = control; EC = epicatequina; Q = quercetina; TMX (tamarixetina); 3'MetEC (3'-O-metilepicatequina)

Los resultados obtenidos en el tratamiento con los distintos flavonoides no mostraron diferencias significativas en el nivel de 8-OHdG con relación a los controles no tratados con esos compuestos, con excepción del ADN procedente de gusanos tratados con epicatequina (EC) y sometidos a estrés térmico, en los cuales se producía un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de 8-OHdG con respecto al resto de tratamientos. Llama la atención que a excepción del mencionado ensayo, la alta temperatura a la que eran sometidos los gusanos para producir el estrés no afectaba el nivel de daño oxidativo de ADN de una manera significativa. Curiosamente en los gusanos no sometidos a estrés térmico se detectaban incluso mayores niveles de 8-OHdG en los tratamientos realizados con los metabolitos metilados que en sus precursores no metilados, aunque las diferencias no eran significativas en ningún caso.

Con los resultados obtenidos no se puede concluir sobre el efecto de los flavonoides sobre el biomarcador 8-OHdG. Aparentemente EC tiene un efecto pro-oxidante sobre ADN, lo que discrepa de otras observaciones realizadas en nuestros estudios, donde en general la EC presenta un efecto positivo sobre la estabilidad redox de la célula. Es, por tanto, necesario realizar más ensayos para concluir acerca del efecto de los flavonoides sobre el ADN.

4.2.1.4. Discusión general

Como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria, las causas del envejecimiento no están todavía claras. La teoría clásica del envejecimiento establece una relación entre el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la respiración celular en la mitocondria y en otros procesos metabólicos, con un mayor daño en macromoléculas. De todas esas macromoléculas el daño en el ADN cobra una vital importancia, ya que en él se

encuentran codificados todos los sistemas de reparación de la célula (Barja y Herrero, 2000). Los compuestos fenólicos han sido estudiados desde diferentes puntos de vista, aunque la mayor parte de los estudios realizados han puesto el énfasis en evaluar su potencial protector frente a procesos oxidativos, aunque son pocos los estudios que intentan dilucidar su mecanismo de acción molecular. En este trabajo se ha evaluado los niveles de ROS en gusanos tratados con flavonoides y algunos de sus metabolitos, mostrando que en general el pretratamiento de *C. elegans* con estos compuestos produce una ligera reducción en los niveles de ROS intracelulares, significativa en el caso del tratamiento con quercetina cuando los gusanos no son sometidos a estrés, y también en el caso de epicatequina y tamarixetina (4'-O-metilquercetina), cuando se someten a estrés térmico. Como se ha indicado anteriormente, el nivel de ROS en un organismo es el resultado del balance entre las ROS producidas y las que son eliminadas mediante los diferentes sistemas de detoxificación. Además de un posible efecto reductor directo, se ha sugerido que los flavonoides son capaces de modular la actividad de las defensas antioxidantes en el organismo, elevando los niveles de GSH y la actividad de diferentes enzimas antioxidantes (Kong *et al.*, 2000; Halliwell, 2011), por lo que los niveles reducidos de ROS podrían quizás explicarse a través de la activación de dichos sistemas. En trabajos previos en nuestro grupo (Surco-Laos *et al.*, 2011) se demostró que tratamientos con quercetina o tamarixetina aumentaban la longevidad y la supervivencia en *C. elegans* cuando eran sometidos a estrés térmico (35 °C, 8h). En los resultados ahora obtenidos cuando los gusanos eran sometidos a ese estrés (35 °C, 8h) se observa una disminución significativa en los niveles de ROS en gusanos tratados con tamarixetina, y una disminución, aunque en este caso no significativa (teniendo en cuenta valores de $p < 0,05$) en gusanos tratados con quercetina (Figura 15b). Por otra parte, en estudios previos en nuestro grupo (Surco-Laos *et al.*, 2012), en gusanos tratados con epicatequina no se habían observado diferencias significativas sobre la duración

de vida, aunque, sin embargo, se había visto que aumentaba la supervivencia en los gusanos cuando eran sometidos a estrés térmico. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una disminución de ROS intracelulares en gusanos tratados con epicatequina y sometidos a estrés (figura 15b). Estas observaciones parecen sugerir que el aumento de la longevidad en gusanos tratados con estos compuestos no está mediado por una disminución en los niveles de ROS, al menos no exclusivamente y de un modo directo.

La capacidad de diversos flavonoides, como EGCG (Abbas y Wink, 2009), extractos de *Ginkgo biloba* (Strayer *et al.*, 2003) o isoflavonas de soja (Gutiérrez-Zepeda *et al.*, 2005), para reducir los niveles de ROS en condiciones de estrés ha sido observada por distintos autores, aunque no en todos los casos se relacionaba ese efecto con la duración de vida del gusano. Chen *et al.* (2013) en ensayos con mutantes *mev-1(kn1)* de *C. elegans*, que presentan una vida media más corta relacionada con una sobreproducción de ROS intracelulares y un nivel oxidativo más alto de lo normal, encontraron que el tratamiento con aspalatina (flavonoide de estructura dihidrocalcona presente en té rooibos) disminuía el nivel de ROS produciendo un aumento en la longevidad. Estos autores sugirieron que la resistencia al estrés oxidativo y el aumento de la longevidad en *C. elegans* tras el tratamiento con el flavonoide estaría mediada a través de la regulación de la ruta de señalización DAF-16/FOXO. Sin embargo, estudios en líneas celulares han dado lugar a resultados contradictorios en cuanto a la influencia de distintos flavonoides sobre los niveles de ROS. Algunos autores han encontrado una reducción de los niveles de ROS en células tratadas con flavonoides (Ramos *et al.*, 2011; Rodríguez-Ramiro *et al.*, 2011; Jung, 2014; Juadjur *et al.*, 2015), mientras que otros observan aumentos en la producción de ROS en células tumorales de manera dependiente de la dosis de flavonoide (Chen *et al.*, 2012; Sugisawa y Umegaki, 2002; Hong *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

En los ensayos aquí realizados la disminución de ROS intracelulares en *C. elegans* en gusanos no estresados no se relaciona de modo directo con un menor nivel de daño oxidativo en el ADN, ya que los niveles se mantienen sin diferencias significativas respecto del control. En los gusanos tratados con EC y sometidos a estrés, los niveles de 8-OHdG aumentan significativamente. De la misma forma, en los gusanos tratados con quercetina y tamarixetina, se aprecia un ligero aumento en los niveles de esta base oxidada, aunque las diferencias no eran significativas con respecto al control. Por otra parte, tanto en los gusanos control como en los tratados con 3'MetEC, los niveles de 8-OHdG sufren un ligero descenso al ser sometidos a altas temperaturas. En su conjunto, estos resultados parecen discrepar de la disminución en los niveles de ROS que, excepto para 3'MetEC, se observa en los gusanos tratados con los flavonoides ensayados. En estudios realizados en células HL-60, Oikawa *et al.* (2003) también observaron un aumento en los niveles de 8-OHdG intracelulares tras tratamiento con catequina y epicatequina, aunque en su caso encontraban un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno en el medio, que los explicaban por el posible potencial pro-oxidante de las catequinas como consecuencia de su transformación en radicales quinona en el medio celular, lo que conduciría a la oxidación de ADN y consecuente aumento de 8-OHdG.

Como se ha descrito en la parte introductoria de esta tesis doctoral, algunos flavonoides con estructura catecólica en el anillo B pueden actuar como pro-oxidantes en el medio, cuando se dan las condiciones adecuadas, dando lugar a quinonas reactivas que pueden producir daño en los sistemas biológicos. Leávy *et al.* (1993) propusieron un modelo en el que el nivel de peróxido de hidrógeno celular regularía la activación de la enzima peroxidasa dependiente de catecol para formar aductos de ADN. De esta forma, la enzima peroxidasa reduciría el peróxido utilizando el grupo catecol como agente reductor y, como consecuencia, se generarían compuestos reactivos de catecol que conducirían a la formación de los aductos de ADN. Otro posible mecanismo que podría

explicar la actividad de los polifenoles con estructura catecólica en este sentido es su capacidad para actuar como sustratos de la enzima catecol-*o*-metiltransferasa (COMT). Esta enzima se encarga de metabolizar los catecol-estrógenos (CE), como el 2- y 4-hidroxiestradiol, que algunos autores proponen como responsables en la iniciación tumoral (Badawi *et al.*, 2001; Ziegler *et al.*, 1997). Si los CE no son inactivados pueden derivar en quinonas reactivas, que podrían dar lugar a la formación de aductos mediante la reacción con las moléculas de ADN (Cao *et al.*, 1998; Cavalieri *et al.*, 1997; Yager, 2000). Los flavonoides con agrupamientos catecol al actuar como sustratos de la COMT podrían reducir su actividad de cara a metabolizar CE, lo que llevaría a una menor inactivación de éstos y, por lo tanto, a un mayor daño en ADN. En este sentido, Zhu y Liehr (1996) demostraron una mayor toxicidad de los CE en ratones alimentados con quercetina. Sin embargo, este tipo de razonamiento no explicaría porqué sólo en los gusanos tratados con EC se produce un aumento en los niveles de 8-OHdG y no en el caso de los otros flavonoides ensayados (ver Figura 17).

Otro aspecto que merece un comentario es el relativo a los ensayos con 3'MetEC, únicos en los que se encontraban niveles significativamente mayores de ROS en los gusanos tratados que en los controles (Figura 15). En los tratamientos con este flavonoide, aunque las diferencias no eran significativas, se puede observar que en el caso de gusanos no estresados los niveles de 8-OHdG están por encima del resto de tratamientos (a excepción de los ensayos con EC), mientras que, por el contrario, en los sometidos a estrés se encuentran por debajo (Figura 17). Esta observación podría quizás tener su explicación en una respuesta hormética, es decir, una adaptación del organismo frente al estrés derivado del tratamiento con el flavonoide. De esta forma, la exposición del gusano a 3'MetEC, al generar un aumento en los niveles intracelulares de ROS, mantendría los mecanismos de detoxificación activados ante la posibilidad de

un episodio de estrés, lo que podría justificar que los niveles de 8-OHdG sean más bajos cuando los gusanos son sometidos a estrés que en los no estresados.

En conclusión, los resultados obtenidos parecen sugerir que los niveles de ROS y de 8-OHdG no pueden ser considerados marcadores suficientemente precisos para establecer la eficacia de los flavonoides en el control del daño oxidativo en *C. elegans*. Se debe, no obstante, señalar que en la literatura existen también notables discrepancias entre los resultados obtenidos por diferentes autores en lo que se refiere a la relación entre daño oxidativo y niveles de 8-OHdG, como se ha observado al determinar esta base modificada en organismos mutantes con altos niveles de daño oxidativo, donde los resultados obtenidos no siempre respondían a lo que podría ser esperado (revisado en Labuschagne, 2013). Los valores de 8-OHdG intracelulares descritos por varios autores varían en función del tipo de célula estudiada e incluso entre individuos (Halliwell, 2000), lo que dificulta la estimación real de los niveles de daño oxidativo en los estudios llevados a cabo. Del mismo modo, el procedimiento de extracción y posterior manipulación del ADN en laboratorio puede producir aductos y llevar a resultados erróneos. En este trabajo se ha utilizado ADN extraído directamente de *C. elegans* y el análisis subsecuente se ha realizado mediante un método ELISA, donde no ha sido necesaria una digestión con enzimas de restricción, pretendiendo minimizar las posibles interferencias producidas en la manipulación del ADN. Sin embargo, durante la preparación del ADN las bases nitrogenadas están expuestas al oxígeno ambiental (hiperoxia, comparando con los niveles de oxígeno nucleares) y posiblemente a metales de transición, contaminantes procedentes de los equipos utilizados (como el sonicador durante la homogeneización de los tejidos), así como eventualmente a altas temperaturas e incluso a oxidantes como el fenol (Halliwell, 2000). Todos estos factores pueden influir en la producción de resultados erróneos y consecuentemente en la dificultad para observar diferencias entre muestras, ya

que los niveles intracelulares de estos compuestos son extremadamente pequeños, por lo que cualquier tipo de error experimental puede influir en su determinación. Por otra parte, en este trabajo sólo se ha llevado a cabo el análisis de los niveles de 8-OHdG como marcador del daño en el ADN, mientras que en la naturaleza han sido descritos otros aductos y diferentes efectos que pueden contribuir al daño oxidativo. Por ello, es difícil establecer una relación completa entre el efecto de los flavonoides y el daño oxidativo en la molécula de ADN. En el mismo sentido, como se ha comentado, el método utilizado para la determinación de los niveles de ROS presenta algunas limitaciones en cuanto a su selectividad y especificidad, lo que podría dar lugar a resultados sesgados y no concluyentes. Todo ello hace que los resultados obtenidos deban ser considerados con cautela, siendo necesario un mayor número de ensayos y posiblemente el uso de otras aproximaciones para llegar a conclusiones lo suficientemente fundamentadas.

4.2.2. Influencia de epicatequina en resistencia frente a condiciones de estrés

4.2.2.1 Introducción

Los flavonoides son ampliamente conocidos por su potencial antioxidante y captador de radicales libres, como ha sido demostrado en numerosos estudios *in vitro*. En algunos casos estas propiedades antioxidantes se han relacionado con los efectos beneficiosos para la salud de las dietas ricas en flavonoides. Sin embargo, existen efectos indirectos de los flavonoides que podrían ser de mayor importancia sobre sus efectos *in vivo* que los relacionados con el efecto antioxidante directo. Para inducir una actividad antioxidante directa son necesarias altas concentraciones de flavonoides, que es difícil que puedan alcanzarse en tejidos tras un consumo dietético; sin embargo, bajas concentraciones tisulares de estos compuestos, como las que podrían ser alcanzadas a partir la dieta, podrían inducir efectos antioxidantes indirectos, o incluso efectos pro-oxidantes (Fraga y Oteiza, 2011; Hollman *et al.*, 2011). Por otra parte, los flavonoides son xenobióticos y, como tales, son metabolizados por enzimas de fase I y II, dando lugar a diferentes metabolitos que difieren estructuralmente de los compuestos originales presentes en los alimentos. Como consecuencia de ese metabolismo se pueden producir intermediarios, como quinonas, con capacidad pro-oxidante. Sin embargo, los limitados niveles basales de pro-oxidantes generados en la oxidación y en el metabolismo de flavonoides y otros polifenoles dietéticos podrían resultar beneficiosos al organismo, en el sentido de que podrían estimular la sobre-expresión de defensas antioxidantes endógenas (Halliwell, 2011). De este modo, los mecanismos implicados en la actividad biológica de los flavonoides serían más complejos de lo que inicialmente se pensaba en su mero papel como

antioxidantes. Las catequinas son uno de los flavonoides más abundantes en la dieta, estando presentes en muchas frutas, té, cacao y vino tinto. Las propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres de las catequinas se han demostrado ampliamente en estudios *in vitro* (Dueñas *et al.*, 2010) e incluso se ha demostrado su capacidad de incrementar los niveles de defensas antioxidantes en sistemas celulares expuestos a prooxidantes (Murakami *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2010).

El nematodo *Caenorhabditis elegans* se ha convertido en un importante modelo *in vivo* para el estudio de los mecanismos moleculares relacionados con el envejecimiento, resistencia al estrés y enfermedades degenerativas. En los últimos años se han publicado diversos estudios sobre los efectos y mecanismos de acción de flavonoides usando *C. elegans* como organismo modelo. Se ha demostrado que *C. elegans* aumenta su resistencia al estrés oxidativo y su longevidad al ser expuesto a extractos ricos en flavonoides (Wu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009; Surco-Laos *et al.*, 2011). En un estudio previo de nuestro grupo (Surco-Laos *et al.*, 2012) se demostró que la exposición de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* a catequinas y sus derivados metilados (200 μ M), aumentaba la resistencia del nematodo frente al estrés oxidativo inducido tanto químicamente por tratamiento con juglona como mediante altas temperaturas, elevando su tasa de supervivencia en 28-44% en comparación con gusanos no tratados con esos flavonoides. Con el fin de tratar de elucidar los mecanismos de acción a través de los cuales los flavonoides ejercen su efecto beneficioso en la salud, y siguiendo con el trabajo previo, el objetivo de los ensayos planteados en este capítulo es el de evaluar las modificaciones en biomarcadores (producción de ROS, niveles de GSH y actividad de enzimas antioxidantes) en gusanos tratados con EC y sometidos a estrés oxidativo inducido tanto térmicamente como por vía química mediante tratamiento con juglona.

4.2.2.2. Ensayos de estrés térmico

4.2.2.2.1 Resultados

a) Efecto de epicatequina sobre los niveles de ROS intracelulares.

En un trabajo previo de nuestro grupo (Surco-Laos *et al.*, 2012), se comprobó que la epicatequina (EC) aumentaba la supervivencia de *C. elegans* sometido a estrés oxidativo en un 28% comparado con gusanos no tratados. Teniendo en cuenta que el estrés térmico se ha asociado clásicamente con daño oxidativo debido a la acumulación de ROS (Bruskov *et al.*, 2002), en este estudio se determinaron los niveles de ROS en poblaciones de *C. elegans* tipo silvestre N2, cultivadas en medio NMG con y sin EC (200 μ M) y sometidas o no a estrés térmico (35 °C, 2h) en el sexto día de adulto.

Los gusanos control no tratados con EC ni sometidos a estrés térmico mostraron niveles de ROS más bajos que los controles sometidos a la acción de la temperatura (Figura 18A), confirmando que la exposición a esa temperatura conlleva un estrés oxidativo en el nematodo. Sin embargo, en los gusanos estresados tratados con EC los niveles de ROS se vieron reducidos significativamente ($p < 0.01$) respecto a su control (Figura 18A), entre un 24 y 28% dependiendo del momento de la medida (Figura 18B). Estos resultados coinciden con los observados en el apartado 4.2.1.3.1., sólo que en este caso son determinados en el día 6 de adulto del gusano, para posteriormente determinar el efecto de EC sobre las enzimas antioxidantes de los individuos. Es interesante destacar que la reducción en los niveles de ROS se observaba también en los gusanos tratados pero no estresados, los cuales mostraron una reducción del 10% respecto a su control, no significativa para un nivel de significación $p < 0,01$ aunque sí para $p < 0,05$, lo que indica que la respuesta a la exposición a EC no

sólo se asocia a situaciones de estrés. El hecho de que se encuentren niveles similares de ROS en gusanos no tratados ni estresados y en gusanos estresados tratados con EC (Figura 18A) sugiere que este flavonoide previene el aumento en los niveles de ROS inducido por el choque térmico, manteniéndolos en concentraciones fisiológicas. Este efecto podría ser debido tanto a una actividad antioxidante directa de la EC (captación de radicales libres) como a una acción indirecta mediante estimulación de las defensas antioxidantes endógenas, como pueden ser los sistemas glutatión o tiorredoxina, o enzimas como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa o catalasa.

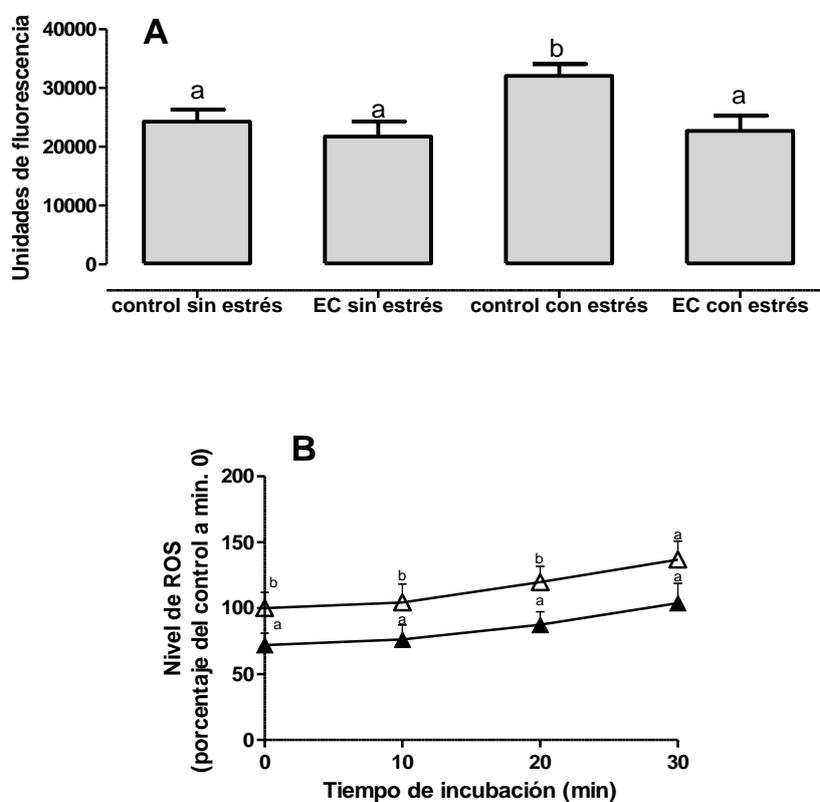


Figura 18. (A) Niveles intracelulares de ROS en *C. elegans*, sometido o no a estrés térmico (2 h, 35 °C) en presencia y ausencia de epicatequina (200 μ M) en el medio de cultivo. La producción de ROS se expresa como unidades de fluorescencia tras la incorporación del reactivo (0 min). La letras indican diferencias entre grupos ($p < 0,01$). (B) Evolución de ROS en gusanos sometidos a estrés térmico, no tratados (línea superior) y tratados con EC (línea inferior). Los resultados se expresan como incremento en el porcentaje de fluorescencia en relación a los animales no

tratados con EC a tiempo 0. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,01$) entre gusanos tratados con EC vs control comparandolos en el mismo tiempo de incubacion.

b) Efecto de epicatequina sobre el nivel de glutatión reducido.

El glutatión es una de las moléculas no enzimáticas más abundantes implicada en las defensas antioxidantes de la célula. En su forma reducida (GSH), esta molécula puede no sólo reducir directamente sustratos sino también actuar indirectamente a través del sistema glutarredoxina. Además, el glutatión está implicado en la protección frente a estrés oxidativo interviniendo en procesos de detoxificación y reparación a través de su implicación en el sistema glutatión-S-transferasa (Mari *et al.*, 2009). La depleción de GSH indica un estado de oxidación celular, mientras que niveles equilibrados de GSH protegen a la célula frente a estrés oxidativo (Martin *et al.*, 2010; Scharf *et al.*, 2003; Alia *et al.*, 2006).

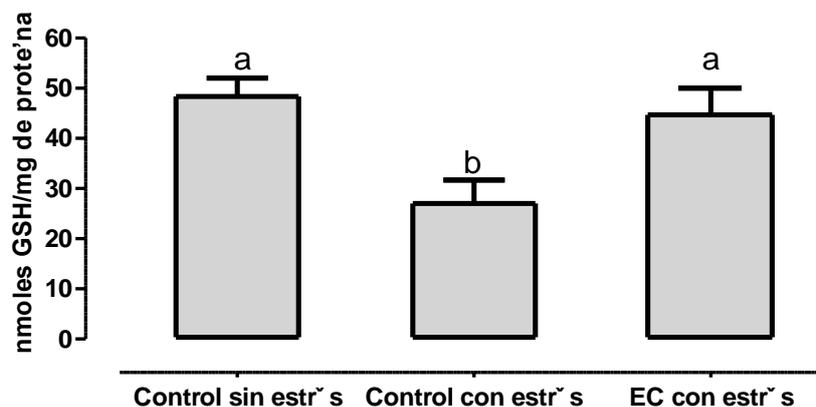


Figura 19. Concentraciones de GSH (expresadas como nmol GSH/mg de proteína) en gusanos sometidos o no a estrés térmico en presencia y ausencia de EC (200 μ M) en el medio de cultivo. La letras indican diferencias significativas entre diferentes grupos ($p < 0,01$). Los valores representan la media \pm SD de tres homogeneizados diferentes de gusanos analizados por triplicado

Los gusanos control sometidos a estrés mostraron niveles significativamente más bajos de GSH (27 nmol/mg de proteína del gusano) que los gusanos tratados con EC (45 nmol/mg proteína), que poseían niveles similares a los existentes en los gusanos en condiciones nativas (Figura 19). Estos resultados confirman que el estrés térmico induce un gasto de GSH, probablemente como resultado del aumento de oxidación intracelular, que es contrarrestado con la presencia de EC. Observaciones similares fueron hechas por Martin *et al.* (2010) en líneas celulares tratadas con EC, aunque hasta el momento, según nuestro conocimiento, este efecto no había sido descrito en *C. elegans*.

c) *Efecto de epicatequina sobre la actividad de enzimas antioxidantes endógenas*

Otro mecanismo involucrado en la limitación del daño celular causado por ROS es la activación de complejos enzimáticos antioxidantes. En estos complejos antioxidantes, GPx, CAT y SOD representan una primera línea de defensa. Como se ha señalado, la enzima superóxido dismutasa (SOD) se encarga de convertir el anión superóxido a H₂O₂ mientras que catalasa (CAT) o peroxidasa (GPx) (glutación peroxidasa o peroxirredoxinas) transforman H₂O₂ en agua. La actividad peroxidasa puede ser después restablecida por reducción a través de tiorredoxinas (TRX) o glutarredoxinas. Este sistema antioxidante puede activarse como respuesta a diferentes estímulos, incluyendo el estrés térmico, y ser modulado mediante compuestos químicos.

En este estudio, las condiciones de estrés no afectaron de manera significativa a GPx en *C. elegans*, mientras que sí aumentó la actividad de la enzima CAT (comparar los controles en las figuras 20A y 20B). El pretratamiento con EC en los gusanos sometidos a estrés térmico parecía inducir cierta reducción en la actividad de GPx (19% en relación con los gusanos no tratados y sometidos a

estrés) y un aumento en la actividad de CAT, aunque esos cambios no fueron significativos ni a nivel $p < 0,01$ ni a $p < 0,05$. La actividad de SOD no se vio modificada (figura 20C)

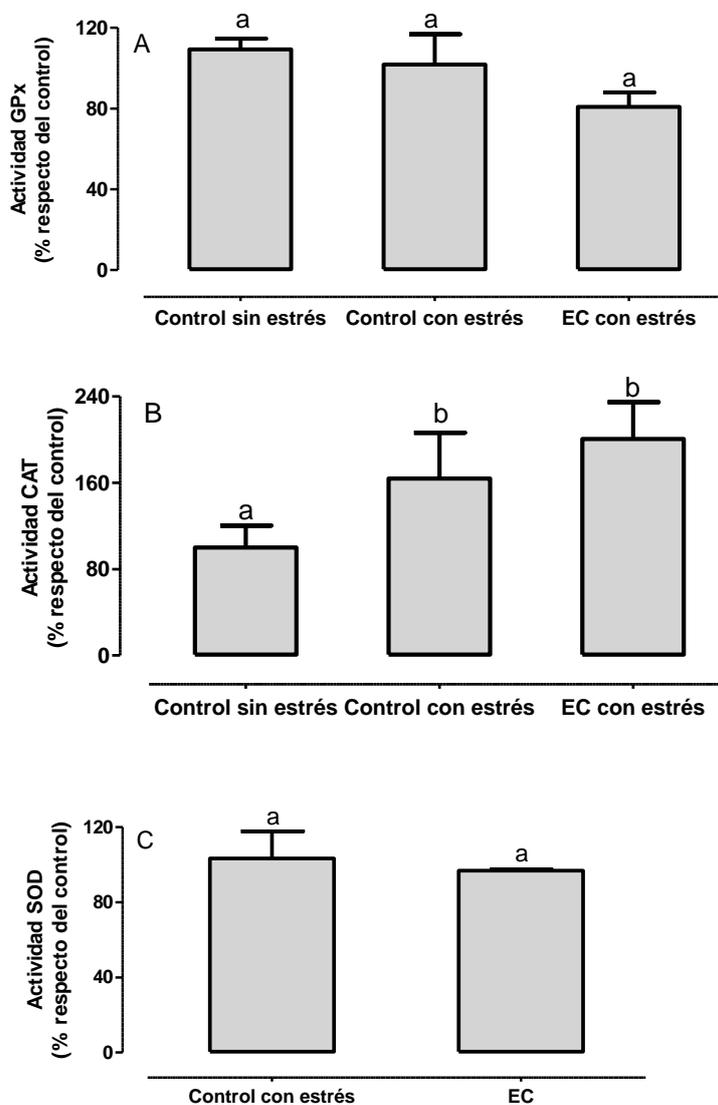


Figura 20. Actividad de enzimas antioxidantes: (A) glutatión peroxidasa (GPx), (B) catalasa (CAT), y superóxido dismutasa (SOD), en gusanos sometidos o no a estrés térmico en presencia y ausencia de EC (200 μ M) en el medio de cultivo. Las actividades enzimáticas se representan como porcentaje en relación a los controles (gusanos no tratados ni sometidos a estrés). Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$) respecto a los controles en cada ensayo. Los valores representan la media \pm SD de tres homogeneizados diferentes de gusanos analizados por triplicado.

4.2.2.2.2 Discusión

Los resultados obtenidos mostraron que la acumulación de ROS tras someter a los gusanos a estrés térmico puede ser prevenida por pretratamiento con EC. Además, en los gusanos pre-tratados con EC se observaron mayores niveles de GSH (un 67% comparado con los no tratados), mientras que las actividades de GPX, CAT y SOD no se veían modificadas de manera significativa. Estas observaciones parecen sugerir que el aumento en la concentración de GSH inducido por EC podría ser suficiente para contrarrestar el aumento de los niveles de ROS y, por lo tanto, para aumentar la supervivencia de *C. elegans* en condiciones de estrés térmico. Sin embargo, aunque las diferencias no eran significativas estadísticamente, sí se observaba cierta tendencia al aumento en la actividad de CAT y reducción en la de GPx. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Martin y colaboradores en células HepG2, quienes encontraron que el tratamiento con EC (Martin *et al.*, 2010) o con flavanoles del cacao (Martin *et al.*, 2008) disminuía la actividad de GPx y glutatión reductasa y aumentaba los niveles de GSH en células sometidas a estrés oxidativo. Por otra parte, algunos estudios han descrito la capacidad del hidroxitirosol (un compuesto fenólico simple), el flavonol quercetina y las catequinas del té verde para elevar los niveles de GSH y disminuir la actividad de GPx en diferentes líneas celulares sometidas a estrés oxidativo (Murakami *et al.*, 2002; Alia *et al.*, 2006; Goya *et al.*, 2007). La reducción de los niveles de ROS también se observó en gusanos tratados con flavonoles como quercetina, fisetina, rutina o kaempferol (Kampkötter *et al.*, 2007a, 2007b) y sometidos a estrés térmico. Esta actividad podría explicarse tanto por la capacidad de captación de radicales libres de la EC (ampliamente demostrada en estudios “*in vitro*”) como por una activación indirecta de las rutas de señalización relacionadas con la protección celular.

Una ruta particularmente relevante en la modulación del estrés oxidativo es la activación del elemento antioxidante (ARE), que promueve la expresión de proteínas protectoras, incluyendo las requeridas para la síntesis de glutatión (glutamato/cistina *antiporter*, γ -glutamilcisteína sintetasa, glutatión sintetasa) (Rushmore *et al.*, 1991). Se ha demostrado que la expresión de la mayoría de los genes relacionados con el elemento ARE está regulada mediante el factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2) (Nguyen *et al.*, 2003; Venugopal *et al.*, 1996), que en condiciones basales se localiza en el citoplasma y se encuentra unido a la proteína represora Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein*). Una vez que se produce la activación, este complejo es disociado y Nrf2 se transloca al núcleo, donde interacciona con el elemento ARE desencadenando la transcripción de enzimas de fase II y defensa antioxidante, como glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), hemo oxigenasa-1 (HO-1), o NADPH-quinona oxidasa (NQO) (Eggler *et al.*, 2008). La activación de Nrf2 es sensible a la oxidación celular producida por estrés y a altos niveles de compuestos reactivos que presentan grupos tiol en su estructura, además de a algunos antioxidantes incluyendo los polifenoles (Itoh *et al.*, 1999). La sobrerregulación de los genes que dependen del elemento ARE por los flavonoides se ha observado en diferentes líneas celulares (Valerio *et al.*, 2001; Myhrstad, *et al.*, 2002; Kweon *et al.*, 2006). En este sentido, los flavonoides se han relacionado con la capacidad para aumentar la expresión de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa, que es la enzima limitante en la síntesis de GSH, produciendo de esta forma un aumento en la concentración intracelular de glutatión (Myhrstad *et al.*, 2002; Moskaug *et al.*, 2005). En particular, la capacidad de la EC para activar Nrf2 y aumentar los niveles de GSH se ha descrito en astrocitos (Bahia *et al.*, 2008) y células HepG2 (Granado-Serrano *et al.*, 2010). Por otra parte, en estudios con ratas hipertensas tratadas con acetato de desoxicorticosterona (DOCA) que muestran altos niveles de estrés oxidativo, se ha visto que la EC es un potente estimulador de la ruta Nrf2/ARE, conduciendo

a una reducción de la concentración de los niveles vasculares del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Gómez-Guzman *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se puede especular que el aumento en la concentración de GSH y la reducción en los niveles de ROS en los gusanos tratados con EC y sometidos a estrés térmico observados en el presente estudio podrían explicarse por la activación de la ruta ARE. El glutatión es importante en muchas patologías, y la regulación de su concentración intracelular puede ser uno de los mecanismos mediante el cual los flavonoides actúan en la prevención del desarrollo de enfermedades. Los resultados aquí obtenidos indican que la EC puede actuar como modulador de los niveles de GSH en *C. elegans*, lo cual también implicaría una regulación de procesos dependientes de GSH, como la detoxificación de xenobióticos, la glutationilación de proteínas o la regulación redox.

Otra de las vías que se ha relacionado con el aumento de la resistencia tanto a estrés térmico como oxidativo por parte de los flavonoides es la que implica la regulación de la cascada de señalización IIS [*insulin/IGF (insulin-like growth factor)-like signalling*], que constituye un regulador clave en la termotolerancia y longevidad de *C. elegans* (Murphy y Hu, 2013). Así, se ha demostrado que flavonoles como quercetina aumentan la localización de DAF-16 dentro del núcleo, lo que se relaciona con un aumento de la expresión de defensas antioxidantes (Kampkötter *et al.*, 2007a; Kampkötter *et al.*, 2008; Grünz *et al.*, 2012). No obstante, Saul *et al.* (2008) demostraron que la quercetina inducía un aumento de la longevidad en cepas *knockout* de *C. elegans* que tenían inactivado el gen *daf-16*, sugiriendo que los mecanismos de acción podrían ser independientes de IIS. La cascadas de señalización sensibles a procesos redox también podrían constituir una diana prometedora, ya que se ha visto que las ROS están implicadas en las señales de transducción de diferentes factores de crecimiento (Rhee, 2006) y apoptosis (Hamanaka *et al.*, 2010)

Aunque las observaciones realizadas no permiten concluir cuál es el mecanismo preciso de acción implicado en los efectos antioxidantes de EC, los cambios que induce en el estado redox de *C. elegans* constituyen una valiosa indicación para futuros experimentos empleando las adecuadas aproximaciones mecanísticas que permitan concluir sobre los mecanismos subyacentes a los efectos antioxidantes *in vivo* de EC y otros flavonoides.

Es importante tener en cuenta que la concentración de EC usada en este estudio (200 μ M, correspondiente a aproximadamente 6 mg/100 g) está en el mismo nivel de la concentración de catequinas que se ha establecido en diferentes alimentos (alrededor de 10 mg/100 g en fresas, 25 mg/100 g en manzanas, o 70 mg/100 g en té). Obviamente, el gusano no incorpora la cantidad total de EC presente en el medio de cultivo, sino que la captación de la misma por parte de *C. elegans* parece ser bastante más baja, según se deduce de estudios anteriores (Surco-Laos *et al.*, 2012). En estas circunstancias se debe asumir que los niveles de exposición del gusano a este compuesto son menores que los que se pueden alcanzar a través de consumos como los que se pueden producir en la dieta humana. Sin embargo, estos resultados nunca pueden ser extrapolables al metabolismo humano. Por ello se requiere realizar más estudios que permitan dilucidar el mecanismo de acción de los compuestos, y que permitan comprender cómo ejercen su efecto beneficioso en la salud.

4.2.2.3. Ensayos de estrés oxidativo inducido químicamente

4.2.2.3.1 Resultados

En un estudio previo, el tratamiento con diferentes catequinas (200 μM), incluyendo EC, había mostrado producir un aumento significativo en la tasa de supervivencia de los nematodos sometidos a estrés térmico y también a estrés oxidativo mediante la exposición a juglona (Surco-Laos *et al.*, 2012). En el apartado anterior de este capítulo se demostraba que la aplicación de estrés térmico aumentaba los niveles de ROS y disminuía los de GSH en la cepa silvestre N2 de *C. elegans*, y que esos efectos podían ser contrarrestados mediante un pretratamiento de los gusanos con EC. Sin embargo, no se observaban cambios significativos en las actividades de enzimas antioxidantes endógenas (CAT, GPx y SOD). En este nuevo ensayo se lleva a cabo un estudio similar con gusanos cultivados en presencia o ausencia de EC (200 μM) y posteriormente sometidos a estrés oxidativo inducido químicamente mediante la exposición a juglona.

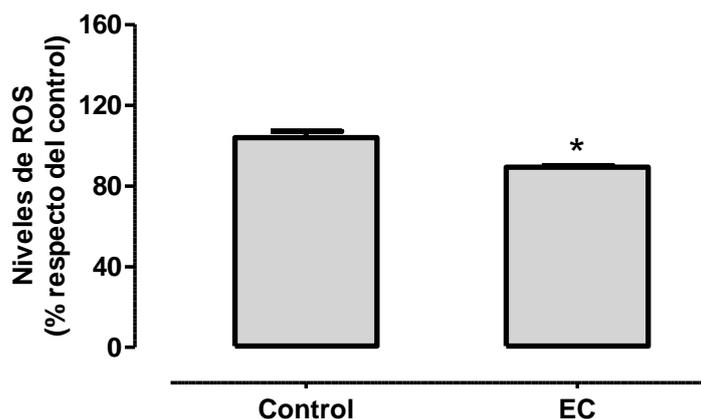


Figura 21. Niveles intracelulares de ROS en *C. elegans* cultivados en ausencia (control) y presencia (EC) de epicatequina (200 μ M) en el medio de cultivo y posteriormente sometidos a estrés oxidativo (200 μ M juglona, 20 min). La producción de ROS se expresa respecto de los gusanos control no tratados (100%). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los grupos.. Los valores representan medias \pm SD procedentes de diferentes gusanos individuales analizados por triplicado.

Se pudo observar que en gusanos sometidos a estrés químico el pretratamiento con EC producía una reducción significativa de los niveles de ROS (10%, $p < 0,01$) en relación con los controles no tratados con EC (Figura 21). Además, en los gusanos tratados con EC, se producía un aumento significativo en los niveles de GSH (50%, $p < 0,01$) (Figura 22) y, del mismo modo, las actividades de las enzimas antioxidantes GPx, CAT y SOD aumentaban significativamente (3%, 19% y 22%, respectivamente) respecto a los animales no tratados (Figuras 23A-23C).

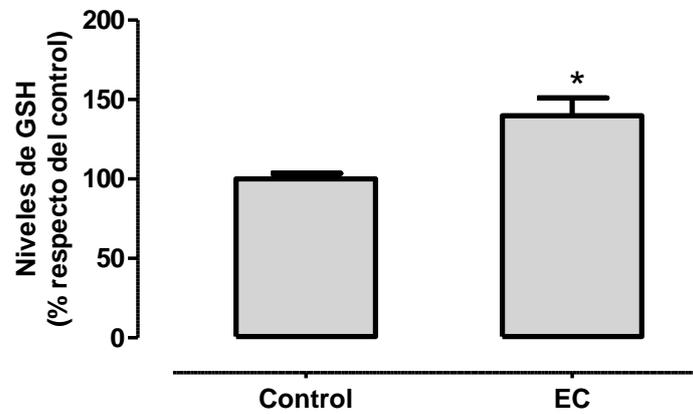


Figura 22. Concentración de GSH (expresado como porcentajes respecto de los gusanos control, 100%) en gusanos sometidos a estrés oxidativo (200 μ M juglona, 20 min) en ausencia (control) y presencia (EC) de epicatequina (200 μ M) en el medio de cultivo. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los grupos. Los valores representan medias \pm SD procedentes de diferentes homogeneizados de gusanos analizados por triplicado.

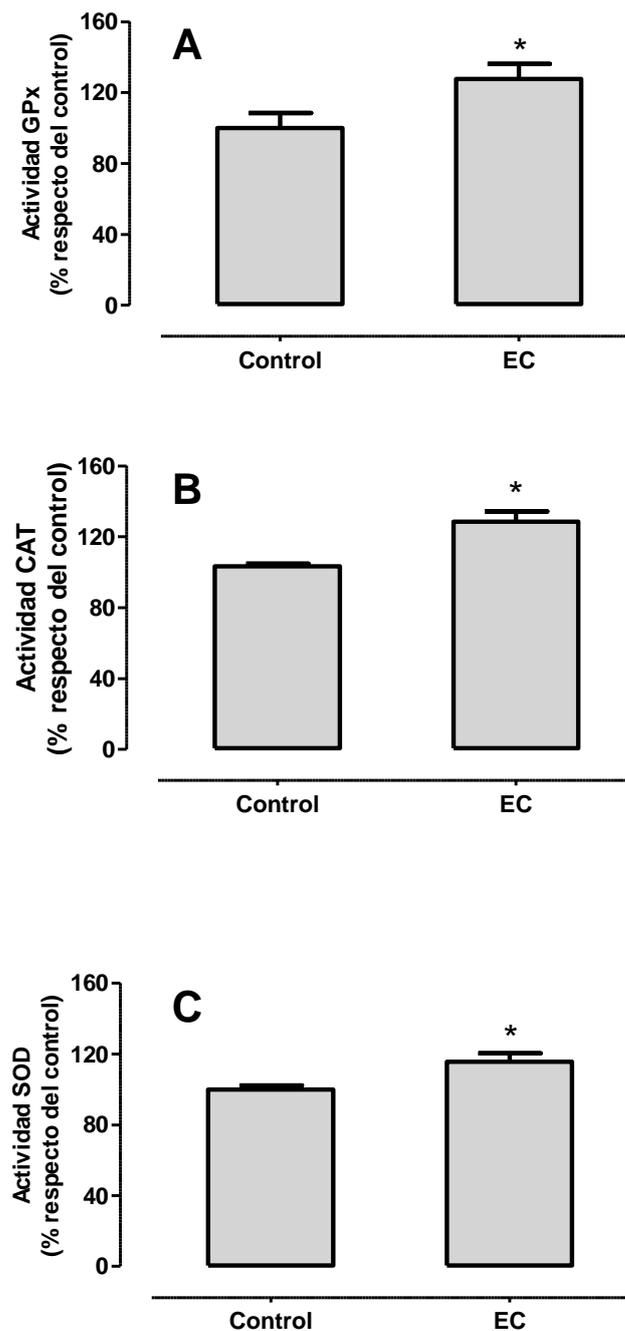


Figura 23. Actividad de enzimas antioxidantes: (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT) y (C) glutatión peroxidasa (GPx) en gusanos sometidos a estrés oxidativo (200 μ M juglona, 20 min) tratados (EC) o no tratados (control) con epicatequina (200 μ M en el medio de cultivo). Las actividades enzimáticas se expresan respecto de los gusanos control no tratados (100%). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los grupos. Los valores representan medias \pm SD procedentes de diferentes homogeneizados de gusanos analizados por triplicado.

4.2.2.3.2. Discusión

Los mecanismos celulares implicados en el efecto *in vivo* de los flavonoides no son todavía totalmente conocidos, aunque se cree que podrían, al menos en parte, estar relacionados con su potencial para modular el estado oxidativo de la célula. Como se ha señalado anteriormente, la capacidad de los flavonoides para actuar como captadores de radicales libres, quelantes de metales y/o supresores de oxígeno singlete ha sido ampliamente demostrada en ensayos *in vitro* (Rice-Evans *et al.*, 1996). Sin embargo esta actividad como antioxidantes no parece estar directamente relacionada con sus efectos *in vivo*, ya que las concentraciones de flavonoides que pueden alcanzarse a nivel intracelular no serían tan altas como las necesarias para actuar como antioxidantes directos, debido a su reducida biodisponibilidad y a su alto grado de biotransformación en el organismo (Sang *et al.*, 2011). De este modo, el descenso producido en los niveles de ROS en gusanos tratados con EC podría no estar relacionado con su capacidad para actuar como captadores de radicales libres, sino más bien con la modulación de defensas antioxidantes y de las cascadas de señalización implicadas en la respuesta redox (Fraga y Oteiza, 2011). Así, por ejemplo, Grunz *et al.* (2012) observaron que el tratamiento de *C. elegans* con otros flavonoides, como miricetina, quercetina kaempferol o narigenina, inducía la translocación dentro del núcleo del factor de transcripción FoxO DAF-16 y producía un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes. Se ha sugerido también que en bajos niveles, los flavonoides podrían inducir una respuesta hormética de adaptación en las células. Se sabe que en los sistemas celulares los polifenoles pueden sufrir procesos de autooxidación a quinonas dando lugar a una moderada formación de ROS, los cuales podrían actuar como oxidantes y estimular la expresión de enzimas a través del sistema Keap1/Nrf2/ARE (Chabert *et al.*, 2014).

Diversos factores de transcripción son activados bajo condiciones de estrés oxidativo, como el factor nuclear kappa b (NF-kb) y el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) (Gloire *et al.*, 2006). Como se ha señalado en el capítulo anterior, el factor Nrf2 es un potente activador de los elementos de respuesta antioxidante (ARE), así como mediador en la expresión de genes implicados en la regulación de enzimas de fase II. Se ha indicado que los polifenoles tendrían capacidad para activar el ARE y estimular la expresión de Nrf2 o su translocación al núcleo, contribuyendo de esta forma a la protección de las células contra los radicales libre y el daño oxidativo (Chen y Kunsch, 2004), aunque los mecanismos a través de los que inducirían este proceso no han sido establecidos.

Los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) se mantienen por la reducción de GSSG por acción de la glutatión reductasa, la síntesis *de novo* o mediante la captación extracelular de glutatión (Meister y Tate, 1976). Se asume que la reducción en los niveles de GSH refleja oxidación intracelular, mientras que una concentración estable de GSH podría estar relacionada con la prevención celular contra un evento de estrés oxidativo. El aumento observado en nuestros ensayos en los niveles de GSH en gusanos tratados con EC y sometidos a estrés oxidativo (Figura 21) sugiere que este flavonoide (o productos de su metabolismo) podría actuar modulando los niveles de GSH en este organismo en respuesta a una situación de estrés oxidativo, ya sea inducido químicamente o por vía térmica como se vio en el apartado anterior. La capacidad de la EC para activar Nrf2 y aumentar los niveles de GSH también se ha demostrado en astrocitos (Bahia *et al.*, 2008) y en células HepG2 (Granado-Serrano *et al.*, 2010). En hepatocitos de ratas, flavonoides como las calconas buteína y floretina mostraron capacidad para inhibir el daño oxidativo producido por *t*-BHP al potenciar los contenidos de GSH a través de la ruta ERK2/Nrf2, así como al inducir la sobreexpresión de las enzimas hemo oxigenasa-1 y glutamato cisteína ligasa (Yang *et al.*, 2001). En fibroblastos

(células COS-1) también se encontró que distintos flavonoides (quercetina, apigenina, miricetina, kaempferol y extractos de cebolla) eran capaces de aumentar la expresión de gamma-glutamylcisteína sintetasa, enzima limitante en la síntesis de GSH, produciendo consecuentemente un aumento en la concentración intracelular de glutatión (Myhrstad *et al.*, 2002).

En estos ensayos se observó que el tratamiento con EC producía un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes (GPx, CAT y SOD) en gusanos sometidos a estrés oxidativo mediante juglona (Figuras 22A-C). Este resultado está en consonancia con las observaciones hechas por diferentes autores en estudios realizados en modelos murinos y líneas celulares, que también encontraban un aumento en la actividad de esas enzimas como respuesta al tratamiento con flavonoides (Grünz *et al.*, 2012; Sanders *et al.*, 2000; Tanigawa *et al.*, 2007). Curiosamente, en los ensayos realizados sometiendo los gusanos tratados con EC a estrés térmico (descritos en el apartado 4.2.2.2) no se habían observado aumentos significativos en la actividad de GPx, CAT y SOD, sugiriendo que el aumento en los niveles de GSH podía ser suficiente para contrarrestar el aumento de ROS producido por las altas temperaturas. Kampkötter *et al.* (2007a) también encontraron que flavonoides como quercetina eran capaces de reducir la acumulación de ROS en procesos de estrés térmico, mejorando la termotolerancia en *C. elegans* sin aumentar los niveles de SOD. Esos autores observaron que aunque la quercetina facilitaba una translocación significativa de DAF-16 desde el citoplasma al núcleo, ésta no se asociaba a una sobreexpresión de la de SOD-3, lo que les llevó a sugerir que esta reducción en las necesidades enzimáticas era debida al proceso de homeostasis celular, unido a la capacidad captadora de radicales libres y moduladora de rutas de señalización celular de quercetina, que daría lugar a una modificación en la distribución de DAF-16. Las discrepancias observadas entre nuestros dos ensayos podrían deberse no sólo a las diferentes condiciones de estrés utilizadas (térmico u oxidativo), sino también a los diferentes estadios en el

ciclo de vida de los gusanos en que fueron aplicadas en cada caso. En los ensayos de estrés térmico, los gusanos se sometieron al mismo en el 6^o día de adulto, mientras que en los de estrés oxidativo inducido químicamente, los gusanos fueron sometidos a estrés en fase larvaria L4, lo que obviamente influye sobre el tiempo que los animales están expuestos al flavonoide y seguramente también sobre la susceptibilidad y respuesta metabólica de los mismos.

4.2.2.4. Comentario final

Nuestros estudios no permiten concluir sobre cuáles serían los mecanismos moleculares implicados en el efecto antioxidante de EC. Parece ser, sin embargo, que este flavonoide es capaz de modular las variables relacionadas con los procesos redox en *C. elegans*, aunque en el efecto podrían estar implicados diferentes mecanismos dependiendo del tipo de estrés aplicado y la edad de los individuos. En los ensayos realizados, la EC parece ser más eficiente para contrarrestar el daño oxidativo inducido químicamente por juglona (alrededor de 44% de aumento en la supervivencia de los gusanos, comparados con los controles no tratados con EC) que el producido por estrés térmico (aumento de alrededor del 19%). Por otra parte, el proceso de ingesta y biotransformación por parte de *C. elegans* también debe de tener una influencia decisiva en los efectos producidos, así como ser determinante en los niveles y las formas estructurales de la EC presentes en los gusanos. Así, por ejemplo, la cantidad de flavonoide ingerida puede variar en función de la edad de los individuos, debido a la diferente capacidad de “bombeo” (Melov *et al.*, 2000). Igualmente, las modificaciones estructurales (p.ej., los procesos de conjugación producidos por enzimas de fase II) se sabe que atenúan el efecto antioxidante y captador de radicales libres de los flavonoides (Rice-Evans *et al.*, 1996). En un trabajo previo llevado a cabo en nuestro grupo se comprobó que la EC ingerida era transformada por *C. elegans* a diferentes metabolitos, principalmente conjugados glicosilados, que eran menos activos que los compuestos originales (Surco-Laos *et al.*, 2012). En estudios recientes con quercetina hemos podido también demostrar que la glicosilación de flavonoides influye profundamente en la incorporación, transformación y efectos en la longevidad de *C. elegans* (Dueñas *et al.*, 2013). La capacidad biotransformadora podría estar también determinada por la edad del gusano, siendo diferente en larvas que en adultos. Todos esos aspectos deben contribuir a la intensidad y tipo de efectos

producidos por la EC y otros flavonoides en *C. elegans* y podrían también determinar los mecanismos por los que esos efectos son inducidos. Son necesarios más estudios utilizando otras aproximaciones experimentales (p.ej., estudios transcriptómicos y/o con individuos mutantes) para poder profundizar en los mecanismos moleculares a través de los cuales actúa la EC y los flavonoides en general, para intentar explicar los procesos que contribuyen a los efectos antioxidantes de los flavonoides *in vivo*.

CONCLUSIONES

5.CONCLUSIONES

1) Se evaluó el efecto de quercetina, catequina y epicatequina y de diversos metabolitos conjugados de las mismas sobre tres líneas celulares cancerosas de páncreas, colon y mama (MCF-7, BxPC-3 y Caco-2). A la concentración ensayada (100 μ M), la quercetina fue el compuesto con mayor actividad antiproliferativa en todas las líneas utilizadas, mientras que catequina y epicatequina no poseían actividad. En lo relativo a los metabolitos, los derivados metilados, tanto de quercetina como de epicatequina, mostraban, en general, una capacidad antiproliferativa significativa, mientras que los derivados glicosilados y sulfatados presentaban baja o nula actividad en las células ensayadas. Estas observaciones son relevantes por cuanto los metabolitos podrían encontrarse como tales en los sistemas biológicos ya que una vez formados serían estables, mientras que los glucurónidos y sulfatos son más fácilmente eliminados debido a su mayor hidrosolubilidad y también posiblemente desconjugados en algunos tejidos.

2) Se exploró la posibilidad de usar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de 8-hidroxiguanosina (8-OHdG) como marcadores de efecto para evaluar la eficacia de los flavonoides en el control del daño oxidativo en *C. elegans*.

Para la determinación de ROS se optimizó un método fluorimétrico basado en la reacción con diclorofluoresceína sobre gusanos aislados en placas de 96 pocillos. Para el análisis de 8-OHdG se ensayaron dos métodos basados respectivamente en su determinación por HPLC-MS y mediante un método ELISA.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una tendencia a la disminución en los niveles de ROS en gusanos tratados con quercetina, catequinas y sus metabolitos metilados, comparados con los controles no tratados con flavonoides, aunque los descensos no siempre eran significativos, especialmente en el caso de gusanos no sometidos a estrés.

Respecto a 8-OHdG, no se llegó a establecer la existencia de diferencias significativas en sus niveles entre gusanos tratados o no con flavonoides, tanto en situaciones de cultivo normal como bajo estrés. Una posible razón para ello podría ser la insuficiente sensibilidad de los métodos empleados para la cuantificación de sus niveles a las bajas concentraciones presentes.

En definitiva, los resultados obtenidos parecen sugerir que ni ROS ni 8-OHdG serían marcadores suficientemente precisos para establecer la eficacia de los flavonoides en el control del daño oxidativo en *C. elegans*, al menos en las condiciones experimentales y analíticas ensayadas.

3) Con el objeto de contribuir al conocimiento de los mecanismos celulares implicados en la capacidad de los flavonoides para modular el estrés oxidativo in vivo, se estudiaron las modificaciones producidas en los niveles de ROS, concentración de glutatión reducido (GSH) y actividad de enzimas antioxidantes (CAT, GPx y SOD) en *C. elegans* tratados con EC y sometidos a estrés oxidativo inducido tanto térmicamente como por vía química mediante tratamiento con juglona. Se encontró que este flavonoide aumentaba la resistencia de los gusanos en situaciones de estrés. Así, en el caso de los sometidos a estrés térmico, el tratamiento con EC resultaba en un aumento en los niveles de GSH y una disminución de las ROS, sin que se viera afectada la actividad de las enzimas antioxidantes, lo que sugería que el aumento inducido en el nivel de GSH intracelular era suficiente para contrarrestar el estrés

producido por la alta temperatura. En el caso de estrés oxidativo inducido químicamente, la exposición a EC también aumentaba la resistencia de los gusanos, aunque en este caso la reducción en los niveles de ROS se veía acompañada de un aumento tanto en los de GSH como en la actividad de enzimas antioxidantes.

Aunque los estudios realizados no permiten concluir sobre cuáles serían los mecanismos moleculares implicados en el efecto antioxidante de EC, parece claro que este flavonoide es capaz de modular las variables relacionadas con los procesos redox en *C. elegans*. Los efectos producidos podrían, sin embargo, variar en función del tipo de estrés, la edad de los individuos y/o los procesos implicados en la captación y biotransformación del flavonoide. Son, por tanto, necesarios más estudios utilizando otras aproximaciones experimentales (p.ej., estudios transcriptómicos y/o con individuos mutantes) para poder profundizar en los mecanismos moleculares a través de los cuales actúa la EC, y los flavonoides en general, con vistas a intentar explicar los procesos que contribuyen a los efectos antioxidantes de los flavonoides *in vivo*.

REFERENCIAS

- Abbas S y Wink M. 2009. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* 75: 216–221.
- Adachi S, Nagao T, Ingolfsson HI, Maxfield FR, Andersen OS, Kopelovich L, Weinstein IB. 2007. The inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on activation of the epidermal growth factor receptor is associated with altered lipid order in HT29 colon cancer cells. *Cancer Res.* 67: 6493–6501.
- Adachi H, Fujiwara Y, Ishii N. 1998. Effects of oxygen on protein carbonyl and aging in *Caenorhabditis elegans* mutants with long (*age-1*) and short (*mev-1*) life spans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 53: B240-244
- Aebi HE. Catalase. En *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed.; Bergmeyer, J., Grossl, M., Eds.; VCH: Weinheim, Germany, 1987; Vol. 3, pp 273–286
- Alia M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L. 2005. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxic.* 19: 119–128.
- Alia M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. 2006a. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212:110–118.
- Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. 2006b. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur. J. Nutr.* 45: 19-28.
- An JH y Blackwell TK. 2003. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev.* 17: 1882–1893.
- Andersen ØM y MarkhamKR. 2006. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. (Boca Raton, FL: CRC Taylor & Francis).

- Arts IC y Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 317S-325S.
- Arts IC, Jacobs DR Jr, Harnack LJ, Gross M, Folsom AR. 2001. Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women. *Epidemiology.* 12: 668-675.
- Aura AM, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, Santos-Buelga C. 2005. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.* 44: 133-142.
- Álvarez-Suárez JM, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, *et al.*, 2014. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *J. Nutr. Biochem.* 25: 289-94
- Awad HM, Boersma MG, Boeren S, Vervoort J, van Bladeren PJ, Rietjens IMCM. 2002. The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chem. Res. Toxicol.* 15:3 43-51.
- Ayyadevara S, Alla R, Thaden JJ, and Shmookler Reis RJ. 2008. Remarkable longevity and stress resistance of nematode PI3K-null mutants. *Aging Cell.* 7: 13-22.
- Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. 2001. Absorption and urinary excretion of (-)-epicatechin after administration of different levels of cocoa powder or (-)-epicatechin in rats. *J. Agric. Food Chem.* 6050-6056.
- Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. 2001. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16 α -hydroxylation of 17 β -estradiol. *Metabolism.* 50: 1001-1003.
- Bahia PK, Rattray M, Williams RJ. 2008. Dietary flavonoid (-) epicatechin stimulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent anti-oxidant

- response element activity and up-regulates glutathione in cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 106: 2194–2204.
- Ballif BA y Blenis J. 2001. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.* 12: 397-408.
- Barja G y Herrero A. 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J* 14: 312-318.
- Barsyte D, Lovejoy DA, Lithgow GJ. 2001. Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 15: 627–634.
- Barth S, Faehndrich C, Bub A, Watzl B, Will F, Dietrich H, Rechkemmer G, Briviba K. 2007. Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. *J. Agric. Food Chem.* 55: 1181–1187.
- Barzilai A y Melamed E. 2003. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.* 9: 126-132.
- Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. 2000. The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: Involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J. Neurochem.* 74: 2268-2277.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333.

- Benner J, Daniel H, Spanier B. 2011 Glutathione peroxidase, intracellular peptidases and the tor complexes regulate peptide transporter PEPT-1 in *C. elegans*, PLoS ONE, vol. 6, no. 9, Article ID e25624.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61:882–888.
- Boersma MG, Van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NH, Van Iersel ML, van Bladeren PJ, Rietjens IM. 2002. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 15:662–670.
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* 125: 811–826.
- Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB, 2006. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: The Kame Project. *Am. J. Med.* 119: 751-759.
- Boveris A y Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716.
- Braugher J M, Burton P S, Chase R L, Pregoner J F, Jacobsen E J, Van Doornik F J, *et al.* 1988. Novel membrane localized iron chelators as inhibitors of irondependent lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 37: 3853-3860.
- Bruskov VI, Malakhova LV, Masalimov ZK, Chernikov AV. 2002. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res.* 30, 1354–1363.
- Brys K, Vanfleteren JR, Braeckman BP. 2007. Testing the rateof-living=oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol.* 42: 845–851.
- Büchter C, Ackermann D, Havermann S, Honnen S, Chovolou Y, Fritz G, Kampkötter A, Wätjen W. 2013. Myricetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. *Int. J. Mol. Sci.* 14:11914.

- Cabreiro F, Ackerman D, Doonan R, Araiz C, Back P, Papp D, Braeckman BP, Gems D. 2011. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 51: 1575–1582.
- Cao K, Stack DE, Ramanathan R, Gross ML, Rogan EG, Cavalieri EL. 1998. Synthesis and structure elucidation of estrogen quinines conjugated with cysteine, N-acetylcysteine, and glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 909–916.
- Cardellach F y Miró O. 2004. Papel de la mitocondria en el proceso de envejecimiento. *Clin. Invest. Arterioscl.* 16: 29-37
- Casagrande F y Darbon JM. 2001. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1205–15.
- Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, *et al.* 1997. Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3, 4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 10937–10942.
- Chabert P, Auger C, Pincemail J, Schini-Kerth VB. Overview of Plant-Derived Antioxidants. In, *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* (I. Laher, ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2014, pp. 4005-4022
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 13: 2165–70.
- Checkoway H, Powers K, Smith-Weller T, Franklin GM, Longstreth WT Jr, Swanson PD. 2002. Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *Am. J. Epidemiol.* 155: 732-738.
- Chen G y Chen X. 2003. Arginine residues in the active site of human phenol sulfotransferase (SULT1A1). *J. Biol. Chem.* 278: 36358–36364.

- Chen W, Sudji IR, Wang E, Joubert E Van, Wyk B E, Wink M. 2013. Ameliorative effect of aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on acute oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine*. 20: 380–386.
- Chen XL y Kunsch C. 2004. Induction of Cytoprotective Genes Through Nrf2 / Antioxidant Response Element Pathway: A New Therapeutic Approach for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Curr. Pharm. Des.* 108: 79–891.
- Chen YH, Yeh CW, Lo HC, Su SL, Hseu YC, Hsu LS. 2012. Generation of reactive oxygen species mediates butein-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncol. Rep.* 27: 1233–1237
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G–T and A–C substitutions. *J. Biol. Chem.* 267: 166–72.
- Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, *et al.* 2001. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int. J. Oncol.* 19: 837–44.
- Cirico TL y Omaye ST. 2006. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxicol.* 44: 510–6.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF. 2000. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 357–363.
- Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol. Aspects Med.* 31: 446–467.
- Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. 1997. Quantitative analysis of the flavonol content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *J. Agric. Food Chem.* 43: 590–595

- Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JI. 2003. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J. Clin. Invest.* 111: 1057-64.
- Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB. 2006. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: The Kame Project. *Am. J. Med.* 119: 751-759.
- Datla KP, Christidou M, Widmer WW, Rooprai HK, Dexter DT. 2001. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport.* 12: 3871-3875.
- Day AJ y Williamson G. 2001. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br. J. Nutr.* 86: 105-110.
- Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. 2000. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 468: 166-170.
- Day AJ y Morgan MRA. 2003. Methods of polyphenols extraction from biological fluids and tissues. En Santos-Buelga and G Williamson (eds.), *Methods in polyphenols analysis*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, pp.17-47.
- Del Rio D, Borges G, Crozier A. 2010. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br. J. Nutr.* 104: S67-S90.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. 2013. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Sign.* 18: 1818-1892.

- Desch S, Schmidt J, Kobler D, Sonnabend M, Eitel I, *et al.* 2010. Effect of cocoa products on blood pressure: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Hypertens.* 23: 97-103.
- Dietrich CG, Geier A, Elferink RPO. 2003. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut.* 52: 1788–1795.
- Dikalov S I, Harrison D G. 2014. Methods for detection of mitochondrial and cellular Reactive oxygen species *Antioxid. Redox Sign.* 20: 72-382
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, *et al.* 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 908–13.
- Dix T A y Aikens J. 1993. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 2-18.
- Dizdaroglu M. 1993. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 315: 1–6
- Dolara P, Luceri C, de Filippo C, Femia A, Giovannelli L, *et al.* 2005. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat. Res.* 59: 237 –246.
- Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, *et al.* 2001. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats *J. Nutr.* 131: 1753–1757.
- Donovan JL, Luthria D L, Stremple P, Waterhouse A L. 1999. Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'- and 4'-O-methylated analogs. A comparison of sensitive methods. *J. Chromatogr.* 726: 277–283.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.

- Dueñas M, González-Manzano S, González-Paramás A, Santos-Buelga C. 2010. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 443–449.
- Dueñas M, Gonzalez-Manzano S, Surco-Laos F, Gonzalez-Paramas AM, Santos-Buelga C. 2012. Characterization of sulfated quercetin and epicatechin metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 60: 2322–2327.
- Dueñas M, Mingo-Chornet H, Pérez-Alonso JJ, Paola-Naranjo R, González-Paramás AM, Santos-Buelga C. 2008. Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. *Eur. Food Res. Technol.* 227: 1069–1076.
- Dueñas M, Surco-Laos F, González-Manzano S, González-Paramas AM, Santos-Buelga C. 2011. Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *Eur. Food Res. Technol.* 232: 1103–1111.
- Dueñas M, Surco-Laos F, Gonzalez-Manzano S, Gonzalez-Paramas AM, Gomez-Orte E, *et al.* 2013. Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol. Res.* 76: 41-48.
- Ďuračková Z.. Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. En: Laher I, editor. *Systems biology of free radicals and antioxidants*. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag; 2014. p. 3-38.
- Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM. 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* 13: 79–106.
- Eggler AL, Gay KA, Mesecar AD. 2008. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: Induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: S84–S94.

- Erexson GL, Wilmer JL, y Kligerman AD. 1985. Sister chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to benzene and its metabolites in vitro. *Cancer Res.* 45: 2471-2477.
- Fan R, Wang D, Ramage R, She J. 2012. Fast and simultaneous determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and ten monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 25: 491-9.
- Fernandes I, Faria A, Azevedo J, Soares S, Calhau C, *et al.* 2010. Influence of anthocyanins, derivative pigments and other catechol and pyrogallol-type phenolics on breast cancer cell proliferation. *J. Agric. Food Chem.* 58: 3785–3792.
- Fernández-Pérez F, Belchí-Navarro S, Almagro L, Bru R, Pedreño MA, Gómez-Ros LV. 2012. Cytotoxic effect of natural trans-resveratrol obtained from elicited *Vitis vinifera* cell cultures on three cancer cell lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67: 422–429.
- Finkel T, Holbrook N J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature.* 408: 239–247.
- Fraga CG, Oteiza PI. 2011. Dietary flavonoids: role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biol. Med.* 51: 813–823.
- Frank J, Budek A, Lundh T, Parker RS, Swanson JE, *et al.* 2006. Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha-tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation in vitro. *J. Lipid Res.* 47: 2718–2725.
- Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science.* 4359: 875–880,
- Fridovich I 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97–112.
- Friedman DB y Johnson TE. 1988. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118: 75–86.

- Galati EM, Monforte MT, TripodoMM, d'Aquino A, and Mondello MR. 2001. Antiulcer activity of *Opuntia ficus-indica* L. Mill. Cactaceae: ultrastructural study. *J. Ethnopharmacol.* 76 :1-9.
- Galey JB. 1997. Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv Pharmacol.* 38: 167–203.
- Galindo P, Rodriguez-Gómez I, González-Manzano S, Dueñas M, Jiménez R, *et al.* 2012. Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS One*, 7, e32673.
- Gee J, Hara H, Johnson I. 2002. Suppression of intestinal crypt cell proliferation and aberrant crypt foci by dietary quercetin in rats. *Nutr Cancer.* 43: 193–201.
- Gee JM, Du Pont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. 2000. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.* 130: 2765–2771.
- Gilbert J C y Sawas A H. 1983. ATPase activities and lipid peroxidation in rat cerebral cortex synaptosomes. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 263: 189-196.
- Gladyshev VN. 2014. The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxid. Redox. Signal.* 20: 727-31
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. 2006. Nf-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72: 1493-1505.
- Goldbohm R, Hertog M, Brants H, van Poppel G, van den Brandt P. 1996. Consumption of black tea and cancer risk: A prospective cohort study, *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 93–100.
- Gómez-Guzman M, Jimenez R, Sanchez M, Zarzuelo MJ, Galindo P, Quintela AM, *et al.* 2012. Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. *Free Radical Biol. Med.* 52: 70–79.

- González-Manzano S, González-Paramas AM, Santos-Buelga C, Dueñas M. 2009. Preparation and characterization of catechin sulfates, glucuronides, and methylethers with metabolic interest. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1231–1238.
- González-Manzano S, González-Paramás AM, Delgado L, Patianna S, Surco-Laos F, *et al.* 2012. Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. *J Agric. Food Chem.* 60: 8911-6.
- Goss F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A, Fischer B, *et al.* 2005. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis, *Carcinogenesis* 26: 1291–1295.
- Goya L, Mateos R, Bravo L. 2007. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells—protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur. J. Nutr.* 46: 70–78.
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. 2006. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Nutr.* 136: 2715–2721.
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Haegeman G, Goya L, Bravo L, Ramos S. 2010. Epicatechin induces NF- κ B, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *Br. J. Nutr.* 103: 168–79.
- Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C. 2005. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension.* 46: 398-405.

- Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 757–766.
- Grünz G, Haas K, Soukup S, Klingenspor M, Kulling SE, *et al.* 2012. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 133: 1–10.
- Guarente L, Kenyon C. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature.* 408: 255-262.
- Gupta S, Ahmad N, Nieminen AL, Mukhtar H. 2000. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164: 82–90.
- Gutierrez-Zepeda A, Santell R, Wu Z, Brown M, Wu Y, *et al.* 2005. Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *BMC Neuroscience.* 6: 54.
- Hamanaka RB, Chandel NS. 2010. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci.* 35: 505-513.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Third ed. Oxford: Oxford University Press; 1998.
- Halliwell B. 2000. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr.* 72: 1082-1087.

- Halliwell B. 2003. Oxidative stress in cell culture: an underappreciated problem? *FEBS Lett.* 540: 3-6.
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141: 312-22
- Halliwell B. 2008 Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 76(2): 107-112
- Halliwell B. 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32: 125–130.
- Hanahan, D, Weinberg R A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.
- Harri M, Kasai H, Mori T, Tornaesus J, Savela K, Peltonen K. 2007. Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine using high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 15: 242-246.
- Haslam E, Lilley TH, Cai Y, Martin R, Magnolato D. 1989. *Planta Med.* 55: 1-8.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J. Nutr Biochem.* 13: 572–584.
- Hernández I, Alegre L, van Breusegem F, Munné-Bosch S. 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends. Plant. Sci.* 14: 125–532.
- Herrero A, Barja G. 2000. Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32: 609-615.
- Hertog MG, Feskens E J, Hollman P C, Katan MB, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 342: 1007–1011.

- Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. 1997. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*. 349: 699.
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 41: 2379-2383.
- Hidalgo M, Sánchez -Moreno C, de Pascual-Teresa S. 2010. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem.* 121: 691–696.
- Ho YC, Yang SF, Peng CY, Chou MY, Chang YC. 2007. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *J. Oral Pathol. Med.* 36: 588–593.
- Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, Serafini M, Scalbert A, Sies H, Vidry S. 2011. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J. Nutr.* 141: 989s–1009s.
- Honda Y, Honda S. 1999. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal*. 13: 1385–1393.
- Honda Y, Tanaka M, Honda S. 2008. Modulation of longevity and diapause by redox regulation mechanisms under the insulin-like signaling control in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 43: 520–529.
- Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS. 2002. Stability, cellular uptake, biotransformation and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 62: 7241–7246.
- Hong YJ, Mitchell AE. 2006. Identification of glutathione-related quercetin metabolites in humans. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 1525–1532.

- Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn J S, Harvey I, *et al.* 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 88: 38–50.
- Hope IA. En: *C. elegans* A Practical Approach. Ed Ian A. Hope. School of Biology University of Leeds Oxford 1999.
- Horvitz H R. 2004. Genetic control of nematode development and behavior (online) <http://www.hhmi.org/research/investigators/horvitz.html>. 12/2008. disponible
- Houthoofd K, Braeckman BP, Johnson TE, Vanfleteren, JR. 2003. Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 38: 947–954.
- Hsieh CY, Santoli R, Haslam S, Helferich W. 1998. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptorpositive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 58: 3833–3838.
- Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. 2004. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagenstimulated platelet activation pathway in humans. *J. Thromb. Haemost.* 2: 2138–2145.
- Inanami O, Watanabe Y, Syuto B, Nakano M, Tsuji M, Kuwabara M. 1998. Oral administration of (-)-catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. *Free Radic. Res.* 29: 359-365.
- Ishii N, Goto S, Hartman PS. 2002. Protein oxidation during aging of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biol. Med.* 33: 1021–1025.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13: 76–86.
- Jaiswal AK. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1199–1207.

- Johnson TE, de Castro E, Hegi de Castro S, Cypser J, Henderson S, Tedesco P. 2001. Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 36: 1609–1617.
- Jones DJL, Jukes-Jones R, Verschoyle RD, Farmer PB, Gescher A, Bioorg A. 2005. A synthetic approach to the generation of quercetin sulfates and the detection of quercetin 3'-O-sulfate as a urinary metabolite in the rat. *Med. Chem.* 13: 6727–6731.
- Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH. 2000. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1651–1656.
- Juadjur A, Mohn C, Schantz M, Baum M, Winterhalter P, Richling E. 2015. Fractionation of an anthocyanin-rich bilberry extract and in vitro antioxidative activity testing. *Food Chem.* 167: 418-424
- Jung WW. 2014. Protective effect of apigenin against oxidative stress-induced damage in osteoblastic cells. *Int. J. Mol. Med.* 33: 1327-1334.
- Kaletsky R, Murphy CT. 2010. The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging. *DMM.* 3: 415–419.
- Kalt W, Blumberg JB, McDonaldJE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SA, *et al.* 2008. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J. Agric. Food Chem.* 56: 705-712.
- Kampkötter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, *et al.* 2007a. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology.* 234: 113–123.
- Kampkötter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, *et al.* 2007b. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on

- thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. Arch. Toxicol. 81: 849–858.
- Kampkötter A, Timpel C, Zurawski RF, Ruh S, Chovolou Y, *et al.* 2008. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. Comp. Biochem. Phys. B. 149: 314–323.
- Kanazawa K, Uehara M, Yanagitani H, Hashimoto T. 2006. Bioavailable flavonoids to suppress the formation of 8OHdG in HepG2 cells. Arch. Biochem. Biophys. 455: 197-203.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. 2009 Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 471: 304-309.
- Kawasaki I, Jeong MH, Oh BK, Shim YH. 2010. Apigenin inhibits larval growth of *Caenorhabditis elegans* through DAF-16 activation. FEBS Lett. 584: 3587–3591.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47: 89–116.
- Kerstin V, Robin CM. 2010. Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. Eukaryotic Cell. 9: 835–846.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. 1997. Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. Science. 277: 942–946.
- Kirkwood TB, Kowald A. 2012. The free-radical theory of ageing—older, wiser and stillalive: modelling positiona effects of the primary targets of ROS reveals new support. Bioessays. 34: 692–700.
- Koc A, Gasch AP, Rutherford JC, Kim HY, Gladyshev VN. 2004. Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and –independent components of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 7999–8004.

- Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, T. Primiano. 2000. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch. Pharmacol. Res.* 23: 1–16.
- Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, *et al.* 2004. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 15–21.
- Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, *et al.* 2006. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: The Ohsaki study. *JAMA.* 296: 1255-1265.
- Kuskoski EM. 2004. Activity Antioxidant of antocyanin pigment. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos.* 24: 691-693.
- Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. 2002. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol. Cell Biol.* 22: 2883–2892.
- Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H. 2006. Constitutive overexpression of NRF2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J. Biol. Chem.* 281: 33761–33772.
- Larsen PL. 1993. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90: 8905–8909.
- Labuschagne CF, Brenkman AB. 2013. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Ageing Res Rev.* 12: 918-930
- Leávy G, Ross D, Bodell WJ. 1993. Peroxidase activation of hydroquinone results in the formation of DNA adducts in HL-60 cells, mouse bone marrow macrophages and human bone marrow. *Carcinogenesis* 14: 2329-2334.

- Lee JM, Johnson JA. 2004. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37: 139-143.
- Lee JS y Surh YJ. 2005. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* 224: 171-184.
- Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC. 2002. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease. *Biochem. Pharmacol.* 63: 225–236.
- Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. 2002. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* 106: 1614-1617.
- Lemańska K, van der Woude H, Szymusiak H, Boersma MG, Gliszczyńska-Swigło A, *et al.* 2004. The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin--a mechanistic insight. *Free Radical Res.* 38: 639–647.
- Li Y, Duan S, Jia H, Bai C, Zhang L, Wang Z. 2014. Flavonoids from tartary buckwheat induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 46: 460-470
- Lithgow GJ, White TM, Melov S, y Johnson TE. 1995. Thermotolerance and extended life-span conferred by single gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7540–7544.
- Liu J, Chen S, Lin C, Tsai S, Liang Y. 2001. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice, *J. Cell. Biochem.* 83: 631–642.
- Li GX, Chen YK, Hou Z, Xiao H, Jin H, *et al.* 2010. Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro. *Carcinogenesis.* 31: 902-910.

- Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Dusterhoft T, *et al.* 2004. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J. Biol. Chem.* 279: 6190-6195.
- Lue JM, Lin PH, Yao Q Z, Chen CY. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell Mol. Med.* 14: 840-860.
- Magielse J, Verlaet A, Breynaert A, Keenoy BM, Apers S, *et al.* 2014. Investigation of the in vivo antioxidative activity of *Cynara scolymus* (artichoke) leaf extract in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Mol. Nutr. Food Res.* 58: 211-215.
- Maher P, Akaishi T, Abe K. 2006. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 16568-16573.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727-747.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 230S-242S.
- Manson M. 2003. Cancer prevention: the potential for diet to modulate molecular signaling. *Trends. Mol. Med.* 9: 11-18.
- Marchand LL, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. 2000. Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 154-160.
- Margis R, Dunand, Teixeira F K, and Margis-Pinheiro M. 2008. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview,” *The FEBS Journal.* 275: 3959-3970.

- Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antiox. Redox. Sign.* 11: 2685–2700.
- Martin MA, Ramos S, Mateos R, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, Goya L. 2010. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by the flavonoid epicatechin. *Phytother. Res.* 24: 503–509.
- Martin MA, Ramos S, Mateos R, Serrano-Granado ABG, Izquierdo-Pulido M, *et al.* 2008. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J. Agric. Food Chem.* 56: 7765–7772.
- Martorell P, Forment JV, de Llanos R, Montón F, Llopis S, *et al.* 2011. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* 59: 2077–2085.
- Mayne ST, 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 3: 933S-940S.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 244: 6056-6063.
- Meia Y, Weib D, Liu J. 2005. Modulation effect of tea polyphenol toward N-methyl-N9-nitro-N-nitrosoguanidine-induced precancerous gastric lesion in rats. *J. Nutr. Biochem.* 16: 172–177.
- Meister A, Tate SS. 1976. Glutathione and related gammaglutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 559-604.
- Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, *et al.* 2000. Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics. *Science.* 289: 1567-1569.

- Menéndez C, Dueñas M, Galindo P, González-Manzano S, Jimenez R, *et al.* 2011. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Mol.Nutr. Food Res.* 55: 1780–1790.
- Miller NJ, Rice-Evans CA. 1997. The relative contribution of ascorbic and phenolic antioxidants to the total antioxidants activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.* 60: 331-337.
- Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, *et al.* 2007. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: A prospective study in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 895-909.
- Miquel J, Economos A C, Fleming J, Johnson J E. 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 15: 575-591.
- Miquel J. Integración de teorías del envejecimiento. 2006. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 41: 55-63.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, *et al.* 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 757-66.
- Moran J F, Klucas R V, Grayer R J, Abian J, Becana M. 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 861-870.
- Moridani MY, Pourahmad J, Bui H, Siraki A, O'Brien PJ. 2003. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 243-253.
- Morimoto K, Wolff S. 1980. Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res.* 40: 1189-1193.
- Morris JZ, Tissenbaum HA, y Ruvkun GA 1996. Phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 382: 536–539.

- Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MCW, Blomhoff R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 277S–283S.
- Muller F L, Liu Y, Abdul-Ghani M A, Lustgarten M S, Bhattacharya A, *et al.* 2000. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship. *Jpn J. Cancer Res.* 91: 686-691.
- Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y, Yoshida H. 2002. Effect of tea catechins on cellular lipid peroxidation and cytotoxicity in HepG2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1559–1562.
- Murakami S, Johnson TE. 1996. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 143: 1207–1218.
- Murphy C.T., Hu P.J. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans* (December 26, 2013), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.164.1, <http://www.wormbook.org>.
- Mutoh T, Joad J P, Bonham AC. 2000. Chronic passive cigarette smoke exposure augments bronchopulmonary C- fibre inputs to nucleus tractus solitarii neurones and reflex output in young guinea-pigs. *Physiol.* 523: 223-233.
- Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO. 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biol. Med.* 32: 386–393.
- Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, Ikegami Y, Hayasaka S, *et al.* 2001. Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 827–832.
- Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, *et al.* 2003. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral

- ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 840- 849.
- Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. 2005. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J. Biol. Chem.* 280: 16456-16460.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. 2003. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element: degradation of Nrf2 by the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* 278: 4536–4541.
- Nicholson KM Anderson NG. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 14: 381-395.
- Nijhoff WA, Groen GM, Peters WH. 1993. Induction of rat hepatic and intestinal glutathione S-transferases and glutathione by dietary naturally occurring anticarcinogens. *Int. J. Oncol.* 3: 1131–1139.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 418-425.
- Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2003. Identification of a novel Nrf2- regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem. J.* 374: 337–348.
- Nussbaum RL, Ellis CE. 2003. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 348: 1356-1364.
- Oikawa S, Furukawa A, Asada H, Hirakawa K, Kawanishi S. 2003. Catechins induce oxidative damage to cellular and isolated dna through the generation of reactive oxygen species. *Free Radical Res.* 37: 881-890.
- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. 2003. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase,

- catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 65: 479–491.
- Pasqualini JR, Chetrite GS. 2005. Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93: 221–236.
- Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. 2005. Fast access of some grape pigments to the brain. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7029-7034.
- Patel R y Maru G. 2008. Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. *Free Radic. Biol. Med.* 44: 1897-1911.
- Pedret A, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Catalán Ú, Romeu M, *et al.*, 2012. Polyphenol-rich foods exhibit DNA antioxidative properties and protect the glutathione system in healthy subjects. *Mol. Nutr. Food. Res.* 56: 1025-1033
- Pérez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, *et al.* 2009. Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim. Biophys. Acta.* 1790: 1005-1014.
- Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Santos-Buelga C. 2012. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J. Sc.i Food Agric.* 92: 1822-1825.
- Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, *et al.* 2003. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 31, 805–813.
- Pietsch K, Saul N, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CEW. 2009. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology.* 10: 565–578.
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63: 1035–1042.

- Porath D, Riegger C, Drewe J, Schwager J, J. 2005. Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines. *Pharmacol. Exp. Ther.* 315: 1172–1180.
- Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, *et al.* 2007. Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 104: 329-334.
- Queralt M, 2014. <http://www.mapfre.es/salud/es/cinformativo/definicion-envejecimiento.shtml>
- Ramírez-Tortosa C, Andersen OM, Gardner PT, Morrice PC, Wood SG, *et al.* 2001. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. *Free Radical Biol. Med.* 9: 1033-1037.
- Ramos S, Rodríguez-Ramiro I, Martín MA, Goya L, Bravo L. 2011. Dietary flavanols exert different effects on antioxidant defenses and apoptosis/proliferation in Caco-2 and SW480 colon cancer cells. *Toxicol. In Vitro.* 25: 1771-81.
- Ramos S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* 18: 427–442.
- Ramos S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 507-526.
- Ravanat JL. 2005. Measuring oxidized DNA lesions as biomarkers of oxidative stress: An analytical challenge. *FABAD J. Pharm. Sci.* 30: 100-113.
- Ray PD, Huang B-W, Tsuji. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 24: 981–990.
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 220–235.

- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. 2000. Epicatechin in human plasma: In vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J. Nutr.* 130: 2109-2114.
- Requena T, Monagas M, Pozo-Bayón MA, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B, *et al.*, 2010. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends Food Sci. Techn.* 21: 332-344.
- Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. 2005. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via posttranslational modification. *Antioxid. Redox Sign.* 7: 619-626.
- Rhee SG. 2006. Cell signalling. H₂O₂, a necessary evil for cell signalling. *Science.* 312: 1882-1883.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure antioxidant activity relationship of flavonoides and phenolic acids. *Free Radicals Biol. Med.* 20: 933-956.
- Rodríguez-Ramiro I, Martín MA, Ramos S, Bravo L, Goya L. 2011. Comparative effects of dietary flavanols on antioxidant defences and their response to oxidant-induced stress on Caco2 cells. *Eur. J. Nutr.* 50: 313-322.
- Rong Y, Yang EB, Zhang K, Mack P. 2000. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res.* 20: 4339-4345.
- Ruotolo R, Calani L, Fietta E, Brighenti F, Crozier A, *et al.* 2013. Anti-estrogenic activity of a human resveratrol metabolite. *Metab. Cardiovasc. Dis.* 23: 1086-1092.
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 266: 11632-11639.

- Saeki K, Hayakawa S, Isemura M, Miyase T. 2000. Importance of a pyrogallol-type structure in catechin compounds for apoptosis-inducing activity. *Phytochemistry*. 53: 391–394.
- Sah JF, Balasubramanian S, Eckert RL, Rorke EA. 2004. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *Biol. Chem.* 279: 12755–12762.
- Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R, Vannini V. 2002. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). *Br. J. Cancer*. 86: 1645–1651.
- Sanders R A, Rauscher FM, Watkins JB. 2000. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15: 143-149.
- Sang S, Lambert JD, Ho CT, Yang SC. 2011. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol. Res.* 64: 87– 99
- Santella RM. 1999. Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8: 733–739.
- Santos-Buelga C, González-Paramás AM. 2014. Strategies in the Analysis of Plant Flavonoids. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 1–25.
- Saul N, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW. 2008. Quercetin mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? *Mech. Ageing Dev.* 129: 611–613.
- Saul N, Pietsch K, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CEW. 2009. Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma. *Mech. Ageing Dev.* 130: 477–486.
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085

- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Technol.* 45: 287–306.
- Scharf G, Prustomersky S, Knasmuller S, Schulte-Hermann R, Huber WW. 2003. Enhancement of glutathione and gamma-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutr. Cancer.* 45: 74–83.
- Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. 2001. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J.* 358: 547-557.
- Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf FI, Cittadini A. 2001. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 496: 171-180.
- Seifried H E, Anderson D E, Fisher E I, Milner J A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* 18: 567–579.
- Sena LA y Chandel NS. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell.* 48: 158–167.
- Senderowicz AM. 1999. Flavopiridol. The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs.* 17: 313–320.
- Sesink A, Arts I, De Boer V, Breedveld P, Schellens J, *et al.* 2005. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol. Pharmacol.* 67: 1999–2006.
- Shan Q, Lu J, Zheng Y, Li J, Zhou Z, *et al.* 2009. Purple Sweet Potato Color Ameliorates Cognition Deficits and Attenuates Oxidative Damage and

- Inflammation in Aging Mouse Brain Induced by D-Galactose. *J. Biomed. Biotechnol.* 564-737.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman A. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 349: 431-434.
- Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, Asim M, Hafeez BB, *et al.* 2008. Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene.* 27: 2055–2063.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, *et al.* 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107–1112.
- Sohal RS, Orr WC. 2012. The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med.* 52: 539-555
- Sperker B, Backman JT, Kroemer HK. 1997. The role of β -glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin Pharmacokinet.* 33:18–31. Stadtman ER. 1992. Protein oxidation and aging. *Science.* 257: 1220–1224.
- Stalmach A, Mullen W, Steiling H, Williamson G, Lean MEJ, Crozier A. 2010. Absorption, metabolism, and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *Mol. Nutr. Food Res.* 54: 323–334.
- Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. 1999. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 100: 1050-1055.
- Strayer A, Wu Z, Christen Y, Link C D and Luo Y. 2003. Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761. *The FASEB Journal* 17: 2305–2307.

- Sugisawa A, Umegaki K 2002. Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. *J. Nutr.* 132: 1836–1839.
- Sunagawa T, Shimizu T, Kanda T, Motoyuki Tagashira M, *et al.* 2011. Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* 77: 122–127.
- Surco-Laos F, Cabello J, Gómez-Orte E, González-Manzano S, González-Paramás AM, *et al.* 2011. Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct.* 2: 445–456.
- Surco-Laos F, Dueñas M, González-Manzano S, Cabello J, Santos-Buelga C, González-Paramás, AM. 2012. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Res. Int.* 46: 514–521.
- Surh YJ. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, *Nat. Rev. Cancer.* 3: 768–780.
- Tanaka T, Makita H, Ohnishi M. 1997. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res.* 57: 246–252.
- Tang SY, Halliwell B. 2010. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394: 1–5.
- Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. 2007. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 1690–1703.
- Taubert DRoesen R Schomig E. 2007. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: A meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* 167: 626–634.

- The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 1998, 282: 2012–2018.
- Torres JL, Lozano C, Maher P. 2005. Conjugation of catechins with cysteine generates antioxidant compounds with enhanced neuroprotective activity. *Phytochemistry*. 66: 2032–2037.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NRD, Huang P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signaling*. 10: 1343–1374.
- Tsubono Y, Nishino Y, Komatsu S, Hsieh C, Kanemura S, *et al.* 2001. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan, *N. Engl. J. Med.* 344: 632–636.
- Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV. 1994. Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochim Biophys Acta*. 1205: 325–335.
- Tullet JMA, Hertweck M, An J H Baker J, Hwang JY, *et al.* 2008 Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in *C. elegans*. *Cell*. 132: 1025–1038.
- Vaidyanathan JB, Walle T. 2001. Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Res.* 18: 1420–1425.
- Valensi PE, Behar A, de Champvallins MM, Attalah M, Boulakia FC, Attali JR. 1996. Effects of a purified micronized flavonoid fraction on capillary filtration in diabetic patients. *Diabet Med.* 13: 882–888.
- Valerio LG, Kepa JK, Pickwell GV, Quattrochi, LC. 2001. Induction of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicol. Lett.* 119: 49–57.
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S. 2010. Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Casual Relationship? *Antioxid Redox Sign.* 13: 1911-1953.

- Vander LE, Roelofs HM, Nagengast FM, Peters WH. 2003. Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyl transferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. *Carcinogenesis*. 24: 1651–1656.
- Vanfleteren JR. 1993. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J*. 292: 605–608.
- Vasquez-Garzón V R, Arellanes-Robledo J, Garcia-Roman R, Aparicio-Rautista DI, Villa-Trevino S. 2009. Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. *Free Radic. Res*. 43: 128-137.
- Venugopal R, Jaiswal AK. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14960–14965.
- Vidya-Priyadarsini R, Senthil-Murugan R, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunagaran D, Nagini S. 2010. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-kB inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 649: 84–91.
- Vining-Smith J, Luo Y. 2003. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *J. Alzheimers Dis*. 5: 287–300.
- Vita JA. 2005. Polyphenols and cardiovascular disease: Effects on endothelial and platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 292-297.
- Walle T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radicals Biol. Med.* 36: 829–837.
- Walle UK, Galijatovic A, Walle T. 1999. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Pharmacol.* 58: 431–438.

- Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, ProchJ, LazarusSA, Kris-Etherton PM. 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 596-602.
- Wang H, Cao G, Prior RL. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J.Agr. and Food Chem.* 45: 304-309.
- Wang H, Joseph JA. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biol. Med.* 27: 612-616.
- Wang HK. 2000. The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opin Invest Drugs.* 9:2103-19
- Watson W, Cai J, Jones D. 2000. Diet and apoptosis. *Annu. Rev. Nutr.* 108: 153-164.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel M, Daniel H. 2000. Dietary flavones is a potent OMS: Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet No317. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> (accessed on 10 September 2009).
- Widlansky ME, Duffy SJ, Hamburg NM, Gokce N, Warden BA, *et al.* 2005. Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 499-506.
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Rad. Biol. Med.* 36: 838-849
- Williamson G, Aeberli I, Miguet L, Zhang Z, Sanchez M, *et al.* 2007. Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2). *Drug Metab. Dispos.* 35: 1262-1268.
- Williamson G, Manach C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 243-255.

- Wong CC, Akiyama Y, Abe T, Lippiat JD, Orfila C, Williamson G. 2012. Carrier-mediated transport of quercetin conjugates: involvement of organic anion transporters and organic anion transporting polypeptides. *Biochem. Pharmacol.* 84: 564–570.
- Wu ZX, Smith JV, Paramasivam V, Butko P, Khan I, Cypser JR, Luo Y. 2002. Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol. Bio.* 48: 725-731.
- Yager J D. 2000. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 27: 67–73.
- Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, *et al.* 2003. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 307: 230-236.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annu. Rev. Nutr.* 21: 381–397.
- Yang G Y, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, *et al.* 2000. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis.* 21: 2035-2039.
- Yang W, Li J, and Hekimi S A. 2007. Measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 177: 2063–2074.
- Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. 1999. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO) *Anticancer Res.* 19: 4297–4303.

- Youdim KA, Joseph J A. 2001. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 583-594.
- Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. 2004. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 592-604.
- Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54: 176-186.
- Yue J, Wang P, Liu YH, Wu JY, Chen J, Peng RX. 2007. Fast Evaluation of Oxidative DNA Damage by Liquid Chromatography- Electrospray Tandem Mass Spectrometry Coupled With Precision-cut Rat Liver Slices. *Biomed and Envir. Sci.* 20: 386-391.
- Zhang J, Lu J, Zhang Q, Dai L, Liu Y, *et al.* 2014. Simultaneous screening and identifying four categories of particular flavonoids in the leaves of *Murraya exotica* by HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Journal of Chromatographic. Science.* 52: 103-114.
- Zhang L, Jie G, Zhang J, Zhao B. 2009. Significant longevity extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radical Biol. Med.* 46: 414-421.
- Zhu BT, Liehr JG. 1996. Inhibition of catechol O-methyltransferase catalyzed O-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by quercetin. *J. Biol. Chem.* 271: 1357-1363.
- Zi X, Feyes DK, Agarwal R. 1998. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: Induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin. Cancer Res.* 4: 1055-64.
- Ziegler R G, Rossi S C, Fears T R, Bradlow H L, Adlercreutz H, *et al.* 1997. Quantifying estrogen metabolism: An evaluation of reproducibility and

validity of enzyme immunoassays for 2-hydroxyestrone and 16hydroxyestrone in urine. *Environ Health Perspect.* 105: 607–614.