



“Estudio en un modelo *in vivo* de los mecanismos de acción implicados en la actividad biológica de polifenoles.”

“Evaluation of mechanisms of action involved in the biological activity of polyphenols using an *in vivo* model.”



TRABAJO DE FIN DE GRADO  
GRADO EN BIOLOGÍA

Eva Sánchez Hernández

Julio 2017

## ***ABSTRACT***

---

Dietary flavonoids have been linked to beneficial properties for health, which has been attributed in part to their antioxidant properties as demonstrated in many in vitro studies. In the human organism most flavonoids are scarcely bioavailable and largely biotransformed to different metabolites that might contribute to the biological effects of their parent flavonoids.

3,4-Dihydroxyphenyl acetic acid (DHPAA) is a majority metabolite produced by the colonic microbiota from quercetin, one of the most abundant flavonoids in the human diet. However, little is known about the activity and mechanisms of action of DHPAA.

The aim of this work was to examine the influence of DHPAA to modulate thermally-induced oxidative stress and the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) using *Caenorhabditis elegans* as a model organism.

The obtained results pointed to DHPAA was able to increase the resistance of *C. elegans* against thermal stress at low doses, but it produced detrimental effects at higher concentrations, indicating the existence of a hormetic mechanism of action. No clear conclusions could be obtained regarding the influence of DHPAA to modulate ROS levels.

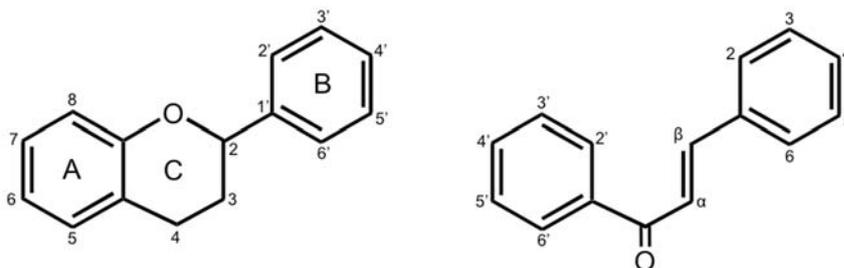
<b>A. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Flavonoides</b> .....	1
1.1. Características generales .....	1
1.2. Flavonoides en la dieta .....	3
1.3. Actividades biológicas de los flavonoles y sus efectos en la salud .....	4
1.4. Metabolismo y disponibilidad de quercetina y sus metabolitos .....	4
<b>2. <i>Caenorhabditis elegans</i></b> .....	6
2.1. Características generales .....	6
2.2. Ciclo de vida.....	7
2.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> y su importancia en investigación .....	8
<b>3. Especies reactivas de oxígeno</b> .....	9
<b>B. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>C. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
<b>1. Material biológico</b> .....	12
<b>2. Métodos</b> .....	12
2.1. Preparación de placas Petri NGM.....	12
2.2. Preparación de <i>E. coli</i> OP50 como fuente de alimento .....	12
2.3. Condiciones de cultivo de <i>C. elegans</i> .....	13
2.4. Preparación de placas para los ensayos con DHPAA .....	14
2.5. Sincronización de <i>C. elegans</i> .....	14
2.6. Ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente .....	15
2.7. Determinación de ROS .....	16
<b>D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	17
<b>1. Ensayos de estrés térmico</b> .....	17
<b>2. Niveles intracelulares de ROS</b> .....	19
<b>E. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	23
<b>F. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24

### 1. Flavonoides

#### 1.1. Características generales

Los flavonoides son el grupo más importante de compuestos fenólicos sintetizados como metabolitos secundarios en el Reino Vegetal (Harborne, 1993). Estos compuestos juegan papeles relevantes en ecofisiología vegetal, participando en procesos de protección frente a la radiación ultravioleta, pigmentación, estimulación de la fijación de nódulos de nitrógeno y mecanismos de defensa frente a estrés biótico y abiótico. Se han descrito aproximadamente 8000 flavonoides naturales (Andersen y Markham, 2006), aunque esta lista sigue aumentando.

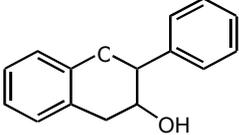
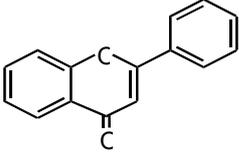
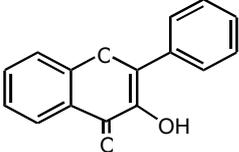
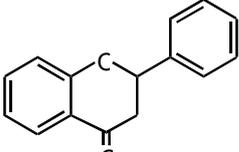
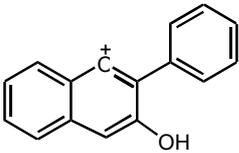
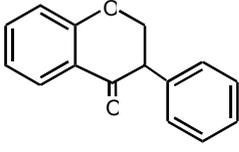
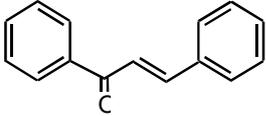
La estructura general de un flavonoide consta de dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por un esqueleto de tres átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ) que en la mayoría de clases está formando un tercer anillo heterocíclico (anillo C) (Figura 1).



**Figura 1:** Estructura básica y numeración de flavonoides: formas fenilcromano y calcona.

En función del grado de insaturación y sustituyentes del anillo C se distinguen diferentes clases de flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianos, así como las formas abiertas, calconas y dihidrocalconas (Figura 2).

## A. INTRODUCCIÓN

Clase	Esqueleto básico	Ejemplos
<b>Flavonoides (C6-C3-C6)</b>		
Flavan-3-oles		(Epi)catequina, (epi)galocatequina
Flavonas		Apigenina, luteolina, crisina, diosmetina, crisoeriol
Flavonoles		Quercetina, kaempferol, miricetina
Flavanonas		Hesperidina, naringenina, taxifolina, eriodictiol
Antocianos		Cianidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina, petunidina, peonidina
Isoflavonas		Genisteína, daidzeína, biochanina A, puerarina
Calconas		Floretina, arbutina, buteína

**Figura 2:** Estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides.

Fuente: Santos-Buelga y González-Paramás, 2016

Los distintos compuestos de cada una de las clases de flavonoides se diferencian por los sustituyentes que presentan en sus anillos aromáticos y el tipo de sustitución en los diferentes hidroxilos de la molécula.

## A. INTRODUCCIÓN

---

Generalmente, los flavonoides existen en sus medios naturales como heterósidos, a excepción de los flavan-3-oles, en los que las formas glicosiladas son raras. Normalmente se presenta como *O-glicósidos* unidos a los grupos hidroxilo en posiciones 3, 7 ó 4', y menos frecuentemente como *C-glicósidos* ligados directamente a los carbonos C<sub>6</sub> y C<sub>8</sub>. 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).

### 1.2. Flavonoides en la dieta

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y verduras comúnmente consumidas, así como en productos derivados como cacao, té o vino (Huxley *et al.*, 2003). La importancia de los flavonoides de los alimentos no está relacionada únicamente con sus implicaciones tecnológicas y propiedades organolépticas, sino que partiendo del trabajo pionero de Hertog *et al.* (1993) unido a estudios epidemiológicos y experimentales posteriores (Jaganath y Crozier, 2010), se ha descrito la existencia de una correlación directa entre el aumento en la ingesta de flavonoides con efectos beneficiosos para la salud humana, como la prevención de diversas patologías crónicas, especialmente las de tipo cardiovascular (Del Rio *et al.*, 2013).

Existen tablas de composición de alimentos donde se incluyen contenidos de flavonoides, entre las que se pueden destacar una desarrollada en Francia por el INRA ([www.phenol-explorer.eu](http://www.phenol-explorer.eu)) y otra en Estados Unidos por la USDA ([www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp)).

(Kyle y Duthie, 2006; Fraga, 2010)

- **Frutas.** Uno de los grupos de flavonoides más abundantes en las frutas son los flavonoles, siendo bayas como el arándano, particularmente ricas en quercetina. Otras bayas como las grosellas contienen niveles relevantes de kaempferol y mircetina. Los flavonoles también son abundantes en la piel de algunas frutas como es el caso del melocotón y la pera. Las bayas son también las fuentes más ricas en antocianos.
- **Hortalizas y verduras.** Las especies de hortalizas de los géneros *Allium* (p. ej., cebolla), *Brassica* (p. ej., brócoli y col), *Lactuca* (p. ej., lechuga) y *Lycopersicon* (p. ej., tomate) son abundantes fuentes de flavonoles, principalmente quercetina y kaempferol. Las especies de *Allium*, especialmente las cebollas rojas, constituyen una de las fuentes potencialmente más ricas en quercetina, con niveles del orden de hasta unos 100 mg/100g.

## A. INTRODUCCIÓN

---

- **Bebidas.** El té es una fuente importante de catequinas y sus derivados, taninos condensados. Además contiene flavonoles como quercetina, miricetina y kaempferol. También existen niveles destacados de catequinas, taninos y antocianos en el vino tinto.

### 1.3. Actividades biológicas de los flavonoles y sus efectos en la salud

Entre los flavonoides más estudiados con relación a sus efectos en el organismo se encuentran los flavonoles y, sobre todo, la quercetina, para la cual se han descrito una amplia gama de actividades biológicas tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. A continuación se exponen brevemente las principales acciones de quercetina.

Numerosos estudios han demostrado que quercetina es un potente anticarcinógeno debido a sus efectos antioxidantes (Boots *et al.*, 2008), antiproliferativos, pro-apoptóticos, sobre la señalización celular y supresión en los factores de crecimiento, así como un potencial sinergismo con algunos agentes quimioterápicos (Akan *et al.*, 2013).

La quercetina presenta efectos protectores cardiovasculares (Perez-Vizcaino y Duarte, 2010), disminuyendo los niveles de colesterol y la formación de placas ateroscleróticas. Estudios *in vitro* han constatado su actividad antiviral (Kaul *et al.*, 1985) y antibacteriana (González-Segovia *et al.*, 2008).

Este flavonol inhibe enzimas implicadas en procesos inflamatorios (Lee *et al.*, 2010), como ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX) y en la formación de cataratas diabéticas como la aldosa reductasa (Varma *et al.*, 1975).

Por último, los flavonoides presentan un elevado potencial para modular la función neuronal y prevenir la neurodegeneración (Choi *et al.*, 2012). En concreto, la quercetina protege *in vitro* las células cerebrales frente al estrés oxidativo que conduce a enfermedades como el Alzheimer (Lakhanpal y Rai, 2007).

### 1.4. Metabolismo y disponibilidad de quercetina y sus metabolitos

En los últimos años se ha incrementado el estudio del metabolismo de los flavonoides ya que es crucial para conocer aquellos que mejor se absorben, así como la formación y función de posibles metabolitos bioactivos (Marín *et al.*, 2015). Seguidamente se comentan los procesos de absorción y metabolismo de flavonoides, con particular referencia a quercetina y derivados.

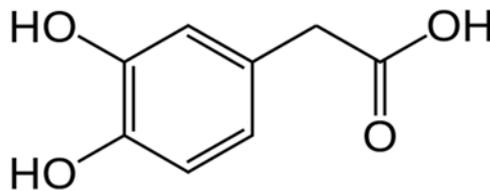
En la mayoría de los casos, sólo una pequeña proporción de los flavonoides ingeridos es absorbida en el intestino delgado, generalmente tras un proceso previo de desglicosilación. La

## A. INTRODUCCIÓN

---

hidrólisis de los glicósidos de flavonoides (formas más abundantes en los alimentos) comienza en la cavidad bucal producida por  $\beta$ -glucosidasas, enzimas procedentes de la saliva y de la microbiota oral (Requena *et al.*, 2010). Sin embargo, el principal mecanismo de desglicosilación se produce por acción enzimática a través del complejo lactasa-floricin hidrolasa (LPH), que se encuentra en las vellosidades de células epiteliales del intestino delgado (Day *et al.*, 2000). Los aglicones liberados pueden entrar en el enterocito por difusión pasiva (Day *et al.*, 2000). Algunos flavonoides, como quercetina-4'-*O*-glucósido, también pueden ser transportados al interior de las células intestinales mediante el transportador de sodio dependiente de glucosa (SGLT1), para ser posteriormente hidrolizados dentro de la célula por la  $\beta$ -glucosidasa citosólica (CBG) (Day y Morgan, 2003). Dentro del enterocito y posteriormente en el hígado, los aglicones de flavonoides sufren reacciones de conjugación (metilación, glucuronidación y sulfatación) mediante enzimas como catecol-*o*-metiltransferasa (COMT), UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) y sulfotransferasa (Boersma *et al.*, 2002). Se trata de un proceso de detoxificación metabólica que restringe los potenciales efectos tóxicos y facilita su eliminación biliar y urinaria.

Sin embargo, gran parte de los flavonoides de la dieta no son desglicosilados en el intestino delgado, entre ellos, por ejemplo, aquellos que poseen unidades de ramnosa como rutina (quercetina-3-rutinósido), por lo que continúan el tránsito hasta el colon, donde son hidrolizados por enzimas producidas por bacterias de la microflora intestinal:  $\beta$ -ramnosidasas y  $\beta$ -glucosidasas (Jaganath *et al.*, 2009). Las principales bacterias con esta actividad son: *Bacteroides uniformis*, *B. ovatus*, *Enterococcus caseiflavus* y *Eubacterium ramulus* (Simons *et al.*, 2005). La hidrólisis libera el aglicón flavonoide (p.ej., quercetina en el caso de rutina), que posteriormente es degradado por otras bacterias de la microflora que producen la escisión del anillo B, dando lugar a fenoles más simples. Entre los productos formados en el caso de quercetina y de otros flavonoides con sustituyentes *o*-difenoil en el anillo B, se han descrito, entre otros, ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DHPAA) (Figura 3), ácido 3,4-dihidroxifenil benzoico y ácido homovanílico (HVA) (Jaganath *et al.*, 2009). Estos compuestos pueden ser absorbidos en el intestino grueso, pasando a circulación sistémica, pudiendo de este modo contribuir a los efectos biológicos asociados al consumo de derivados de quercetina y otros flavonoides (Kim *et al.*, 2013). No obstante, para la mayoría de metabolitos de flavonoides producidos por la flora se desconocen los efectos en el organismo humano.



**Figura 3:** Estructura del ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DHPAA).

El DHPAA fue encontrado por primera vez en 1954 en orina de conejos tras la ingestión oral de rutina (Murray *et al.*, 1954); un estudio posterior del mismo laboratorio confirmó que correspondía a un metabolito de quercetina (Booth *et al.*, 1956). En un estudio realizado por Jaganath *et al* (2009) se evidenció que quercetina y DHPAA presentaban un elevado poder reductor, que se relacionó con la estructura 3',4'-dihidroxicatecol, por lo que podrían contribuir a mantener el estado redox en las células de la mucosa del colon. Sin embargo, sus beneficios pueden ir más allá de los efectos locales en el colon, ya que si DHPAA alcanza el sistema circulatorio presenta mayor actividad antiagregante plaquetaria que rutina o quercetina (Kim *et al.*, 1998).

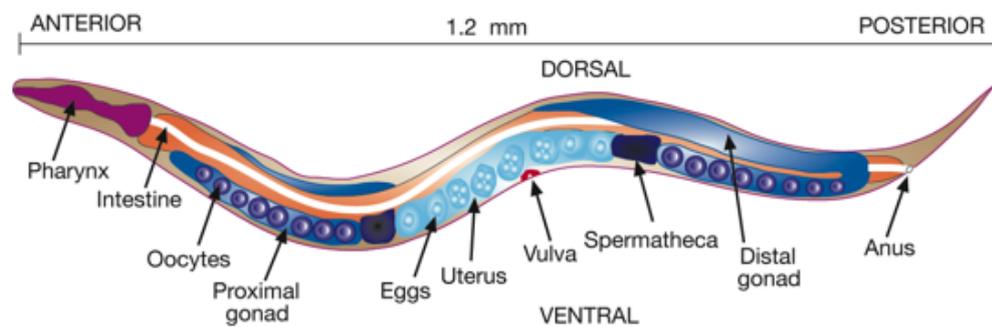
## 2. *Caenorhabditis elegans*

### 2.1. Características generales

En 1900 se describen los nematodos, vulgarmente conocidos como gusanos redondos, *Rhabditis elegans*, pertenecientes a la familia Rhabditidae. Posteriormente, su nombre fue modificado a *Caenorhabditis elegans*, como son conocidos en la actualidad. Su significado etimológico es *Caeno*: nuevo, *rhabditis*: varilla y *elegans*: bonita.

*C. elegans* (Figura 4) es un nematodo de vida libre que habita en el suelo, capaz de tolerar un amplio rango de temperaturas intermedias, se encuentra principalmente en regiones templadas. Su alimentación es a base de microorganismos, especialmente bacterias como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. Los nematodos adultos presentan un tamaño aproximado de 1 mm de longitud y 70-80  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se mueven formando ondas sinusoidales en el eje dorso-ventral. Existen dos sexos, macho (XO) y hermafrodita (XX), siendo esta última forma la más abundante (Hodgkin *et al.*, 1979). Los gusanos hermafroditas son estructuralmente femeninos y protrándricos (Wood, 1988). Se reproducen por autofecundación, obteniendo solamente hermafroditas genéticamente idénticos (Hope, 1999).

## A. INTRODUCCIÓN



**Figura 4:** Adulto hermafrodita de *C. elegans*.

Fuente: Varki *et al.*, 2009

Los gusanos macho se reproducen por fecundación cruzada, generando la misma proporción de hermafroditas y machos. Los nematodos machos pueden aparecer de forma espontánea a partir de poblaciones hermafroditas mediante la eliminación del cromosoma X, con una frecuencia aproximada de 0,1% (Hodgkin, 1979). Anatómicamente los dos sexos se diferencian en la cola, donde el hermafrodita presenta una simple punta y el macho posee una estructura compleja, formada por una bolsa copulatoria con multitud de receptores sensoriales y dos espículas copulatorias contráctiles, permitiendo el apareamiento. El macho es ligeramente más delgado y pequeño que el hermafrodita (Hope, 1999).

### 2.2. Ciclo de vida

Un ciclo de vida completo de *C. elegans* hasta la formación del adulto dura aproximadamente 3,5 días a 20 °C y comprende un estado embrionario y 4 estados larvarios (L1-L2-L3-L4) (Brenner, 1974); el adulto tiene una vida media a 20 °C entre 11 y 17 días (Gems y Riddle, 2000). Se ha observado que pequeños cambios de temperatura pueden acelerar o retrasar su desarrollo, completando el ciclo en 3 días a 25 °C y en 6 días a 10 °C (Byerly *et al.*, 1976). Además, la restricción dietética, puede elevar el promedio de vida hasta 26 días.

El proceso de embriogénesis comprende desde la fertilización hasta la eclosión del huevo, produciendo el primer estado larvario, L1. El desarrollo post-embionario implica el crecimiento a través de estadios larvarios (L1-L4) donde cada uno finaliza con una muda. En la última muda se forma el individuo adulto (Figura 5).

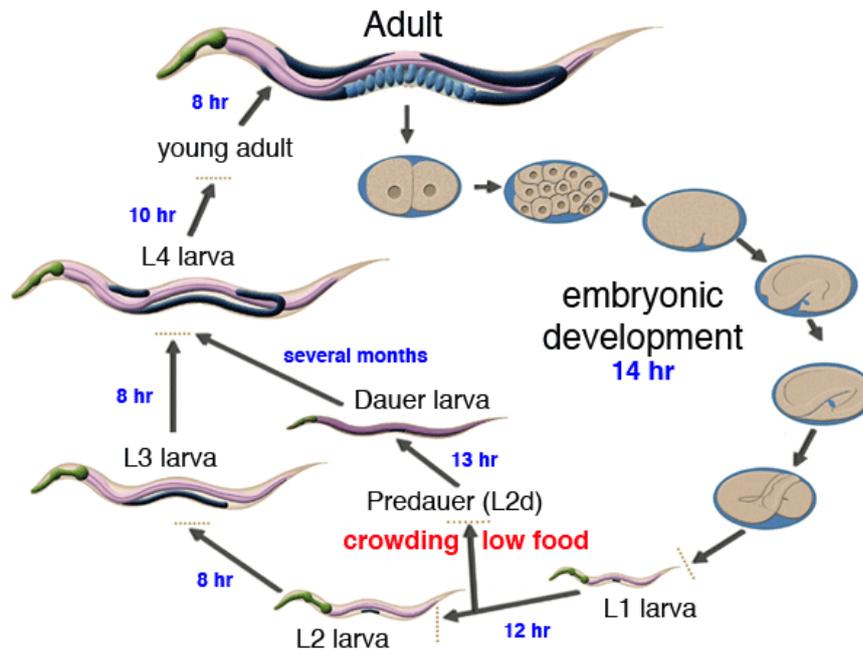


Figura 5: Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C.

Fuente: <http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>.

En condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento, se forma un estado larvario diferente en la segunda muda, denominada larva *dauer*. La forma *dauer* puede permanecer viable varios meses y continuar su desarrollo cuando las condiciones sean favorables (Riddle, 1988).

### 2.3. *Caenorhabditis elegans* y su importancia en la investigación

Este nematodo fue propuesto como organismo modelo para distintos campos de la biología, incluyendo biología celular, neurofisiología y envejecimiento por Sydney Brenner en 1965 (Brenner, 1974), que fue galardonado con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2002. En la actualidad, la cepa más empleada en investigación es la denominada cepa Bristol, aislada en 1959 de la cual se obtuvo la cepa N2, que es la cepa silvestre de referencia (Wood, 1988). En la actualidad, *C. elegans* es empleado, entre otras cosas, en la realización de estudios *in vivo* con compuestos de origen vegetal farmacológicamente activos ya que presenta numerosas ventajas como organismo modelo frente a otros animales (Riddle *et al.*, 1997):

- Su cultivo y reproducción en el laboratorio es sencillo y barato. Únicamente necesita un ambiente húmedo, temperatura ambiente entre 10 y 25 °C, oxígeno atmosférico y una fuente de alimento mediante cepas no patógenas de la bacteria *E. coli*. Además, su ciclo de vida corto y su alta tasa de reproducción permiten obtener grandes poblaciones rápidamente.

## A. INTRODUCCIÓN

---

- La transparencia de su cuerpo permite la visualización interna de sus células y órganos mediante técnicas microscópicas. Para su mantenimiento es necesario poco espacio gracias a su tamaño, y para su manejo y manipulación es suficiente con una lupa binocular.
- Presenta un número constante de células (eutelia), concretamente, el gusano hermafrodita posee 959 células somáticas y el gusano masculino 1031, con una posición conocida y constante (Sulston *et al.*, 1983). Se considera el mejor modelo para estudios de desarrollo, permitiendo obtener fácilmente mutantes alterando su linaje celular (Wood, 1988; Hope, 1999), almacenados y distribuidos por el *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) de la Universidad de Minnesota (EEUU) ([www.cbs.umn.edu/CGC](http://www.cbs.umn.edu/CGC)).
- Su genoma es pequeño ( $9,7 \times 10^7$  pares de bases), siendo el primer organismo multicelular del que se secuenció completamente su genoma en 1998 (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), posteriormente corregido en 2002. Además, existe una alta conservación de las rutas moleculares y celulares entre *C. elegans* y otros mamíferos presentando una homología de un 60-80% con genes humanos (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

### 3. Especies reactivas de oxígeno

Una consecuencia inevitable del metabolismo celular de organismos aerobios es la producción de radicales libres endógenos altamente reactivos, denominados especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS presentan uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, y al menos un átomo de oxígeno. Su síntesis se produce en diferentes lugares de la célula, mayoritariamente en la mitocondria, y más concretamente en la cadena de transporte de electrones (ETC) localizada en la membrana interna mitocondrial (Van Raamsdonk y Hekimi, 2010).

La cadena de transporte de electrones de la mitocondria está involucrada en la transferencia de electrones generados en el ciclo del ácido cítrico. Este sistema está formado por 4 complejos (I-IV) por donde se transfieren de manera secuencial los electrones (Figura 6). Simultáneamente, se genera un gradiente electroquímico por la translocación de protones hacia el espacio intermembrana, dicho gradiente es utilizado por el complejo V (ATP-asa) para la formación de ATP. Los electrones en los complejos I, II, III pueden ser cedidos directamente al oxígeno molecular, que es reducido y se genera el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Posteriormente, el superóxido es rápidamente transformado a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mediante la acción de dos dismutasas: superóxido dismutada 2 (SOD 2) en la matriz mitocondrial y superóxido dismutasa 1 (SDO 1) en el espacio intermembrana. El anión superóxido puede interactuar con el óxido nítrico (NO) generando especies reactivas de nitrógeno

## A. INTRODUCCIÓN

(RNS) como el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) capaz de inducir daño al ADN, altera la integridad mitocondrial y modifica irreversiblemente proteínas (Madamanchi y Runge, 2007).

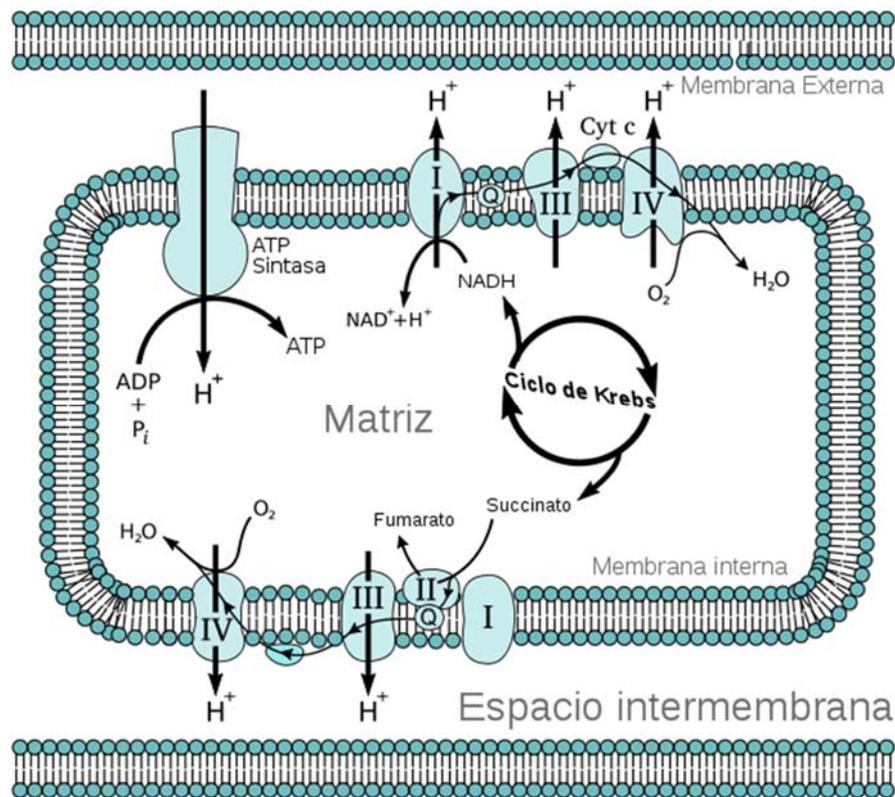


Figura 6: Cadena de transporte de electrones.

Fuente: [https://es.wikibooks.org/wiki/Bioqu%C3%ADmica/Cadena\\_de\\_Transporte\\_de\\_Electrones](https://es.wikibooks.org/wiki/Bioqu%C3%ADmica/Cadena_de_Transporte_de_Electrones)

En condiciones ambientales favorables se generan ROS a niveles basales, que posteriormente pueden ser eliminados por diferentes mecanismos antioxidantes (Foyer y Noctor, 2005). Además, se ha demostrado que concentraciones moderadas de ROS ejercen efectos beneficiosos en las células, debido a que están implicadas en mecanismos de señalización molecular. Por el contrario, la célula entra en estrés oxidativo cuando los sistemas biológicos están expuestos constantemente a niveles elevados de ROS y RNS. Estas concentraciones elevadas de ROS provocan un elevado daño a proteínas, DNA y lípidos (Foyer y Noctor, 2005), que puede conducir a diversas patologías, entre ellas cardiovasculares.

## ***B. OBJETIVOS***

---

La mayoría de los conocimientos sobre los efectos biológicos de los flavonoides se han realizado en estudios *in vitro*, mientras que datos de estudios *in vivo* que tengan en cuenta la compleja interacción de diversos procesos de digestión, metabolismo e interacciones en un organismo completo son limitados. Por este motivo, en el presente trabajo se ha utilizado el nematodo *C. elegans* como organismo modelo para el estudio de las actividades y posible modo de acción de los flavonoides.

El objetivo general de los estudios del Grupo de Investigación en Polifenoles de la Universidad de Salamanca, en el cual se ha realizado este trabajo, es avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción responsables de los efectos biológicos asociados al consumo de alimentos ricos en flavonoides. Dentro de este objetivo, en este trabajo se estudia la influencia del ácido 3,4 dihidroxifenil acético (DHPAA), descrito como metabolito importante de quercetina en el organismo humano, sobre resistencia al estrés térmico y oxidativo en *C. elegans*.

### 1. Material biológico

Todos los ensayos realizados han sido llevados a cabo con la cepa silvestre N2 de *C. elegans*, utilizando *E. coli* OP50 resistente a ampicilina como alimento del gusano. Ambas cepas fueron obtenidas del Caenorhabditis Genetic Center (CGC) de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, EEUU).

### 2. Métodos

#### 2.1. Preparación de placas Petri NGM

Para la preparación del medio NGM (Nematode Growth Medium) se mezclan: 1,2 g de NaCl, 6,8 g de agar, 1 g de peptona en 390 mL de H<sub>2</sub>O destilada. La mezcla se autoclava durante 60 min y, a continuación, se atempera utilizando un baño de agua a 60 °C durante 20 minutos.

En el momento de su utilización, el medio NGM se enriquece con: 400 µL de CaCl<sub>2</sub> 1M, 400 µL de colesterol (5 mg/mL etanol), 400 µL MgSO<sub>4</sub> 1M, 10 mL buffer KPO<sub>4</sub> 1M pH 6,0 (108,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 35,6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1L de H<sub>2</sub>O), 400 µL de ampicilina sódica (50 mg/mL) y 700 µL de nistatina al 4% (1g/100 mL en etanol: acetato de amonio 1:1), todo ello previamente esterilizado en el autoclave.

Finalmente, la solución NGM se distribuye entre las placas Petri, Ø 90 mm y Ø 35 mm, bajo condiciones estériles utilizando una campana de flujo laminar, llenando las placas con 20 mL y 5 mL, respectivamente. Una cantidad constante de agar en las placas reduce la necesidad de enfocar el microscopio cuando se cambia de una placa a otra. Antes de utilizarse, las placas se dejan enfriar a temperatura ambiente, en campana de flujo laminar, durante unos minutos, para permitir la evaporación del exceso de humedad. Las placas se pueden conservar en refrigeración, entre 4 y 8 °C, durante varios días.

#### 2.2. Preparación de *E. coli* OP50 como fuente de alimento

El medio Agar LB es específico para el almacenamiento de colonias *E. coli*. Se prepara 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. El medio se esteriliza en el autoclave. En el momento de su utilización, se atempera durante 20 min en un baño a 60 °C y se añaden 200 µL de ampicilina. El medio se reparte entre las placas Petri, en condiciones de esterilidad, llenando las placas con aproximadamente 20 mL y dejando luego enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización. Con ayuda de un asa de siembra desechable se trasvasa una pequeña cantidad de *E. coli* OP50 a placas del medio Agar LB. Las placas se conservan en refrigeración a una temperatura entre 4 y 8 °C.

## ***C. MATERIALES Y MÉTODOS***

---

El cultivo de bacterias se realiza en el medio líquido L. Broth, que contiene: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g NaCl en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada. El pH se ajusta a pH 7,0 con NaOH 1M y, por último se autoclava la mezcla.

Para realizar el cultivo de *E. coli* OP50 se añade a un Erlenmeyer, previamente autoclavado, 50 mL de medio líquido L. Broth y 50 µL de ampicilina. Se inocula una colonia aislada de OP50. Todo el proceso se realiza en condiciones de esterilidad. Finalmente, el medio L. Broth se incuba a 37 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se divide el medio en alícuotas para facilitar su manejo. Se puede almacenar en refrigeración a 4 °C durante semanas.

### **2.3. Condiciones de cultivo de *C. elegans***

Los nematodos se mantienen a 20 °C en placas NGM de almacenamiento usando *E. coli* OP50 viva como alimento. Periódicamente, las placas se lavan con 8 mL de una solución salina denominada buffer M9, preparado con: 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g NaCl, 1 mL MgSO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O destilada hasta 1 L, esterilizada por autoclavado. La suspensión se centrifuga (60 s, 7000 g). Posteriormente, se elimina el sobrenadante y los gusanos son transferidos e incubados en nuevas placas de agar NGM estéril, previamente sembradas con *E. coli* OP50.

Para su preparación, las placas con medio NGM estéril se siembran con 20-200 µL de bacterias crecidas en el medio líquido L. Broth, dependiendo del diámetro de la placa utilizada. Las bacterias se extienden con una varilla de vidrio, previamente flameada, sin dañar la superficie del agar, para evitar que los gusanos se introduzcan en su interior, dificultando su posterior recogida. La transferencia de gusanos se realiza desde una placa de almacenamiento a una placa fresca, previamente sembrada con *E. coli* OP50, con ayuda de una espátula esterilizada. Los gusanos se dispersan por el césped bacteriano de la nueva placa, intentando que éste quede centrado para evitar la dispersión de gusanos, así como facilitar su manejo y visualización.

Para transferir gusanos individualmente entre placas, se utiliza un asa de siembra de alambre de platino de calibre 32. El alambre se introduce en una pipeta Pasteur y su extremo se aplana y redondea con una lima para eliminar los filos del borde, debido a que pueden dañar a los gusanos o el agar. Antes de transferir los gusanos de una placa a otra, el asa de siembra se flamea para evitar la contaminación entre placas. El proceso de transferencia se realiza bajo la lupa con una fuente de luz blanca. El gusano que se quiere recoger es observado primero al microscopio, y a continuación lenta y cuidadosamente se coge con el asa. Este proceso se puede facilitar con la recogida en el extremo del asa de una mínima cantidad de césped bacteriano, permitiendo una mejor adherencia del gusano

## ***C. MATERIALES Y MÉTODOS***

---

al asa y evitando la ruptura del agar. El asa junto con el gusano se apoya sobre el agar de la nueva placa de agar, permitiendo el desprendimiento del gusano.

### **2.4. Preparación de placas para los ensayos con DHPAA**

Para los ensayos de cultivo de los gusanos en presencia de ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DHPAA), se preparan placas de agar NGM a las que se incorporan diferentes cantidades de este compuesto. Para ello, se preparan disoluciones madre de DHPAA en dimetil sulfóxido (DMSO) de concentración 25 mM, 100 mM y 200 mM, de las cuales se añade al medio de cultivo 1  $\mu$ L por mililitro de agar. Así, se obtienen placas con concentraciones finales de 25  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ó 200  $\mu$ M. Además, se preparan placas control sin DHPAA en las que se añade DMSO (1  $\mu$ L/mL), de manera que la concentración final de este disolvente es de 0,1% (v/v) en todas las placas.

Para determinados ensayos con *C. elegans* es esencial partir de una población sincronizada, trabajando con una única generación de nematodos. Para impedir la reproducción de la población sincronizada y, así evitar la mezcla de diferentes generaciones, se añade 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR) a las placas a las que se han transferido los gusanos a partir del primer día de adulto. FUdR es un compuesto que inhibe la síntesis de ADN, produciendo la muerte de las células mitóticas, y de ARN, afectando la síntesis de proteínas (Hosono, 1978). Debido a que las células de los nematodos adultos son mayoritariamente células post-mitóticas, el tratamiento con FUdR antes de alcanzar la madurez sexual evita el desarrollo de la progenie con efectos mínimos en el desarrollo del adulto (Mitchell *et al.*, 1979). Se prepara una solución de FUdR 150 mM disuelta en 1 mL de agua ultrapura, que se añade al agar NGM en la misma proporción que DHPAA. La concentración final de FUdR en las placas es de 150  $\mu$ M. Tanto las disoluciones madre de FUdR como de DHPAA se almacenan en el congelador.

A partir del primer día de adulto, los gusanos se transfieren cada dos días a placas nuevas de agar NGM con FUdR y la concentración requerida de DHPAA o DMSO.

### **2.5. Sincronización de *C. elegans***

La sincronización de la población de *C. elegans* tiene por objeto que todos los individuos que se vayan a utilizar para un determinado ensayo presenten el mismo estado larvario, es decir, que todos ellos tengan la misma edad. Para ello, los nematodos se dejan crecer durante 3-4 días en placas de agar NGM con *E. coli* OP50 a 20 °C, hasta la obtención de gran cantidad de huevos y/o hermafroditas que muestren huevos en su interior. Para la sincronización, las placas se lavan con 2 mL de buffer M9, repitiendo este proceso hasta que se considere que la placa está limpia de gusanos. La solución se recoge en eppendorf tubos de centrífuga, previamente numerados, y se centrifuga durante 1 min a

## ***C. MATERIALES Y MÉTODOS***

---

8000 rpm a 4 °C para evitar que los huevos eclosionen. Se retira el sobrenadante y sobre el pellet de gusanos y huevos, se añade 150 µL a cada tubo de una solución *bleaching* capaz de destruir todas las larvas y gusanos sin afectar a los huevos. Esta solución se prepara con 1 mL de lejía comercial y 500 µL de NaOH 5N.

La mezcla se agita vigorosamente durante 10 min, alternando cada minuto un ciclo de agitación con vórtex y un ciclo de reposo. Posteriormente, los tubos son centrifugados y lavados con 2 mL de buffer M9 5 veces con la finalidad de eliminar los posibles restos de solución *Bleaching*, gusanos y *E. coli*. En definitiva, de todo aquello que no corresponde con huevos sincronizados.

El residuo final del proceso de sincronizado, se resuspende en 2 mL de M9 y se incuba durante 1-2 días a 20 °C, para permitir el desarrollo de los huevos al estado larvario L1. Dependiendo de la concentración de huevos obtenida, se siembran en las placas NGM de 200 a 300 µL. Dichas placas se mantienen a 20 °C para el completo desarrollo de los nematodos y sus posteriores empleos.

### **2.6. Ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente**

El ciclo de vida del nematodo *C. elegans* es dependiente de la temperatura, existiendo una relación inversa entre la temperatura de cultivo y la vida media del gusano. Los ensayos de estrés térmico tienen como objetivo comprobar si los gusanos cultivados previamente en presencia de diferentes concentraciones de DHPAA aumentan su resistencia frente al estrés térmico, sabiendo que la termotolerancia está determinado en gran medida por la síntesis de proteínas de shock térmico, HSP (Muñoz, 2003). Estos ensayos se han realizado según el método descrito por Saul *et al.* (2009) con pequeñas modificaciones, como se describe a continuación.

Los gusanos sincronizados en estado larvario L1 se siembran en placas NGM de Ø 90 mm que contienen las distintas concentraciones de DHPAA (25 µM, 100 µM y 200 µM) y son cultivados a 20 °C. Simultáneamente se realizan ensayos control en ausencia de DHPAA, pero con la misma concentración de DMSO (0,1%). La influencia del estrés térmico sobre la viabilidad del gusano es evaluada en dos estados de desarrollo. En el primer ensayo, los gusanos permanecen en las placas con tratamiento y control hasta alcanzar el segundo día de adulto; mientras que en el caso del segundo ensayo se mantienen hasta el día nueve de adulto. En ambos casos, una vez alcanzado el día correspondiente, los nematodos son transferidos individualmente con el asa de siembra a placas de 35 mm de diámetro (20 gusanos por placa) y se someten a una temperatura de 35 °C durante 8 horas. Durante el ensayo de estrés térmico, se cuentan los nematodos supervivientes y los muertos a las 6 y 8 horas. Se considera que los gusanos están muertos cuando no responden a ningún estímulo

## ***C. MATERIALES Y MÉTODOS***

---

proporcionado ligeramente con toques por el asa de siembra. Cada ensayo se realiza con un total de 100 gusanos por tratamiento y control (400 gusanos por ensayo) y se lleva a cabo por triplicado.

### **2.7. Determinación de ROS**

El nivel celular de ROS es cuantificado por el método de la diclorofluoresceína en un lector de placas de fluorescencia (Wang y Joseph, 1999). Con el objetivo de obtener una población sincronizada de gusanos, las larvas L1 se siembran, como se ha explicado anteriormente, en placas NGM de Ø 90 mm que contienen las distintas concentraciones de DHPAA (25 µM, 100 µM y 200 µM), y se cultiva a 20 °C. Simultáneamente se realizan ensayos control en ausencia de DHPAA, pero con la misma concentración de DMSO (0,1%). Los gusanos se mantienen en las placas hasta la realización del ensayo. El día del ensayo, los gusanos son transferidos individualmente con el asa de siembra a una placa con 96 pocillos donde se alternan los diferentes tratamientos. La última fila corresponde al blanco. Para cada tratamiento se realiza la determinación sobre 28 gusanos.

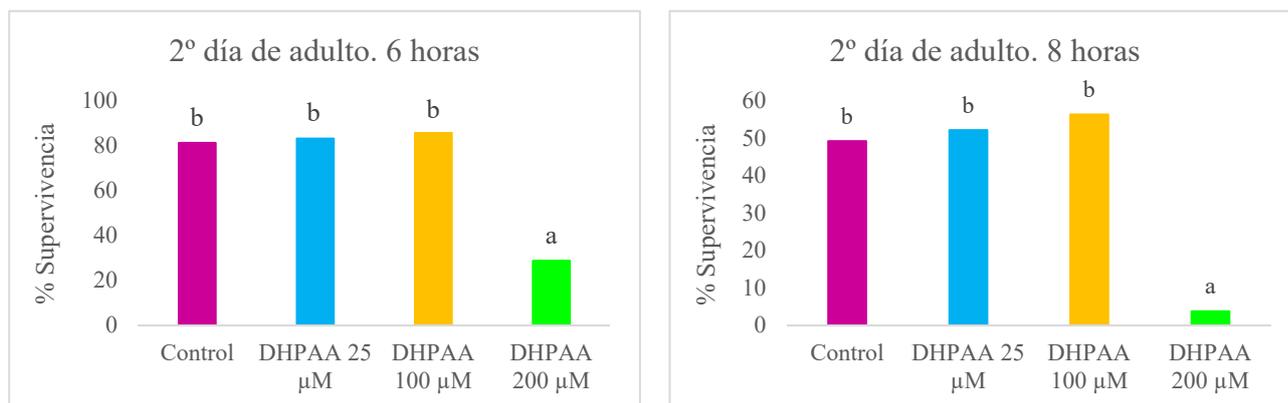
Los ensayos se realizaron en los días dos y nueve de adulto en gusanos sometidos a condiciones de estrés en la propia placa (2 h a 35 °C) y sin él. Todos los ensayos se llevan a cabo por triplicado.

Posteriormente, se añade en cada pocillo 15 µL de una solución 150 µM de diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), preparada extemporáneamente por disolución de 1,81 mg de DCFH-DA en 25 mL de etanol, e inmediatamente se procede a la medida de la fluorescencia durante 30 minutos a intervalos de 10 minutos, utilizando como longitudes de onda ( $\lambda$ ) de excitación y de emisión 485 nm y 535 nm, respectivamente.

El compuesto DCFH-DA atraviesa las membranas celulares y es hidrolizado enzimáticamente por esterasas intracelulares que eliminan los grupos acetatos dando lugar a un compuesto no fluorescente, DCFH (Wang y Joseph, 1999). Dicho compuesto en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) es oxidado a un producto fluorescente, DFC, que puede ser usado como índice de los niveles intracelulares de ROS en gusanos individuales. Con este método se pueden detectar varios ROS a los que el DCFH-DA es sensible: ONOO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH<sup>·</sup>. Otros como superóxido, NO, HOCl o O<sub>2</sub> no son detectables debido a que el DCFH-DA es insensible a ellos (Oddvar *et al.*, 2003).

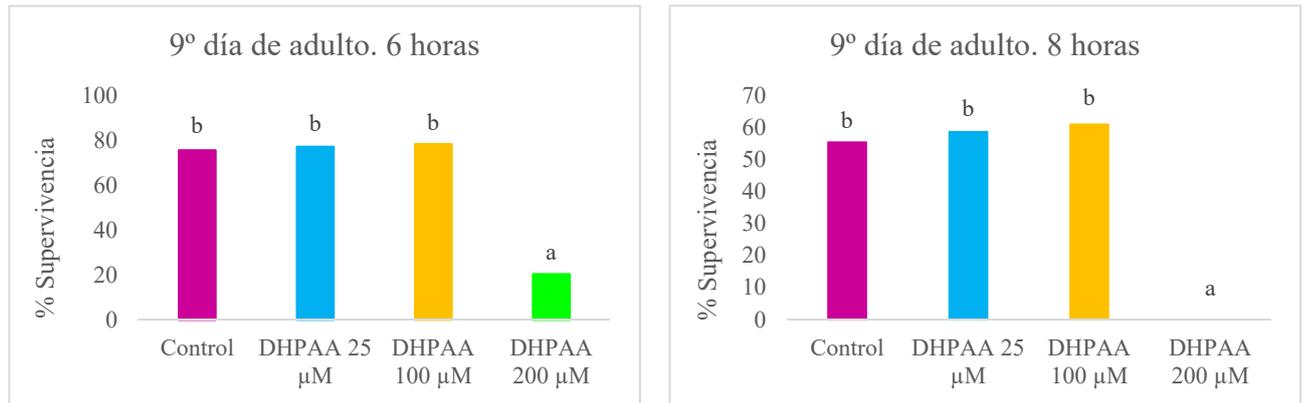
### 1. Ensayos de estrés térmico

Diferentes autores (Gao *et al.*, 2006; Jaganath *et al.*, 2009) han descrito para DHPAA actividades antiproliferativas y antioxidantes *in vitro*, que relacionan con la presencia en su estructura del grupo catecol (*o*-difeno). Estas actividades no han sido estudiadas aún en modelos *in vivo*. En el presente trabajo se planteó evaluar la capacidad de DHPAA para modular *in vivo* la resistencia frente a estrés oxidativo inducido por choque térmico utilizando *C. elegans* como organismo modelo. Para ello, tras cultivar gusanos en presencia de diferentes concentraciones de DHPAA (25  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) en el medio, se les aplicaba un estrés térmico (6 h u 8 h, 35 °C) en el segundo y noveno día de adulto y se comparaba después su tasa de supervivencia con la de una población control de *C. elegans* también sometida a las mismas condiciones de estrés, pero que no había sido tratada con DHPAA. Para cada grupo se realizaron 3 ensayos independientes sobre una población de 100 gusanos en cada caso. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 7 y 8, y en la Tabla 1 se recogen los porcentajes de supervivencia de *C. elegans* en cada uno de los ensayos



**Figura 7:** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* tras ser sometidos a estrés térmico durante 6 h (izquierda) ó 8 h (derecha) a 35 °C en el día 2 de adulto en los distintos de grupos tratados con diferentes concentraciones de DHPAA frente a gusanos sin tratamiento (control).

## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 8:** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* tras ser sometidos a estrés térmico durante 6 h (izquierda) ó 8 h (derecha) a 35 °C en el día 9 de adulto en los distintos de grupos tratados con diferentes concentraciones de DHPAA frente a gusanos sin tratamiento (control).

**Tabla 1:** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* tras ser sometidos a estrés térmico en los distintos grupos de ensayo.

Ensayo	Tasas de supervivencia			
	Día 2 (35 °C, 6 h)	Día 2 (35 °C, 8 h)	Día 9 (35 °C, 6 h)	Día 9 (35 °C, 8 h)
Control	81 %	49 %	75 %	55 %
25 μM DHPAA	83 %	52 %	77 %	58 %
100 μM DHPAA	85 %	56 %	78 %	60 %
200 μM DHPAA	28 %	3 %	20 %	0 %

Como se puede comprobar en las Figuras 7 y 8 y Tabla 1, el patrón de comportamiento fue el mismo en todos los casos, encontrando un ligero aumento en la tasa de supervivencia entre los grupos de gusanos control y los tratados con 25 μM ó 100 μM de DHPAA, aunque el mismo no era estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, existía un descenso notable en la tasa de supervivencia en los nematodos tratados con 200 μM de DHPAA, especialmente en los grupos que recibían el estrés más severo (35 °C, 8 h), donde llegaba a producirse la muerte de la totalidad de la población. Como observación adicional, se apreció un ligero aumento en la tasa de supervivencia a día 9 de adulto en los gusanos control y tratados con DHPAA 25 μM y 100 μM sometidos a estrés durante 8h en comparación con los sometidos a 6 h de estrés, lo cual podría ser debido tanto a la presencia de individuos con un fenotipo más resistente en la población ensayada como a pequeñas diferencias de precisión en la temperatura aplicada.

## ***D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---

Los mecanismos de acción implicados en los efectos biológicos de los flavonoides están aún bajo discusión, y pueden implicar rutas y procesos distintos, como sugiere el hecho de que diferentes flavonoides (y, en ocasiones, un mismo flavonoide) provoquen diferentes respuestas en *C. elegans* en función de las condiciones del ensayo (Saul *et al.*, 2011).

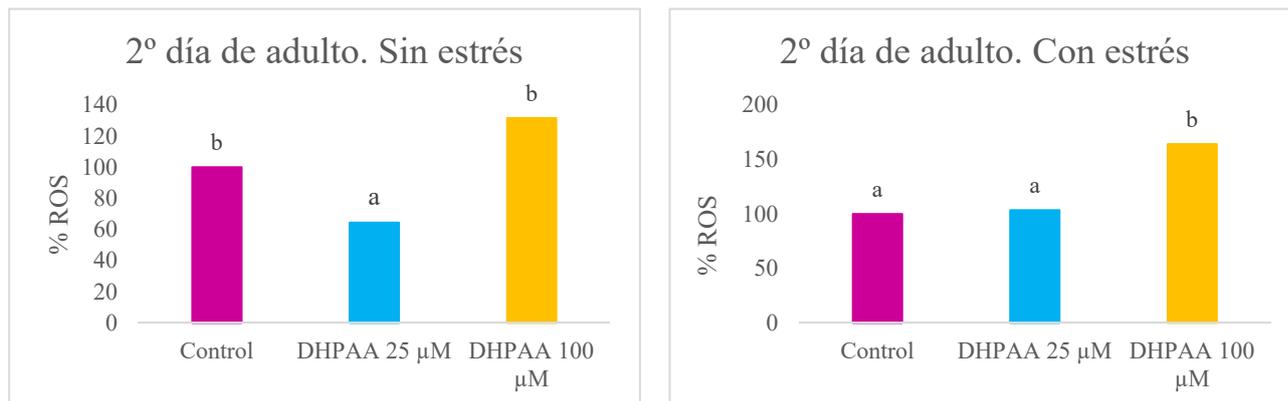
En nuestras condiciones de ensayo, las concentraciones DHPAA 25  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  inducen una ligera mejora en la resistencia de estrés térmico; mientras que la supervivencia disminuye significativamente en los gusanos tratados con 200  $\mu\text{M}$  de DHPAA. Esta observación es coherente con una respuesta de tipo hormético, según la cual algunas sustancias ejercen efectos positivos a dosis bajas mientras a dosis más altas son tóxicas (Southam y Ehrlich, 1943). De hecho, otros autores también encontraron que algunos compuestos fenólicos, como ácido elágico, actuaban de acuerdo a un mecanismo hormético, con un estrecho margen de concentración entre efectos benéficos y tóxicos (Saul *et al.*, 2011). Esta circunstancia obliga a ser cauto antes de someter un organismo a dosis elevadas de un compuesto; de hecho, la existencia de efectos indeseables ha sido ya encontrada en casos de ingesta elevada de otros fitoquímicos, como los carotenoides cuando son administrados en forma de suplementos (Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994; Lawenda *et al.*, 2008).

### **2. Niveles intracelulares de ROS**

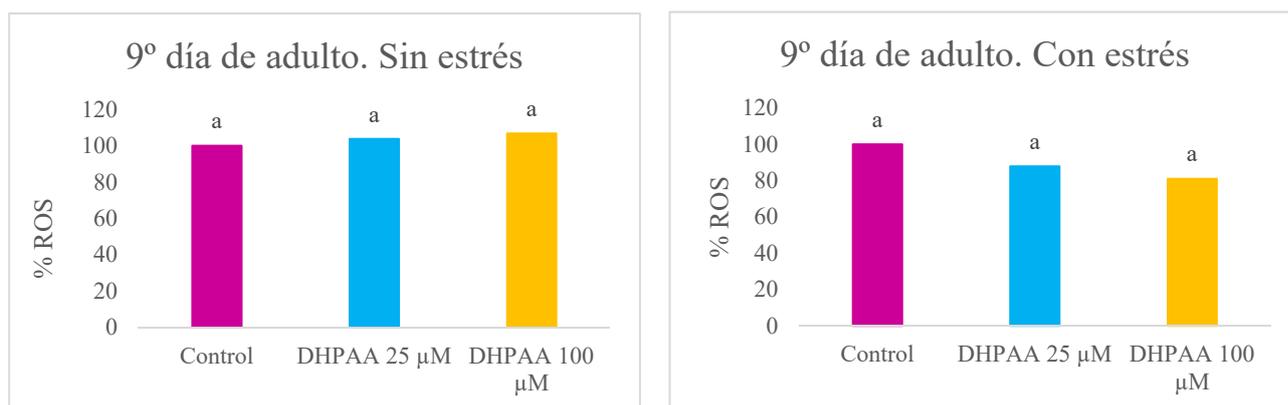
En el presente trabajo, no se estudiaron los niveles de ROS en gusanos tratados con 200  $\mu\text{M}$  de DHPAA debido a la escasa (o nula) población de individuos que sobrevivían a esa concentración (ver apartado anterior), insuficiente para obtener resultados representativos.

En estudios anteriores en nuestro laboratorio se había encontrado que la exposición de *C. elegans* a estrés térmico (35 °C, 2 h) producía una elevación en los niveles intracelulares de ROS, que podía ser contrarrestada por tratamiento previo con flavonoides, en particular epicatequina (González-Manzano *et al.*, 2012; Ayuda Durán, 2014) y quercetina (Delgado Ciruelos, 2015). En el presente trabajo, se han determinado los niveles intracelulares de ROS en gusanos control y tratados con DHPAA (25  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) y sometidos o no a estrés térmico (35 °C, 2 h) en el segundo y noveno día de adulto. Los resultados obtenidos para los niveles de ROS en los distintos ensayos se recogen en las Figuras 9 y 10 expresados como porcentaje en relación al correspondiente control.

## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



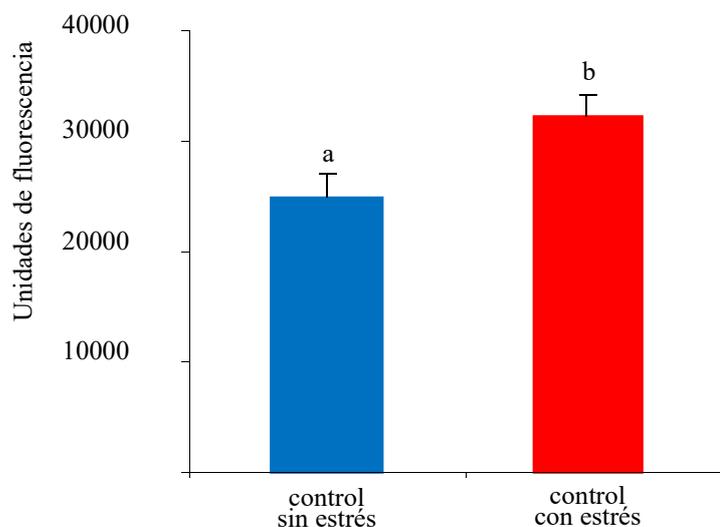
**Figura 9:** Niveles de ROS intracelulares en gusanos en el día 2 de adulto cultivados en presencia de DHPAA no sometidos a estrés térmico (izquierda) y sometidos a estrés térmico (35 °C, 2 h) (derecha) en comparación con controles no tratados con DHPAA.



**Figura 10:** Niveles de ROS intracelulares en gusanos en el día 9 de adulto cultivados en presencia de DHPAA no sometidos a estrés térmico (izquierda) y sometidos a estrés térmico (35 °C, 2 h) (derecha) en comparación con controles no tratados con DHPAA.

En los ensayos realizados sobre gusanos a día 2 de adulto (Figura 9) se observó que el tratamiento con DHPAA 25 μM era capaz de disminuir significativamente ( $p < 0,05$ ) los niveles de ROS en gusanos no sometidos a estrés con respecto al grupo control, mientras que se mantenían los niveles en los sometidos a estrés. Esto podría interpretarse como un resultado favorable, teniendo en cuenta que, como se había observado en estudios anteriores (González-Manzano *et al.*, 2012; Ayuda Durán, 2014; Delgado Ciruelos, 2015), la aplicación de estrés térmico conduce a una elevación en los niveles de ROS (Figura 11), que de este modo sería controlada por el tratamiento con DHPAA a esa concentración (25 μM).

## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 11:** Niveles de ROS determinados en gusanos control no sometidos y sometidos a estrés térmico (35 °C, 2 h) (González-Manzano et al., 2012).

Sin embargo, el tratamiento con DHPAA 100  $\mu$ M producía una elevación en los niveles de ROS con relación al control, significativa en el grupo sometido a estrés. Teniendo en cuenta que en los ensayos de supervivencia no se había encontrado una mayor mortalidad en este grupo de tratamiento, se debe suponer que la elevación observada en los niveles de ROS no es suficiente para causar un efecto letal. En este sentido, cabe señalar que en la actualidad existe un número creciente de autores que discrepan de algunos aspectos de la teoría clásica del estrés oxidativo, como Shadel y Horvarth (2015), quienes demuestran que cierto aumento en los niveles de ROS puede ser incluso beneficioso debido a que los ROS producidos por las mitocondria actúan como señalizadores celulares haciendo que se activen mecanismos de defensa. De hecho, se ha indicado que tanto en medios celulares como en *C. elegans* algunos compuestos fenólicos podrían actuar como pro-oxidantes ligeros y causar un estrés oxidativo de bajo nivel que activaría rutas de señalización que estimularía los mecanismos endógenos de defensa celular, conduciendo al final a un mayor grado de citoprotección (Halliwell, 2008; Tang y Halliwell, 2010).

En los ensayos realizados en gusanos en el día 9 de adulto (Figura 10) no se observaron diferencias significativas en los niveles de ROS entre los grupos control y tratados de DHPAA a las distintas dosis, aunque se apuntaba una ligera tendencia a la disminución en el caso de los gusanos sometidos a estrés. Estos resultados no coinciden con los obtenidos en los ensayos a día 2 de vida del

## ***D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---

gusano, al menos en lo que respecta a los tratamientos con DHPAA 100  $\mu$ M. Este hecho podría indicar una respuesta diferente en individuos “jóvenes” (día 2) y adultos (día 9) en su comportamiento frente a DHPAA.

## ***E. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS***

---

Como se ha señalado, los mecanismos implicados en la actividad biológica de los compuestos fenólicos se encuentran aún bajo discusión. Los resultados aquí obtenidos no permiten concluir de manera definitiva sobre los efectos del DHPAA, metabolito principal de quercetina y de otros flavonoides en el organismo humano, en la modulación del estrés oxidativo. En todo caso, se puede suponer que la influencia sobre los niveles de ROS no sería un mecanismo principal en los posibles efectos beneficiosos.

Una conclusión que, sin embargo, parece extraerse de las observaciones realizadas es la existencia de una respuesta de tipo hormético frente a los compuestos fenólicos, de manera que los posibles efectos beneficiosos sólo serían producidos a dosis bajas mientras que un aumento de éstas conduciría a efectos perjudiciales.

Los estudios realizados se deben considerar preliminares y deben continuarse a través de la evaluación otros efectos y utilizando otras aproximaciones experimentales (p. ej., estudios de longevidad y/o con individuos mutantes) para seguir profundizando en los mecanismos a través de los cuales actúa el DHPAA, y los compuestos fenólicos en general.

## F. BIBLIOGRAFÍA

---

- Akan, Z.; Garip, A.I. Antioxidants may protect cancer cells from apoptosis signals and enhance cell viability. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. (2013), 14, 4611-4614.
- Andersen, O.M. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and applications. Andersen, O.M.; Markham, K.R. (Ed.). Taylor & Francis Group: London (2006), 1129.
- Ayuda Durán, B. Influencia de Epicatequina sobre el estado oxidativo de *Caenorhabditis elegans*. Estudios de diversos Biomarcadores. *Grado de Salamanca*. (2014).
- Boersma, M.G.; Van der Woude, H.; Bogaards, J.; Boeren, S.; Vervoort, J.; Cnubben, N.H.; Van Iersel, M.L.; van Bladeren, P.J.; Rietjens, I.M. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chemical Research in Toxicology*. (2002), 15, 662–670.
- Booth, A.N.; Deeds, F.; Jones, F.T.; Murray, C.W. The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body. *The Journal of Biological Chemistry*. (1956), 223, 251-257.
- Boots, A.W.; Haenen, G.R.M.M.; Aalt Bast, H. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. (2008), 585, 325-337.
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. (1974), 77, 71-94.
- Byerly, L.; Cassada, R.C.; Russell, R.L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*. (1976), 51, 23-33.
- Choi, G.N.; Kim, J.H.; Kwak, J.H.; Jeong, C.H.; Jeong, H.R.; Lee, U.; Heo, H.J. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chemistry*. (2012), 132, 1019-1024.
- Day, A.J.; Canada, F.J.; Diaz, J.C.; Kroon, P.A.; McLauchlan, R.; Faulds, C.B.; Plumb, G.W.; Morgan, M.R.; Williamson, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*. (2000), 468, 166–170.
- Day, A.J.; Morgan, M.R.A. Methods of polyphenols extraction from biological fluids and tissues. Santos-Buelga and G Williamson (Eds.). *Royal Society of Chemistry, Cambridge*. (2003), 17-47.
- Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. (2013), 18, 1818-1892.
- Delgado Ciruelos, L. Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de flavonoides. *Caenorhabditis elegans* y líneas celulares como sistemas modelo. *Universidad de Salamanca*. (2015).
- Foyer, C.H.; Noctor, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. (2005), 17, 1866-1875.

## F. BIBLIOGRAFÍA

---

- Fraga, C.S.; Galleano, M.; Verstraeten, S.V.; Oteiza, P.I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*. (2010), 31, 6, 435-445.
- Gao, K.; Xu, A.; Krul, C.; Venema, K.; Liu, Y.; Niu, Y.; Lu, J.; Bensoussan, L.; Seeram, N.P.; Heber, D.; Henning, S.M. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *Journal of Nutrition*. (2006), 136, 52-57.
- Gems, D. and Riddle, D.L. Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Gerontology*. (2000), 55, 393-401.
- González-Manzano, S.; González-Paramás, 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*. (2012), 60, 8911-8916.
- González-Segovia, R.; Quintanar, J.L.; Salinas, E.; Ceballos-Salazar, R.; Aviles-Jiménez, F.; Torres-López, J. Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *Journal of Gastroenterology*. (2008), 43, 441-447.
- Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives Biochemistry Biophysics*. (2008), 476, 107-112.
- Harborne, J.B. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall (Ed.). London. (1993).
- Hertog M. G.; Feskens E. J.; Hollman P. C.; Katan M. B.; Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. (1993), 342, 1007-1011.
- Hodgkin, J.; Horvitz, H.R.; Brenner, S. Nondisjunction mutants of the nematode *C. elegans*. *Genetics*. (1979), 91, 67-94.
- Hope, I.A. *C.elegans. A practical Approach*. The Practical Approach Series: University of Leeds Oxford. (1999).
- Hosono, R. Sterilization and growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* by 5-fluorodeoxyuridine. *Experimental Gerontology*. (1978), 300, 1142-1145.
- Huxley R.R.; Neil H.A. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*. (2003), 57, 904-908.
- Jaganath, I.B.; Crozier, A. Dietary flavonoids and phenolic compounds. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Fraga, C.G. (Ed.). John Wiley & Sons: Hoboken NJ, USA. (2010), 1-48.

## F. BIBLIOGRAFÍA

---

- Jaganath, I.B.; Mullen, W.; Lean, M.E.; Edwards, C.A.; Crozier, A. In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Free Radical Biology & Medicine*. (2009), 47, 1180-1189.
- Kaul, T.N.; Middleton, E.Jr.; Ogra, P.L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*. (1985), 15, 71-79.
- Kim, D. H.; Jung, E. A.; Sohng, I. S.; Han, J. A.; Kim, T. H.; Han, M. J. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of Pharmacal Research*. (1998), 21, 17-23.
- Kim, J.H.; Park, S.H.; Beak, E.J.; Han, C.H.; Kang, N.J. Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effects of Rutin and Its Metabolites. *Agriculture and Life Sciences*. (2013), 31(3), 165-169.
- Kyler, J.; Duthie, G. Flavonoids in Food in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Eds. Oyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham (2006).
- Lakhanpal, P.; Rai, D.K. Quercetin: A versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*. (2007), 2, 22-37.
- Lawenda, B.D.; Kelly, K.M.; Ladas, E.J.; Sagar, S.M.; Vickers, A.; Blumberg, J.B. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *Journal of the National Cancer Institute*. (2008), 100, 773-783.
- Lee, K.M.; Hwang, M.K.; Lee, D.E.; Lee, K.W.; Lee, H.J. Protective effect of quercetin against arsenite-induced COX-2 expression by targeting PI3K in rat liver epithelial cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. (2010), 58, 5815-5820.
- Madamachi, N.R.; Runge, M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation Research*. (2007), 100, 460-473.
- Marín, L.; Migueléz, E.M.; Villar, C.J. Lombó, F. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *BioMed Research International*. (2015).
- Mitchell, D.H.; Stiles, J.W.; Santelli, J.; Sanadi, D.R. Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *The Journal of Gerontology*. (1979), 34, 28-36.
- Muñoz, M.J. Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2003), 124, 43-48.
- Murray, C.W.; Booth, A.N.; DeEds, F.; Jones, F.T. Absorption and metabolism of rutin and quercetin in the rabbit. *Journal of the American Pharmacists Association*. (1954), 43, 361-364.
- Oddvar, M.; Jannike, M.A.; Halvor, A.; Frode, F. Evaluation of probes 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators or reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*. (2003), 65, 1575-1582.

## F. BIBLIOGRAFÍA

---

- Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J. Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*. (2010), 31, 478-494.
- Requena, T.; Monagas, M.; Pozo-Bayón, M.A.; Martín-Álvarez, P.J.; Bartolomé, B., del Campo, R.; Ávila, M.; Martínez-Cuesta, M-C.; Peláez, C.; Moreno-Arribas, M.V. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*. (2010), 21, 332–344.
- Riddle, D.L. The dauer larva. En *The nematode C. elegans*. Wood, W.B. (Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York. (1988), 393-412.
- Riddle, D.L.; Blumenthal, T.; Meyer, B.J.; Priess, J.R. *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York (1997).
- Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Strategies in the analysis of flavonoids. *Handbook of Chemical and Biological Plant analytical Methods*. Hostettmann, K.; Stuppner, H.; Marston, A.; Chen, S. (Eds.). John Wiley & Sons: Switzerland. (2014), 543-569.
- Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Flavonoids: functions, metabolism and biotechnology. In, *Industrial Biotechnology of Vitamins, Pigments, and Antioxidants*. Edited by E.J. Vandamme and J.L. Revuelta. John Wiley & Sons, Inc., Weinheim, Germany. (2016), 469-496.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R.; Steinberg, C.E.W. Catechin induced longevity in *C. elegans*: from Key regulator genes to disposable soma. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2009), 130, 447-486.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Stürzenbaum, S.R.; Menzel, R.; Steinberg, C.E.W. Diversity of Polyphenol Action in *Caenorhabditis elegans*: Between Toxicity and Longevity. *Journal of Natural Products*. (2011), 74, 1713-1720.
- Shadel, G.S.; Horvath, T.L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*. (2015), 163, 560-569.
- Simons, A.L.; Renouf, M.; Hendrich, S.; Murphy, P.A. Human gut microbial degradation of flavonoids: structure function relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2005), 53(10), 4258–4263.
- Southam, C.M.; Ehrlich, J. Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*. (1943), 33, 517–524.
- Sulston, J.E.; Schierenberg, E.; White, J.G.; Thomson, J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*. (1983), 100, 64-119.
- Tang, S.Y.; Halliwell, B. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2010), 394, 1-5.

## ***F. BIBLIOGRAFÍA***

---

The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effects of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New England Journal of Medicine*. (1994), 330, 1029-1035.

The C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science*. (1998), 282, 2012-2018.

Van Raamsdonk, J.M.; Hekimi, S. Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Causal Relationship? *Antioxidants & Redox*. (2010), 13, 1911-1953.

Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. E. Essentials of Glycobiology, 2nd edition. *Cold Spring Harbor*. New York. (2009).

Varma, S.D.; Mikuni, I.; Kinoshita, J.H. Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. *Science* (1975), 188, 1215-1216.

Wang, H.; Joseph, J.A.; Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*. (1999), 27, 612-616.

Wood, W.B. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. (1988).