

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Mecanismos de acción implicados en la actividad biológica de compuestos fenólicos de la dieta: Evaluación en el organismo *Caenorhabditis elegans*.

Begoña Ayuda Durán

Salamanca, 2018



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

DPTO. QUIMICA DNALÍTICA, NUTRICIÓN
Y BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA

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

Dr. Celestino Santos Buelga, Catedrático del área de Nutrición y Bromatología, Dra. Susana González Manzano, Profesora Contratada Doctor del área de Nutrición y Bromatología y Dra. Ana María González Paramás, Profesora Titular del área de Nutrición y Bromatología, autorizan la presentación del trabajo *“Mecanismos de acción implicados en la actividad biológica de compuestos fenólicos de la dieta: Evaluación en el organismo Caenorhabditis elegans.”*, realizado bajo su dirección en el Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Salamanca), por Dña. Begoña Ayuda Durán.

Salamanca, 20 de julio de 2018.

Celestino Santos Buelga

Susana González Manzano

Ana.M González Paramás

Para la realización del presente trabajo se ha contado con una beca predoctoral de la Junta de Castilla y León, concedida por ORDEN EDU/1006/2015, de 17 de noviembre y con las subvenciones recibidas del Ministerio de Economía y Competitividad a través de los proyectos: “Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la bioactividad de flavonoides de la dieta, utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo” (BFU2012-35228), “Polifenoles y metabolitos. Estudio en *C. elegans* de sus mecanismos de acción y relación con la microbiota” (AGL2015-64522-C2-R) y “Desarrollo de un nuevo producto con características saludables mejoradas a partir de subproductos de vinificación. Optimización y escalado del proceso de obtención y estudio de su metabolismo y efectos en modelos *in vitro* e *in vivo*” (IPT-2012-0130-060000).

Es complicado reflejar en unos párrafos el agradecimiento que siento por todas las personas que me habéis acompañado y apoyado durante la realización de este trabajo, sin vosotros no hubiera sido posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis Celestino Santos Buelga, Ana González Paramás y Susana González Manzano por haberme dado la oportunidad de realizar con ellos este trabajo. Por su dedicación, cercanía, disposición y por la confianza depositada en mí. Pero sobre todo quiero darles las gracias por su apoyo incondicional a nivel personal y por todo su cariño.

A todos los compañeros del departamento por el buen ambiente que creáis en el semisótano y por vuestras innumerables muestras de cariño. A Sofía y a Eva, las otras dos gusaneras, sabéis que este tiempo no hubiera sido lo mismo sin vosotras, trabajar a vuestro lado es muy fácil, gracias por todos los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio, gracias por vuestra ayuda y por estar siempre ahí. A todos los profesores del departamento Concha, María Jesús, Julián, Maite, Milagros, Alfonso, Pilar, César y Rafael muchas gracias por vuestra amabilidad, cariño e interés. Concha y Julián, aunque ya no os veamos a diario, me alegra muchísimo haber podido compartir vuestros últimos años en el departamento con vosotros. Me gustaría hacer una mención especial a Pilar y a Tino como profesores ya que el interés que generaron en mí como alumna de biología me condujo a este departamento. A todos los compañeros del laboratorio, los que siguen y con los que tuve el placer de coincidir, Nacho, Alba, Montse, Rebeca, Natalia, Raúl, María, Ana, Diana, Laura y Cris, gracias por los buenos momentos, por aconsejarme y ayudarme en todo lo posible. Y por supuesto, gracias a Joaquín y a María José, por vuestra disposición y ayuda en todo lo que está en vuestra mano, y siempre con una sonrisa.

A Antonio Miranda por permitirme realizar una estancia en su grupo de investigación pero además por su amabilidad, ayuda, implicación y cercanía desde el primer momento. También a José Antonio y a David, porque fueron unos compañeros excepcionales y me enseñaron, entre risas y buenos momentos, cómo colocar cientos de gusanos en sus respectivos portas. Gracias a todos por hacer que tenga unos recuerdos maravillosos de la estancia.

A Marta y a Puri y a todas las personas que me han ayudado desde otros departamentos y/o centros de investigación con sus conocimientos, consejos y permitiéndome usar sus equipos, muchas gracias por ayudarme y recibirme siempre con una sonrisa.

También quiero dar las gracias a todos los amigos que comparten sus vidas conmigo y que me han ayudado tanto en esta etapa; los biólogos que tantas cosas hemos compartido y seguimos compartiendo, a mis amigas mirobrigenses, que pese a la distancia, el tiempo no pasa entre nosotras, a Anita, Pedro, Rosa y Antonio por formar parte de mi vida. También estaré eternamente agradecida a Jose y Ágatha por

habernos acogido durante mi estancia y que nos sintiéramos como en casa desde el primer día, no puedo sentirme más afortunada de haber compartido tantos buenos momentos con vosotros y por haberme dado la oportunidad de conocer a las dos grandes personas que sois. Gracias a todos por escucharme y ayudarme y en definitiva por compartir conmigo lo más preciado que tenemos, el tiempo. Una mención especial a Luna y a Belén porque me han acompañado en los momentos en los que más las necesitaba.

A Lucho, por darme su apoyo incondicional, por demostrarme cada día que es la mejor persona que puedo tener a mi lado, por ver siempre el lado bueno de las cosas, por confiar en mí y por hacerme feliz.

Al apoyo, cariño y amor infinito que he recibido siempre de mi familia, sin el cual no hubiera sido posible llegar hasta aquí. A mi abuelita, la persona más generosa que he conocido jamás y a la que echo de menos cada día. A mi Tata, a Elena y a Montse por sus consejos, su cariño y por preocuparse tanto por mí. A Donna por ser mi fiel compañera y porque sin saberlo me ha ayudado cada día sacándome infinitas sonrisas. A mi hermanita, que no tengo palabras de agradecimiento suficientes para demostrarle lo afortunada que me siento de tenerla como hermana y por todo lo que comparte conmigo. A mi padre, porque desde pequeña despertó mi interés por preguntarme por qué suceden las cosas que nos rodean y porque se vuelca cada día en intentar que estemos bien. Y por último quiero agradecer a la persona más importante de mi vida, aunque ya no pueda leer estas líneas, pero yo sé que me cuida esté donde esté y me ha mandado mucha fuerza para poder continuar y para poder realizar este trabajo. Solo quiero que sepas que lo mejor que me ha pasado en la vida ha sido tenerte como madre.

A mi familia y a Lucho

El trabajo realizado en esta tesis doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos y comunicaciones a congresos:

Artículos:

Gil-Sánchez, I.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Cueva, C.; Martín-Cabrejas, M.A.; Sanz-Buenhombre, M.; Guadarrama, A.; Moreno-Arribas, M.V.; Bartolomé, B. Chemical characterization and *in vitro* colonic fermentation of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (2017), 97, 3433-3444.

González-Paramás, A.M.; Ayuda-Durán, B.; Martínez, S.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C. The mechanisms behind the biological activity of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*. (2018 Jul 5).DOI: 10.2174/0929867325666180706104829.

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Miranda-Vizueté, A.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Epicatechin modulates stress-resistance in *C. elegans* via Insulin/IGF-1 signaling pathway. *Plos One*. Enviada para su publicación, en periodo de revisión. Disponible online en la plataforma bioRxiv (2018 Jun 11).

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Gil-Sánchez, I.; Moreno-Arribas, M.V.; Bartolomé, B.; Sanz-Buenhombre, M.; Guadarrama, A.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Antioxidant characterization and biological effects of grape pomace extracts supplementation in *Caenorhabditis elegans*. Enviada a *European Food Research and Technology*.

Comunicaciones a congresos:

González-Manzano, S.; Ayuda-Durán, 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), 2013 Oct 16-19. (Póster)

Ayuda-Durán, B.; González-Paramás, A.M.; González-Manzano, S.; Villanueva, S.; Guadarrama, A.; Sanz-Buenhombre, M.; Santos-Buelga, C. Bioactivity of a winery byproduct: phenolic composition and biological effects in *Caenorhabditis elegans*. 8th World congress on polyphenols applications, Lisboa (Portugal), 2014 Jun 5-6. (Póster)

Ayuda-Durán, B.; González-Paramás, A.M.; González-Manzano, S.; Delgado-Ciruelos, L.; Santos-Buelga, C. Biochemical changes in *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. 8th World congress on polyphenols applications, Lisboa (Portugal), 2014 Jun 5-6. (Póster)

Delgado-Ciruelos, L.; González-Paramás, A.M.; González-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. 62nd Internacional congress

and annual meeting of the society of medicinal plant and natural product research, Guimarães (Portugal), 2014 Aug 31- Sep 4. (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 (España), 2015 Mar 5-6. (Póster)

Gil-Sánchez, I.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Sanz-Buenhombre, M.; Guadarrama, A.; Cueva, C.; Guadarrama, A.; Cueva, C.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, V. Chemical and antioxidant characterization and *in vitro* colonic metabolism of grape pomace extracts. 9th World congress on polyphenols applications. Malta, 2015 Jun 3-5. (Póster)

González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S. Exploring the involvement of the insulin/IGF-1 pathway in the enhancing effects of quercetin and epicatechin on oxidative resistance. Assays in *C. elegans* mutant strains. VII Conference on polyphenols and health. Tours (Francia), 2015 Oct 27-30. (Póster)

González-Manzano, S.; Ayuda-Durán, B.; González-Paramás, A.M.; Delgado, L.; Santos-Buelga, C. *C. elegans* as a model to elucidate the mechanisms of action of flavonoids: a transcriptomic approach. VII Conference on polyphenols and health. Tours (Francia), 2015 Oct 27-30. (Oral)

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Corchete-Sánchez, P.; Rodríguez-Romero, M.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Molecular mechanisms involved in the effects of Quercetin and Epicatechin in *Caenorhabditis elegans*. The XXVIIIth international conference on polyphenols. Viena (Austria), 2016 Jul 11-15.

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Rodríguez-Romero, M.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Influence of quercetin and epicatechin on the expression of genes related with insulin/igf-1 signaling pathway using *Caenorhabditis elegans*. VI Spanish Worm Meeting. Valencia (España), 2017 Mar 9-10. (Póster)

González-Paramás, A.M.; Ayuda-Durán, B.; Santos-Buelga, C. Transcriptome sequencing analysis in *Caenorhabditis elegans* treated with flavonoids. VI Spanish worm meeting. Valencia (España), 2017 Mar 9-10. (Póster)

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Influencia de epicatequina sobre el estado oxidativo de *Caenorhabditis elegans*. II Congreso nacional de jóvenes investigadores en ciencia, ingeniería y tecnología de los alimentos. León (España), 2017 Oct 19-20. (Póster).

Otros artículos y comunicaciones relacionados:

Espín, S.; González-Manzano, S.; Taco, V.; Poveda, C.; Ayuda-Durán, B.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Phenolic composition and antioxidant activity of yellow and purple-red ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*. (2016) 194, 1073–1080.

Cueva, C.; Gil-Sánchez, I.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules*. (2017), 22, pii: E99.

Onierczyk, A.K.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Influence of *Humulus lupulus* L. flavonoids on stress resistance and the ageing process in *C. elegans*. VII conference on polyphenols and health. Tours (Francia), 2015 Oct 27-30. (Póster)

González-Paramás, A.M.; Espín, S.; Fernández-Alvárez, D.; Mendo-Hernández, J.; González-Manzano, S.; Ayuda-Durán, B.; Santos-Buelga, C. Chemical characterization of phenolic compounds in ciruelo (*Spondias purpurea* L.) and naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) The XXVIIIth international conference on polyphenols. Viena (Austria), 2016 Jul 11-15. (Póster)

Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Evaluación de la bioactividad del ácido protocatéquico en *Caenorhabditis elegans*. II Congreso nacional de jóvenes investigadores en ciencia, ingeniería y tecnología de los alimentos. León (España), 2017 Oct 19-20. (Póster)

Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; José J. Pérez-Alonso, Begoña Ayuda-Durán, Eva Sánchez-Hernández, Ana M. González-Paramás, Celestino Santos-Buelga, Susana González-Manzano. Preparation of phenolic metabolites from dietary polyphenols: protocatechuic acid sulfates. I Jornadas de Jóvenes Investigadores INNOVA SALAMANCA. Salamanca (España), 2018 May 4-5. (Póster)

Sánchez-Hernández, E.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Evaluation of the mechanisms of action involved in the biological activity of polyphenols using an *in vivo* model. I Jornadas de Jóvenes Investigadores INNOVA SALAMANCA. Salamanca (España), 2018 May 4-5. (Oral)

ABREVIATURAS

4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

8OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

ABC: *ATP-Binding Cassette*

ABTS: (2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)

AMP: adenosín monofosfato

AMPK: quinasa activada por AMP

AP-1: *Activator Protein-1*

ARE: elementos de respuesta antioxidante

BCRP: *Breast Cancer Resistant Protein*

BHT: butilhidroxitolueno

BSA: albúmina de suero bovino

C: catequina

CaMKII: quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina tipo II

CAT: catalasa

CBG: β -glucosidasa citosólica

CE: energía de colisión

CND: cordón nervioso dorsal

CNV: cordón nervioso ventral

COMT: catecol-*o*-metiltransferasas

Ct: ciclo umbral (threshold cycle)

CTL: catalasa

DAD: detector de espectrofotometría de diodos

DBEs: elementos de unión de DAF-16 (*DAF-16 Binding Elements*)

DCF: diclorofluoresceína

DCFH-DA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DMSO: dimetilsulfóxido

DNPB: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DOPAC: ácido 2-(3,4-dihidroxifenil) acético

DP: *Declustering Potential*

EA: ácido elágico

EAG: equivalentes de ácido gálico

EC: epicatequina

ECA: enzima convertidora de angiotensina

ECG: epicatequina-3-*O*-galato

ECV: enfermedades cardiovasculares

EGC: epigalocatequina

EGCG: epigalocatequina-3-*O*-galato

EMS: *Enhanced MS*

eNOS: enzima óxido-nítrico sintasa endotelial

EP: potencial de entrada

EPI: *Enhanced Product Ion*

ESI: onda de ionización por electrospray

FMD: dilatación mediada por flujo

FRAP: poder antioxidante de reducción del hierro

FTC: fluoresceína tiosemicarbazida

FUdR: 5-fluoro-2'-desoxiuridina

GA: ácido gálico

GC: galocatequina

GCS: γ -glutamylcisteína sintetasa

GFP: proteína verde fluorescente

GPA: ganglio preanal

GPx: glutatión peroxidasa

GRD: ganglio de la raíz dorsal.

GRV: ganglio retrovesicular

GSH: glutatión (forma reducida)

GSK: glucógeno sintasa quinasa

GST: glutatión-S-transferasa

GuHCl: clorhidrato de guanidina

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HIF: factor inducible de hipoxia

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HSEs: elementos de choque térmico (*Heat Shock Elements*)

HSF: factor de transcripción de choque térmico

HSP: proteínas de choque térmico

IGF-1: factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor*)

IIS: señalización por insulina/IGF-1 (*Insulin/IGF-1 Signaling*)

JNK: quinasas c-Jun N-terminal (*Jun N-terminal Kinases*)

K: kaempferol

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LPH: lactasa-floricín hidrolasa

LPS: lipopolisacáridos

M: miricetina

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MDA: malondialdehído

MRP: proteínas de resistencia a múltiples fármacos (*Multidrug Resistance Proteins*)

MS: espectrometría de masas

MTL: metalotioneína

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NGM: *Nematode Growth Medium*

NO[•]: óxido nítrico

NOS: enzima óxido nítrico sintasa

NQO-1: NAD(P)H-quinona oxidoreductasa

NRF2: factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (*Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2*)

•OH: radical hidroxilo

¹O₂: oxígeno singlete

O₂^{-•}: anión superóxido

ONOO⁻: peroxinitrito

OPAC: ácido 2-(3-hidroxifenil) acético

PBS: buffer fosfato salino

PCA: ácido 3,4-dihidroxibenzoico (= ácido protocatéquico)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD: procianidina dímera

PDK: quinasa dependiente de 3-fosfoinositol

PIP2: fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

Q: quercetina

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RCS: especies reactivas de cloro

RNS: especies reactivas de nitrógeno

RO[•]: radical alcoxilo

ROO[•]: radical peroxilo

ROS: especies reactivas de oxígeno

RRC: *Redox-Stress Response Capacity*

RT: transcripción reversa

SGLT: transportador de glucosa dependiente de sodio

sHSP: proteínas de choque térmico pequeñas

SOD: superóxido dismutasa

SULT: sulfotransferasas

TCA: ácido tricloroacético

TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

TIR: receptor Toll/IL

TOR: *Target Of Rapamycin*

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina

T_R: tiempo de retención

U.A.: unidades arbitrarias

UBA-1: enzima E1 activadora de ubiquitina

UGTs: uridin-5'-difosfato glucuronosiltransferasas

UPR^{mt}: respuesta mitocondrial a proteínas desplegadas

UV: ultravioleta

XO: xantina oxidasa



ÍNDICE



I. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
2.1.1 Características generales.....	9
2.1.2 Anatomía.....	11
2.1.3 Ciclo de vida	17
2.1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo.....	18
2.2 Flavonoides	20
2.2.1 Descripción y características	20
2.2.2 Flavonoles.....	23
2.2.3 Flavan-3-oles	24
2.2.4 Actividad y disponibilidad de flavonoides.....	28
2.2.4.1 Estudios epidemiológicos.....	28
2.2.4.2 Biodisponibilidad y metabolismo	34
2.2.4.3 Actividad antioxidante y flavonoides	42
2.3 Rutas moleculares y genes implicados en envejecimiento y respuesta a estrés.....	49
2.4 Estudios de flavonoides (flavan-3-oles y flavonoles) en <i>Caenorhabditis elegans</i>	60
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
3.1 Materiales y equipos	73
3.1.1 Equipos	73
3.1.2 Materiales, reactivos y disolventes	74
3.1.3 Material biológico	75
3.1.4 Extractos de orujo de uva.....	75
3.2 Métodos	76
3.2.1 Determinación de polifenoles totales.....	78
3.5.2 Determinación de la capacidad antioxidante.....	78
3.2.3 Análisis de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS.....	80
3.2.4 Preparación de placas Petri NGM	83
3.2.5 Preparación <i>E. coli</i> OP50 como fuente de alimento	83
3.2.6 Sembrado en placas NGM.....	84
3.2.7 Preparación de placas para los ensayos con flavonoides	85
3.2.8 Sincronización de <i>C. elegans</i>	86

3.2.9 Ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente.....	87
3.2.10 Ensayos de longevidad	87
3.2.11 Ensayos de determinación de ROS.....	88
3.2.12 Obtención de homogeneizados de <i>C. elegans</i> para determinación de proteínas totales, productos de peroxidación lipídica y proteínas carboniladas.....	89
3.2.13 Determinación de productos de peroxidación lipídica	89
3.2.14 Determinación de proteínas carboniladas	91
3.2.15 Cuantificación de ARNm por RT-PCR cuantitativa	92
3.2.16 Cuantificación y visualización de fluorescencia	94
3.2.17 Análisis estadísticos.....	95
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
4.1 Estudios con extractos de subproductos de vinificación ricos en compuestos fenólicos.....	99
4.1.1 Introducción	99
4.1.2 Caracterización química de los extractos de extractos fenólicos de uva.....	101
4.1.3 Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos fenólicos de uva	105
4.1.4 Efectos de los extractos fenólicos de uva en la resistencia de <i>C. elegans</i> al estrés.....	107
4.1.5 Efectos de los extractos fenólicos de uva en longevidad de <i>C. elegans</i>	112
4.1.6 Comentarios finales.....	115
4.2 Estudios con epicatequina	117
4.2.1 Introducción	117
4.2.2 Efectos biológicos de epicatequina	119
4.2.2.1 Estrés térmico	119
4.2.2.2 Niveles intracelulares de ROS.....	122
4.2.2.3. Daño oxidativo: carbonilación de proteínas y productos de peroxidación de lípidos	129
4.2.3 Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos biológicos de epicatequina.....	138
4.2.3.1 Influencia de epicatequina en genes relacionados con resistencia al estrés y de la ruta de la insulina. Ensayos con mutantes y cuantificación de la expresión de ARNm mediante RT-qPCR.....	138
4.2.3.2 Cuantificación de la expresión génica mediante el uso de reporteros fluorescentes en estirpes transgénicas de <i>C. elegans</i>	149
4.2.4 Comentarios finales.....	157

4.3 Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos biológicos de quercetina	159
4.3.1 Introducción	159
4.3.2. Influencia de quercetina en genes relacionados con resistencia al estrés y de la ruta de la insulina. Ensayos con mutantes y cuantificación de la expresión de ARNm mediante RT-qPCR.....	162
4.3.3 Cuantificación de la expresión génica mediante el uso de reporteros fluorescentes en estirpes transgénicas de <i>C. elegans</i>	174
4.3.4 Comentarios finales.....	185
V. CONCLUSIONES GENERALES	186
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	186



I. INTERÉS Y OBJETIVOS



En las últimas décadas los compuestos fenólicos en general, y los flavonoides en particular, han despertado el interés de los investigadores como posibles responsables de los efectos saludables que se observan en estudios epidemiológicos que correlacionan la ingesta de dietas ricas en frutas y verduras con la disminución de distintos tipos de enfermedades, como enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos o determinados tipos de cáncer, entre otras (Yuan et al., 2011; Zamora-Ros et al., 2013). Dado el potencial que presenta este tipo de compuestos, ampliamente representados en la dieta humana, se están llevando a cabo numerosos estudios científicos sobre su actividad, biodisponibilidad, metabolismo y mecanismos de acción. Además, ha aumentado el interés de empresas que explotan determinados subproductos para la obtención de compuestos polifenólicos con diferentes aplicaciones en los campos de la dietética, farmacología o cosmética.

La capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides está ampliamente documentada y durante mucho tiempo se ha utilizado esta propiedad como argumento para justificar los efectos beneficiosos observados en modelos *in vitro* o *ex vivo* de cáncer o enfermedades cardiovasculares. Inicialmente se postuló que podía tratarse de un efecto antioxidante directo, es decir atribuible a su capacidad reductora y captadora de radicales libres, pero los conocimientos que actualmente se tienen sobre su amplia biotransformación metabólica (que modificaría sus características antioxidantes), unido a sus bajas concentraciones a nivel plasmático y tisular y la falta de evidencias claras en estudios de intervención clínica llevados a cabo con antioxidantes, hacen pensar que los efectos *in vivo* puedan estar más relacionados con mecanismos indirectos, que pudieran tener mayor relevancia biológica, que con la simple participación directa en reacciones de óxido-reducción. Hay evidencias que apuntan a la existencia de un doble mecanismo de acción dosis-dependiente, de manera que serían necesarias elevadas concentraciones de flavonoides para que se observaran efectos antioxidantes directos, mientras que concentraciones bajas, como las que podrían existir en los sistemas biológicos tras el consumo de alimentos, desencadenarían mecanismos de señalización celular más complejos (Tang y Halliwell, 2010).

En los últimos años se ha acumulado conocimiento sobre la biodisponibilidad de los flavonoides y las transformaciones metabólicas de las que son objeto en el organismo humano, que apuntan a la existencia de una baja disponibilidad y amplia biotransformación tanto por enzimas endógenas del organismo como por acción de la microflora intestinal (Santos-Buelga y González-Paramás, 2016). Sin embargo, a pesar del creciente interés en los flavonoides y otros compuestos fenólicos como componentes potencialmente protectores frente al desarrollo de enfermedades en humanos, la contribución real de estos compuestos en el mantenimiento de la salud y los mecanismos precisos a través de los que los flavonoides y/o sus metabolitos ejercen las acciones biológicas observadas en los estudios *in vitro* o concluidas de los estudios epidemiológicos siguen sin esclarecerse. Además, la mayor parte de los estudios que abordan los mecanismos de acción de los flavonoides se han llevado a cabo en modelos *in vitro* o *ex vivo*, lo que limita la extrapolación de los resultados obtenidos.

Para avanzar en la respuesta a alguno de estos interrogantes, parece adecuada la utilización de organismos modelo como *Caenorhabditis elegans*, que ofrece una gran versatilidad, facilidad de uso, ciclo de vida corto y que posee rutas metabólicas similares a las descritas en humanos. Adicionalmente, este modelo presenta la ventaja de ser un organismo bien caracterizado genómicamente, con un sistema completo de órganos y tejidos, y del que se dispone de una amplia colección de mutantes y cepas transgénicas, lo que permite comprobar si determinados genes, enzimas o factores de transcripción son esenciales para el mecanismo de acción de los flavonoides en rutas metabólicas o de señalización celular concretas.

El **objetivo general** de esta tesis doctoral es avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción responsables de los efectos biológicos asociados al consumo de alimentos ricos en flavonoides, utilizando *C. elegans* como modelo. Para alcanzar este objetivo general se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

- Establecer en *C. elegans* los efectos de extractos ricos en compuestos fenólicos obtenidos a partir de subproductos de vinificación y su posible relación con la composición de las muestras.
- Evaluar la actividad de flavonoides sobre marcadores de efecto frente al envejecimiento y/o estrés oxidativo (producción de especies reactivas de oxígeno, lípidos peroxidados y proteínas carboniladas).
- Evaluar la influencia de epicatequina y quercetina, flavonoides mayoritarios en la dieta humana, sobre la resistencia de *C. elegans* al daño oxidativo.
- Estudiar la respuesta/actividad de los principales genes y factores de transcripción implicados en la ruta de la insulina/IGF-1 frente a epicatequina y quercetina.
- Concluir sobre posibles rutas de señalización implicadas en los mecanismos de acción de flavonoides.



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2.1 *Caenorhabditis elegans*

2.1.1 Características generales

Caenorhabditis elegans son gusanos **nematodos**, vulgarmente conocidos como gusanos redondos, pertenecientes a la familia Rhabditidae. Fueron descritos por primera vez en 1900 como *Rhabditis elegans*, modificándose posteriormente su nombre a *Caenorhabditis elegans*, como se conocen actualmente. Su significado etimológico es *Caeno*: nuevo, *rhabditis*: varilla, *elegans*: bonita. La cepa más utilizada en investigación es la cepa Bristol, aislada por L.N. Staniland de detritos de hongos por primera vez en 1959 en Bristol (Inglaterra), de la cual Sydney Brenner obtuvo la cepa N2. Actualmente, la cepa N2 es la cepa silvestre de referencia (Wood, 1988). Este nematodo fue propuesto como **organismo modelo** para estudios de biología del desarrollo, especialmente útil en estudios genéticos y del sistema nervioso, por Sydney Brenner en 1965 (Brenner, 1974), quien posteriormente fue galardonado con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2002, junto a John E. Sulston y H. Robert Horvitz, por su labor en el desciframiento del linaje celular de *C. elegans* y en los descubrimientos de la muerte celular programada. Desde entonces, *C. elegans* se ha convertido en un importante modelo de estudio para distintos campos de la biología, incluyendo biología celular, neurofisiología y envejecimiento. En su corta vida como organismo modelo ha contribuido a la obtención de otros dos premios Nobel: en 2006 a Andrew Fire y Craig Mello por el desarrollo de la novedosa técnica de silenciamiento génico mediante ARN de interferencia (RNAi), que fue descrita por primera vez en este gusano; y en 2008 a Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien, que recibieron el Premio Nobel de Química por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP (Corsi et al., 2015).

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre que habita en el suelo, capaz de tolerar un amplio rango de temperaturas intermedias, por lo que se encuentra en la mayoría de las **regiones templadas** del mundo. Se **alimenta principalmente de microorganismos**, sobre todo de bacterias, como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. Los adultos presentan un tamaño aproximado de **1 mm de longitud y 70-80 µm** de diámetro. Sus movimientos son ondas sinusoides en el eje dorso-ventral.

Su **cultivo** y reproducción en el **laboratorio es sencillo** y barato, únicamente necesita un ambiente húmedo, temperatura entre 10 y 25 °C, oxígeno atmosférico y una fuente de alimento, como cepas no patógenas de la bacteria *E. coli*. Se pueden cultivar a gran escala tanto en medio líquido como en medio sólido usando placas Petri de agar. 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 una lupa binocular. Otras características importantes del nematodo son la **eutelia** o número de células constante (concretamente el gusano hermafrodita presenta 959 células somáticas y el gusano masculino 1031), y la presencia de un **linaje celular prácticamente invariable** (cada nematodo desarrolla exactamente la misma división celular y la misma diferenciación) (Sulston et al., 1983). Estas características han sido claves para la detección y obtención fiable de fenotipos mutantes (Wood, 1988 y Hope, 1999). Otra ventaja del trabajo con estos gusanos es que existen métodos de almacenamiento de las cepas silvestres y mutantes que permiten su conservación de manera indefinida mediante congelación a -80 °C. Actualmente existen extensas colecciones de mutantes (Sulston y Hodgkin, 1988).

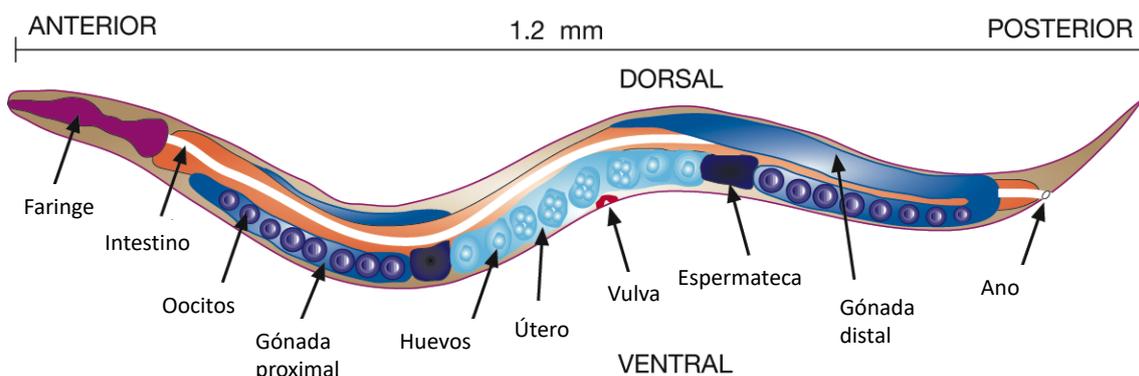


Figura II.1. Diagrama de un adulto hermafrodita de *C. elegans*.

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1930/>

En 1998, *C. elegans* fue el primer organismo multicelular cuyo genoma fue completamente secuenciado. El tamaño de su genoma es pequeño, concretamente consta de 100 291 840 pares de bases (pb) nitrogenadas y 20 115 genes codificantes

de proteínas según los últimos datos de Wormabase (Wormbase release WS 262). Numerosos estudios con *C. elegans* y la comparación de su genoma con el humano han permitido establecer una alta conservación de las rutas moleculares y celulares entre nematodos y mamíferos, así como la presencia en *C. elegans* de muchos de los genes implicados en enfermedades humanas (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

2.1.2 Anatomía

- **Morfología**

La estructura anatómica de *C. elegans* se recoge en la Figura II.1 Al igual que otros nematodos, presenta un cuerpo cilíndrico estrechado en los extremos, no segmentado, con simetría bilateral. Su cuerpo está formado por dos tubos concéntricos, **un tubo exterior** y **un tubo interior** separados por un espacio relleno de líquido llamado pseudoceloma (Figura II.2). La forma del animal se mantiene por la presión hidrostática interna.

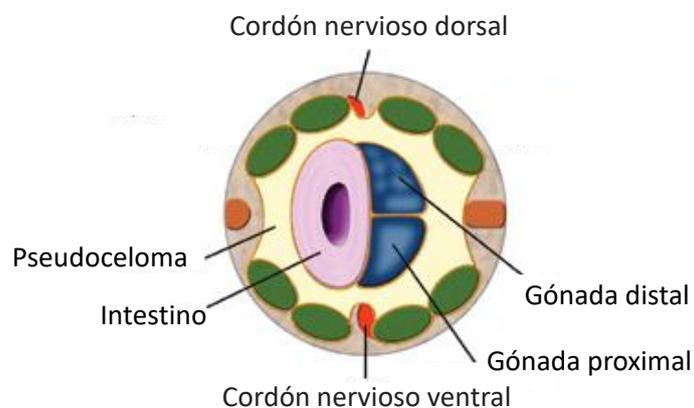


Figura II.2. Sección transversal de la parte posterior de *C. elegans*.

Fuente: <http://www.wormatlas.org/>

El tubo externo está formado por cutícula, hipodermis, musculatura, sistema nervioso, sistema excretor, gónadas y coelomocitos. El tubo interno está formado por el músculo de la faringe junto a su sistema nervioso autónomo y el intestino (Riddle et al., 1997). Para proteger el cuerpo del medio ambiente, el tubo externo está cubierto de una **cutícula** formada por diferentes proteínas, principalmente colágeno, que son secretadas por la hipodermis subyacente. En cada estado larvario, se forma una nueva

cutícula y la anterior es desprendida. En la cutícula existen unas estructuras alargadas que recorren el cuerpo longitudinalmente, denominadas alas, que son producidas por células de la hipodermis (Krammer, 1994).

La **musculatura** del cuerpo se organiza en cuatro bandas longitudinales que se unen a la cutícula a través de la hipodermis y se encuentran inervadas por los cordones nerviosos dorsales (CND) y ventrales (CNV) (Moerman y Fire, 1997). La contracción y relajación de dicha musculatura permite el movimiento sinusoidal del gusano, en el plano dorso ventral (Driscoll y Kaplan, 1997). En la zona de la cabeza son capaces de realizar movimientos algo más elaborados para la búsqueda de alimento, al igual que en la cola de los machos para el apareamiento (Hope, 1999).

- **Sexo y sistema reproductor**

Existen dos sexos, **macho** y **hermafrodita**, siendo esta última forma la más abundante. *C. elegans* posee 5 cromosomas somáticos diploides (I, II, III, IV, V) y un cromosoma sexual. Este último determina el sexo; en hermafroditas es diploide (XX) y en machos es haploide (XO) (Hodgkin et al., 1979).

Los hermafroditas producen esperma y oocitos y pueden reproducirse por autofecundación, sin apareamiento. Son hermafroditas protándricos; en primer lugar, producen esperma al final de la etapa larvaria y después, una vez que ya son adultos, producen los oocitos. El gusano hermafrodita adulto estructuralmente es femenino, ya que produce oocitos y el esperma ha sido producido previamente y almacenado en su espermateca. Los gusanos hermafroditas producen más oocitos que espermatozoides, por lo que el tamaño de la camada está limitado por el número de espermatozoides (Wood, 1988). Los gusanos macho solo producen esperma, por lo que para reproducirse necesitan copular con un gusano hermafrodita. Después del apareamiento el esperma del macho compite con el propio esperma del hermafrodita en la fertilización de los oocitos y la mayoría de la progenie es resultado de la fecundación cruzada.

La fertilización cruzada produce machos y hermafroditas en igual proporción, ya que los espermatozoides producidos por el macho no tienen cromosoma X, y la progenie puede alcanzar más de 1000 individuos. Por otro lado, la autofecundación

produce solo hermafroditas, generando una progenie aproximada de 300 gusanos durante su vida reproductiva (Hope, 1999). Los machos pueden aparecer de forma espontánea a partir de poblaciones hermafroditas mediante la eliminación de un cromosoma X, con una frecuencia de aproximada de 0,1 % (Hodgkin, 1979). La autofecundación produce individuos genéticamente idénticos, mientras que la fecundación cruzada aumenta la variabilidad genética. Anatómicamente los dos sexos se diferencian en la cola (Figura II.3), el hermafrodita presenta una simple punta y el macho posee una estructura compleja con forma de abanico, formada por una bolsa copulatoria con multitud de receptores sensoriales y dos espículas copulatorias contráctiles que le permiten el apareamiento. El macho es ligeramente más delgado y pequeño que el hermafrodita (Lewis y Fleming, 1995).

Las **gónadas** en ambos sexos son una simple estructura tubular, en la cual tiene lugar la replicación de la línea germinal a través de la división nuclear formando un sincitio. En el macho la gónada presenta un único lóbulo y consta de un testículo donde se forman los espermatoцитos y una vesícula seminal, donde maduran y se almacenan hasta el momento de la eyaculación. La vesícula seminal conecta a través de un vaso deferente con la cloaca y con las espículas copulatorias para expulsar el esperma durante la cópula (Hope, 1999). En los hermafroditas la gónada presenta dos lóbulos simétricos en forma de U que terminan en un útero común y éste conectado con la vulva, situada ventralmente en la mitad del nematodo, que comunica con el exterior y sirve tanto para la salida de embriones como para la entrada del esperma del macho. En cada lóbulo existe un ovario conectado por un oviducto a la espermateca, lugar donde se almacenan los espermatozoides y se produce la fertilización (Hirsh et al., 1976). Los oocitos avanzan hacia la espermateca a través del oviducto, se fecundan y los embriones continúan su avance. Los huevos fertilizados pasan al útero donde se desarrollan internamente durante varias horas. Para la puesta de huevos son necesarias contracciones musculares vulvares y uterinas mediadas por neuronas específicas (Wood, 1988).

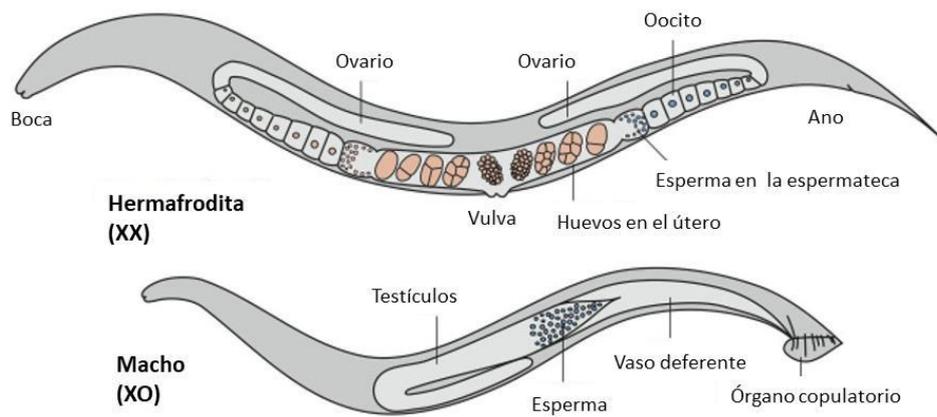


Figura II.3. Anatomía de *C. elegans*. Principales estructuras anatómicas de un individuo hermafrodita y un macho. Fuente: <https://www.mun.ca/biology/>

- **Sistema digestivo**

El sistema digestivo está formado por una faringe y un intestino, que se extiende desde la cabeza a la cola. Está recubierto por una membrana basal que lo separa del espacio pseudocelomático. El sistema digestivo se divide en el intestino anterior (Estomodeo; cavidad bucal y faringe), intestino medio e intestino grueso (Proctodeo; recto y ano en hermafroditas o cloaca en los machos). La faringe (Figura II.4) es una bomba neuromuscular que está formada por células epiteliales, musculares y nerviosas organizadas en simetría trirradial y recubiertas por una membrana basal. La ingestión del alimento, bacterias normalmente, se produce gracias a contracciones musculares coordinadas de la faringe, que además presenta dos estructuras bulbares, conectadas entre sí, que permiten el procesamiento de la comida. La faringe bombea el alimento al intestino desde el bulbo terminal a través de la válvula faríngeo-intestinal. La contracción de la faringe es regular y está determinada por la calidad y disponibilidad de alimento, siendo mayor en situaciones de demanda energética (Corsi et al., 2015).

Existen glándulas intestinales a nivel de la faringe y del recto. Los productos de desecho se eliminan a través de la abertura del ano o cloaca, según el sexo del gusano (Bird y Bird, 1991).

Caenorhabditis elegans es un predador voraz que ingiere cualquier cosa que se ajuste a su boca. En el laboratorio esto se traduce en que *E. coli*, bacteria normalmente usada como alimento del gusano en los medios de cultivo, es ingerida por el nematodo con una eficiencia de casi un 50 % (Lewis y Fleming, 1995).

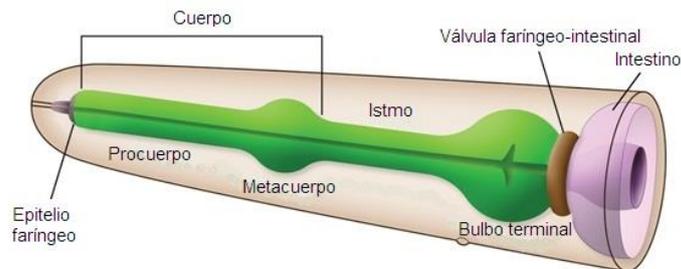


Figura II.4. Anatomía faríngea de *C. elegans*. Fuente: <http://www.wormatlas.org/>

- **Sistema inmune**

Los celomocitos se encuentran en varias especies de nematodos. Son células esféricas presentes en la cavidad pseudocelomática de *C. elegans*, tanto en larvas como en adultos. Los celomocitos se caracterizan porque tienen grandes inclusiones citoplasmáticas y vacuolas. Estas células son capaces de endocitar y acumular diferentes macromoléculas por lo que se ha sugerido que ejercen cierta actividad inmune, eliminación de sustancias y funciones hepáticas. A diferencia de los macrófagos, los celomocitos de *C. elegans* no parecen ser capaces de fagocitar y su posición en el cuerpo es relativamente fija por lo que dependen del movimiento del animal y de los fluidos de la cavidad corporal para acceder a las sustancias extrañas. (Fares y Grant, 2002).

- **Sistema nervioso**

Los gusanos hermafroditas presentan 302 células nerviosas, mientras que los machos poseen 79 células nerviosas adicionales, lo que puede explicarse por su comportamiento sexual. El sistema nervioso de *C. elegans* es simple, encargándose de coordinar el comportamiento rutinario y responder a factores medioambientales como temperatura, estímulos mecánicos o un amplio rango de compuestos químicos (Hope, 1999).

Los cuerpos celulares de las neuronas se encuentran alrededor de la faringe, del cordón nervioso ventral y de la cola. La mayoría de las prolongaciones de estas células forman un anillo circunfaríngeo alrededor de la membrana basal de la faringe o están unidas a los cordones nerviosos ventral o dorsal (Figura II.5) (Riddle et al, 1997). La mayoría de las neuronas presentan una estructura simple con una o dos neuritas (extensiones citoplasmáticas del soma de la neurona). Además de las neuronas, *C. elegans* presenta células similares a la glía, aunque de manera mucho menos numerosa que en vertebrados (Oikonomou y Shaham, 2011). Se pueden distinguir dos sistemas nerviosos independientes; por un lado, la faringe, aislada por una membrana basal del resto del animal, posee un sistema prácticamente autónomo formado por 20 neuronas y, por otro lado, un sistema nervioso somático formado por el resto de células nerviosas del gusano (Ward et al., 1975).

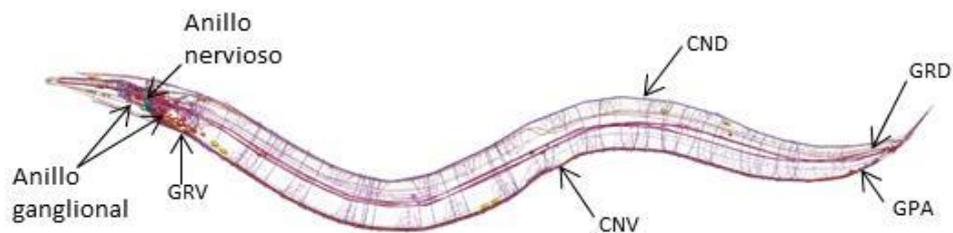


Figura II.5. Sistema nervioso de *C. elegans*. Los puntos representan los cuerpos celulares de las neuronas, las líneas representan los axones y las dendritas de las neuronas. CNV: cordón nervioso ventral; CND: cordón nervioso dorsal; GRV: ganglio retrovesicular; GPA: ganglio preanal; GRD: ganglio de la raíz dorsal. Fuente: OpenWorm (openworm.org).

- **Sistema excretor/secretor**

El sistema excretor/secretor es el responsable de la osmorregulación y de la secreción de glicoproteínas, posiblemente relacionadas con la formación de una capa superficial renovable sobre la cutícula. Está formado por 4 tipos de células: una célula excretora, que es la célula más grande del animal, una célula que forma un canal excretor que recorre todo el cuerpo longitudinalmente y que termina en otra célula que forma un poro de excreción/secreción, que consiste en una abertura en la superficie ventral hacia la región posterior de la cabeza. Por último, existe una glándula

excretora que también conecta con la célula del conducto y del poro (Nelson y Riddle, 1984).

2.1.3 Ciclo de vida

Un ciclo de vida completo de *C. elegans* (Figura II.6), hasta la formación del individuo adulto, dura aproximadamente 3,5 días a 20 °C y comprende un estado embrionario y 4 estados larvarios (L1-L2-L3-L4) (Brenner, 1974). Pequeñas variaciones de temperatura pueden acelerar o retrasar su desarrollo, pasando a completarse el ciclo en 3 días a 25 °C y en 6 días a 10 °C (Byerly et al., 1976).

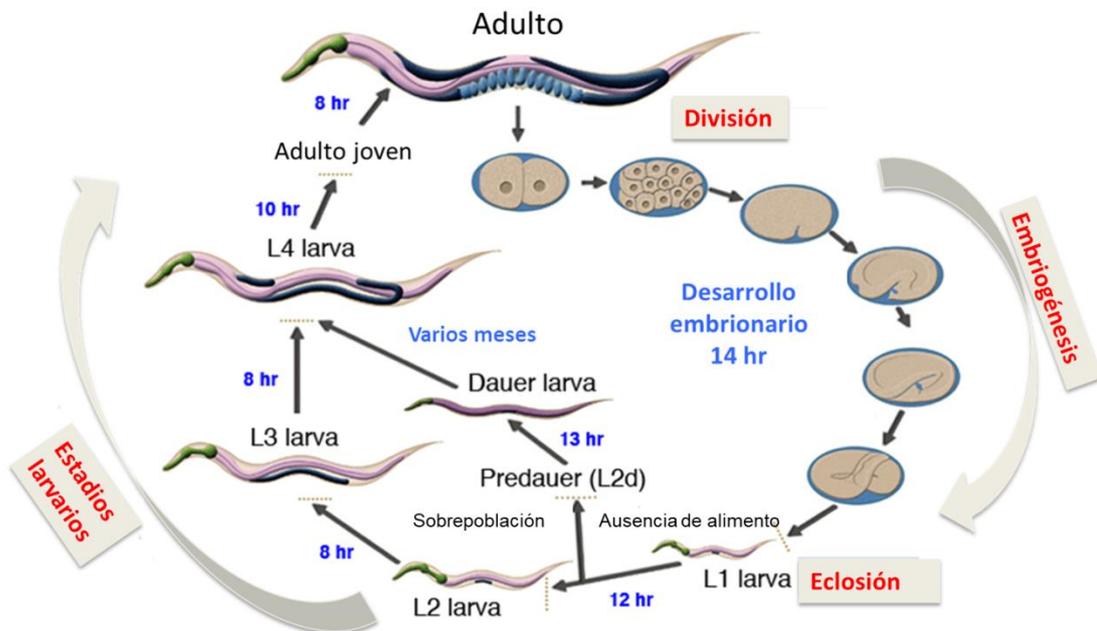


Figura II.6. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C. Fuente: <http://www.wormatlas.org/>

El desarrollo se puede dividir en dos fases: embriogénesis y desarrollo post-embrionario. La **embriogénesis** tiene lugar desde la fertilización hasta la eclosión del huevo y se produce en dos etapas: **proliferación** (divisiones celulares con una duración aproximada de 5,5 h post-fertilización a 22 °C, que tienen lugar durante las primeras horas en el interior del útero hermafrodita) y **organogénesis y morfogénesis** (diferenciación celular, que dura hasta aproximadamente las 14 h a 22 °C) (Sulston et al., 1983).

El **desarrollo post-embrionario** implica el crecimiento a través de 4 estados larvarios (L1 a L4), finalizando cada uno de ellos con una muda y formando en la última muda el individuo adulto. El adulto hermafrodita produce oocitos durante aproximadamente 4 días; al finalizar este periodo fértil el gusano adulto vive entre 10-15 días más (Hodgkin, 1988).

Existe un estado larvario diferente denominado **larva dauer**. Se forma en la segunda muda en condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento, como déficit de alimento, una densidad poblacional alta o temperaturas elevadas. Esto implica una alteración del metabolismo provocado por una detención del bombeo faríngeo y, por tanto, de la alimentación y una acumulación de grasas en células intestinales e hipodérmicas. La larva *dauer* también presenta una cutícula especializada. El gusano puede sobrevivir varios meses como larva *dauer* y reanudar su desarrollo cuando encuentra alimento y/o condiciones favorables, en cuyo caso comienza a alimentarse y muda a L4 recuperando el ciclo normal. Las larvas *dauer* se diferencian de las L3 en el tamaño, ya que son más delgadas y se mueven más rápidamente (Hope, 1999).

2.1.4 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

C. elegans es un importante **organismo modelo** en diferentes campos de investigación, como genómica, biología celular, neurociencias o envejecimiento, presentando numerosas ventajas frente a otros animales para desarrollar estudios *in vivo* (Riddle et al., 1997):

- Se trata de un organismo multicelular con un completo sistema de órganos y tejidos.
- Su cultivo en laboratorio es sencillo y barato gracias su pequeño tamaño, su corta vida media y su alimentación con bacterias. Además, su ciclo de vida corto y su alta tasa de reproducción permiten obtener grandes poblaciones rápidamente.
- La mayoría de los individuos son hermafroditas, lo que facilita su manipulación genética.

- Presenta un número de células constante. Además, el hecho de que las casi 1000 células que lo componen mantienen una posición conocida y constante hace que sea el mejor modelo para estudios de desarrollo, permitiendo obtener fácilmente mutantes alterando su linaje celular.
- Es transparente, lo que permite la visualización de su anatomía interna.
- Su genoma es pequeño y está completamente secuenciado. Además, existe una alta conservación de las rutas moleculares y celulares entre *C. elegans* y mamíferos, presentando una homología de un 60-80 % con genes humanos. Además, más del 40 % de los genes asociados a enfermedades humanas tienen ortólogos en el genoma de *C. elegans*. (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Kaletta et al., 2006).
- El *Caenorhabditis Genetics Center* (Universidad de Minnesota, EEUU) dispone de más de 3000 cepas mutantes y gusanos transgénicos a bajo precio (Shen et al., 2018).
- Existe una amplia variedad de herramientas genéticas disponibles para trabajar con *C. elegans*, como deleciones específicas, mutagénesis, microinyección de ADN, bombardeo biolístico y silenciamiento de genes mediante ARN de interferencia (RNAi) (Shen et al., 2018).

2.2 Flavonoides

2.2.1 Descripción y características

Los flavonoides son el grupo más importante de compuestos fenólicos sintetizados como metabolitos secundarios en vegetales. Juegan un papel relevante en ecofisiología vegetal, participando en procesos de propagación y en mecanismos de defensa frente a factores abióticos y bióticos de estrés. Se han descrito más de 8000 flavonoides de origen natural y continúan identificándose más compuestos pertenecientes a este grupo (Del Rio et al., 2013).

La estructura general de un flavonoide consta de 15 átomos de carbono que forman dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por un esqueleto de tres átomos de carbono (C6-C3-C6) que en la mayoría de clases está formando un tercer anillo heterocíclico (anillo C) (Figura II.7).

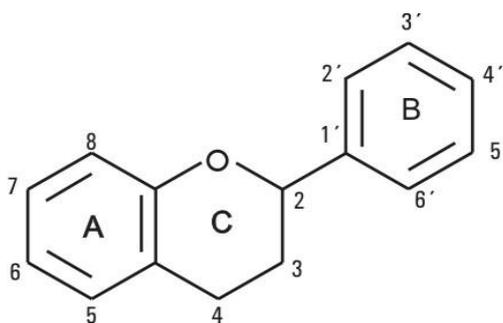


Figura II.7. Estructura general de un flavonoide.

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 las formas abiertas calcona y dihidrocalcona (Figura II.8).

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. De manera natural pueden encontrarse como aglicones 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 flavan-3-oles, la mayoría de los flavonoides existen habitualmente en sus medios naturales en forma de *O*-glicósidos, normalmente unidos a grupos hidroxilo en posiciones 3, 7 o 4', y menos frecuentemente como *C*-glicósidos ligados directamente a los carbonos C-6 o C-8. Los sustituyentes de azúcar más comunes son glucosa, ramnosa, galactosa y arabinosa, y los disacáridos rutinosa (α -1-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -d-glucopiranososa) y neohesperidosa (α -1-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -d-glucopiranososa). 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).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, legumbres, cereales, verduras y productos derivados, como té, chocolate, zumos, vino o cerveza, que son importantes constituyentes de la dieta humana. En los alimentos, la importancia de los flavonoides va más allá de sus implicaciones tecnológicas y propiedades organolépticas, ya que su presencia en los mismos se ha relacionado con efectos beneficiosos para la salud humana, tal y como respaldan estudios experimentales y epidemiológicos (Jaganath y Crozier, 2010).

A pesar de la gran variedad de flavonoides, en los alimentos comúnmente consumidos en nuestra dieta solo son destacables un número limitado de ellos. Estos compuestos incluyen derivados de tres antocianidinas (cianidina, delphinidina, malvidina), tres flavan-3-oles (catequina, epicatequina, epigallocatequina), tres flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina), dos flavanonas (hesperetina, naringenina) y dos flavonas (apigenina, luteolina). A escala mundial, se cree que los productos ampliamente consumidos más importantes en términos de contenido en flavonoides son el té verde y negro, el vino tinto y el cacao/chocolate, y en un segundo nivel, las frutas y las verduras (Santos-Buelga y González-Paramás, 2016).

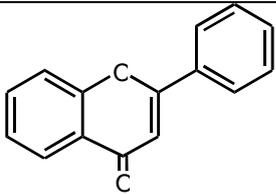
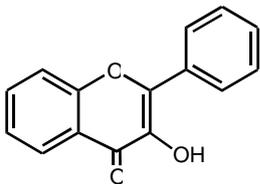
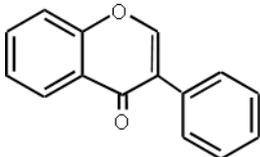
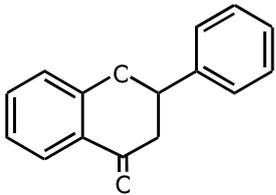
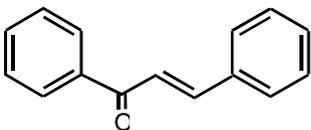
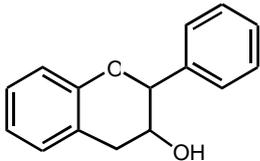
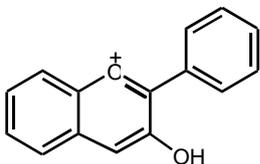
Clase de flavonoide	Estructura básica	Ejemplos
Flavonas		Apigenina, luteolina, crisina, escutelareina, diosmetina, crisoeriol
Flavonoles		Quercetina, kaempferol, miricetina, isoramnetina, tamarixetina, galangina, fisetina, morina
Isoflavonas		Genisteína, daidzeína, gliciteína, formononetina, biochanina A, puerarina
Flavanonas		Hesperidina, naringenina, taxifolina, eriodictiol, isosakuranetina
Calconas		Floretina, arbutina, buteína, naringenina-calcona
Flavan-3-oles		(Epi)catequina, (epi)galocatequina, proantocianidinas condensadas
Antocianos		Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, petunidina, peonidina

Figura II.8. Estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides.

Fuente: Santos-Buelga y González-Paramás (2014).

2.2.2 Flavonoles

Los flavonoles son los flavonoides más ampliamente distribuidos en vegetales. Su estructura química se caracteriza por la presencia de un grupo cetona en C4 y una insaturación entre C2 y C3 del anillo C. Su estructura está estrechamente relacionada con las flavonas, pero se diferencian en la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 de dicho anillo. En la Figura II.9 se recogen los aglicones de flavonoles más comunes en frutas, hortalizas y productos derivados. En el medio natural, los flavonoles se encuentran generalmente en forma glicosilada. La posición de la sustitución más habitual es la 3 aunque también es frecuente la glicosilación en 7, 3' y 4'. El azúcar más común es la glucosa y secundariamente galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, ribosa, fructosa o ácido glucurónico, así como disacáridos como rutinosa o neohesperidosa. Además, los azúcares pueden encontrarse adicionalmente esterificados. Los ácidos normalmente implicados son *p*-cumárico, cafeico, *p*-hidroxibenzoico, gálico, acético y malónico. Los compuestos más abundantes en los tejidos vegetales son los conjugados glicosídicos de quercetina, kaempferol, miricetina e isoramnetina; aunque menos frecuentes, también se encuentran aglicones de manera natural (Del Rio et al., 2013). En las plantas, los flavonoles están localizados principalmente en hojas, flores y partes externas, como cáscara y piel, y disminuyen en concentración hacia la zona central.

Los glucósidos de quercetina son los flavonoles más comunes de la dieta humana, ya que se encuentra en muy diversas frutas y hortalizas, siendo destacable su concentración en cebollas (200-1000 µg/g peso fresco). Los principales flavonoles de cebollas son quercetina 4'-*O*-glucósido y quercetina 3,4'-*O*-diglucósido y en menor cantidad isoramnetina-4'-*O*-glucósido. Las uvas *Vitis vinifera*, vinos y demás productos derivados de la uva, contienen una amplia variedad de flavonoles, como quercetina, miricetina, kaempferol, isoramnetina, quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-glucurónido, quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-galactósido, kaempferol-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-galactósido. Otras fuentes de alimentos ricos en flavonoles son la col rizada, puerros, brócoli, judías verdes, manzanas, espinacas, fresas, coliflor, té y diferentes bayas (Jaganath y Crozier, 2010; Santos-Buelga y González-Paramás, 2016). Hertog et al. (1995) estimó una ingesta diaria de quercetina entre 3 y 38 mg para la población holandesa. Sin embargo, el consumo y las fuentes principales de

flavonoles varían dependiendo de los hábitos alimenticios de diferentes países, por ejemplo, a pesar de que el vino tinto contiene cantidades relativamente bajas de quercetina, en comparación con otros alimentos, podría ser una fuente dietética relevante de flavonoles en algunos países mediterráneos.

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

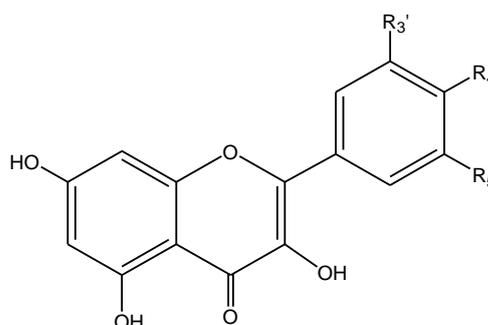


Figura II.9. Estructura de los aglicones de flavonoles más habituales en alimentos vegetales.

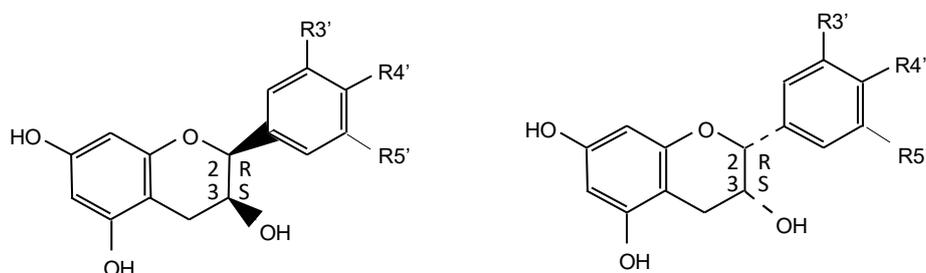
2.2.3 Flavan-3-oles

Los flavan-3-oles son flavonoides que carecen de grupo ceto en posición 4, su anillo C se encuentra totalmente saturado e hidroxilado en posición 3 y poseen dos carbonos quirales en posiciones 2 y 3. Pueden encontrarse en la naturaleza como monómeros o condensados entre sí formando estructuras con diverso grado de polimerización (taninos condensados o proantocianidinas). Los flavan-3-oles monómeros se suelen designar genéricamente como "catequinas" y se diferencian según el grado de hidroxilación de su anillo B y la configuración de los carbonos asimétricos. Estos compuestos pueden poseer restos acilo, siendo el ácido gálico el sustituyente más frecuente, pero generalmente no están glicosilados.

Los principales flavan-3-oles monómeros son catequina (C), epicatequina (EC), galocatequina (GC), epigalocatequina (EGC) y sus galoil derivados, epicatequina-3-O-galato (ECG) y epigalocatequina-3-O-galato (EGCG) (De Pascual-Teresa et al., 2010).

La presencia de dos carbonos asimétricos (C2 y C3) permite la existencia de cuatro isómeros ópticos para cada monómero de flavan-3-ol (Figura II.10). Entre ellos los más comunes son los pares diastereoisoméricos (+)-catequina (2R, 3S, *trans*) / (-)-

epicatequina (2R, 3R; *cis*) y (+)-galocatequina / (-)-epigalocatequina. (+)-Catequina y (-)-epicatequina (designadas habitualmente como catequina y epicatequina) se consideran los flavonoides más comunes en la dieta humana junto con el flavonol quercetina.



Flavan-3-oles	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	C2	C3
(+)-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
(-)-Epiafzelequina	H	OH	H	R	R

Figura II.10. Estructura química de los principales monómeros de flavan-3-oles.

Los flavan-3-oles se encuentran habitualmente en formas polimerizadas, formadas por unidades elementales de catequinas ligadas a través de enlaces C-C y ocasionalmente C-O-C, dando lugar a los taninos condensados o proantocianidinas. Pueden clasificarse según el grado de polimerización como oligómeros (dímeros a tetrámeros) o polímeros (cinco o más unidades). Las proantocianidinas basadas en unidades de (epi)catequina se llaman procianidinas, y son las proantocianidinas más abundantes en plantas. Proantocianidinas menos frecuentes son las propelargonidinas y prodelfinidinas, que contienen subunidades de (epi)afzelequina o (epi)galocatequina, respectivamente (Del Rio et al., 2013). También existen proantocianidinas mixtas que poseen diferentes tipos de catequinas en su estructura.

La reacción más característica de los taninos condensados es la ruptura por calentamiento 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 II.11), razón por la cual son también designados como proantocianidinas. Según den lugar en la hidrólisis a cianidina, delphinidina o pelargonidina se habla de procianidinas, prodelfinidinas y propelargonidinas.

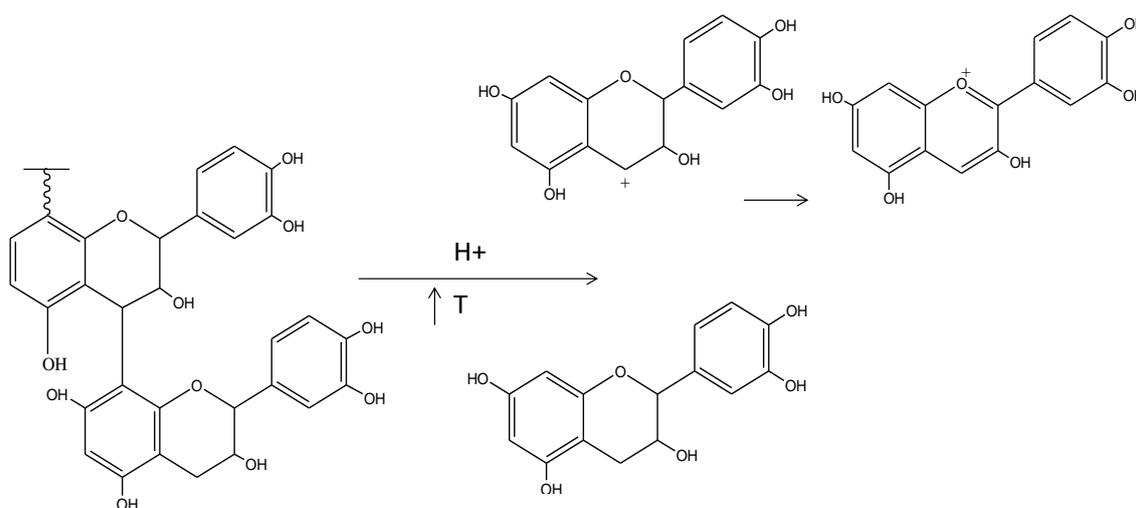


Figura II.11. Hidrólisis de proantocianidinas.

Las proantocianidinas más comunes son los dímeros de tipo B (Figura II.12) formadas por dos unidades flavan-3-ol unidas por un enlace interflavánico C4-C8 o C4-C6, es decir, entre el carbono 4 de una unidad considerada “subunidad superior” o “de extensión” y los carbonos 8 ó 6 de otra denominada “subunidad inferior” o “de iniciación”. Son menos frecuentes los dímeros tipo A (Figura II.12) que, además de la unión C4-C8 o C4-C6, presentan un enlace adicional de tipo éter entre las posiciones C2-O-C7 o C2-O-C5 (De Pascual-Teresa *et al.*, 2010). En 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.

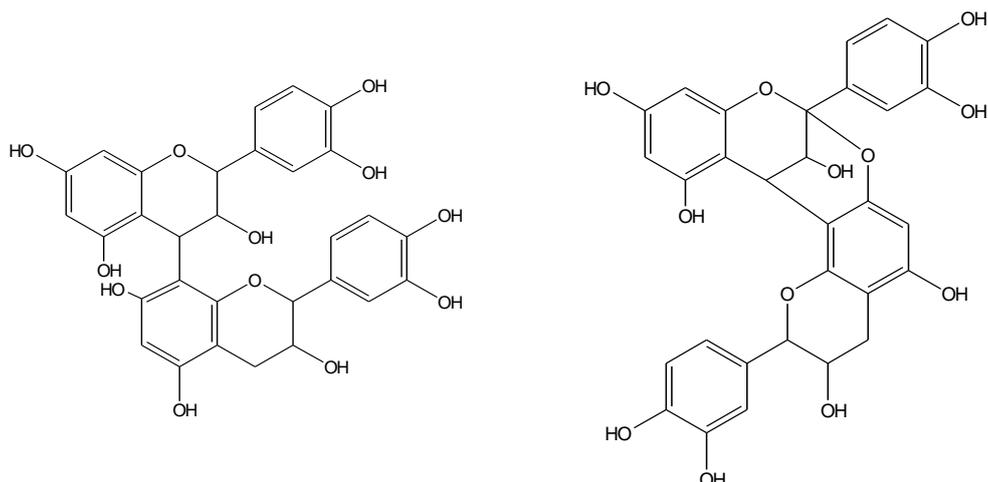


Figura II.12. Ejemplo de estructura de proantocianidinas dimeras de tipo B con uniones C4-C8, y de tipo A con doble unión interflavánica C4-C8 y C2-O-C7.

Los flavan-3-oles se encuentran entre los flavonoides más abundantes en la dieta humana, ya que están ampliamente distribuidos en frutas y alimentos derivados, incluyendo té verde, vino tinto, manzanas, uvas y cacao. Sin embargo, son menos abundantes en legumbres y hortalizas, con la excepción de lentejas y habas (Aron y Kennedy, 2008). Destacan, por ejemplo, EC y las procianidinas dimeras B1 y B2 en manzanas, EC y procianidinas derivadas en cacao y chocolate, catequinas monómeras (EGC, EGCG, C, EC y ECG) en té, y catequinas, procianidinas y prodelfinidinas en vino (Jaganath y Crozier, 2010; Del Rio et al., 2013).

Según un estudio en el que se cuantificó la concentración de flavan-3-oles en 56 productos alimenticios y bebidas españolas, la epicatequina es el más abundante en la dieta seguido por catequina y procianidina B2 (EC-(4 β →8)-EC) (De Pascual-Teresa et al., 2000). Se han estimado ingestas dietéticas medias de flavan-3-oles monómeros y oligómeros que oscilan entre 17 y 60 mg/día según países, aunque posiblemente estén infraestimadas por la dificultad de su análisis (Dragsted et al., 1997; Arts et al., 2001; de Pascual-Teresa et al., 2002; Gu et al., 2004).

2.2.4 Actividad y disponibilidad de flavonoides

2.2.4.1 Estudios epidemiológicos

Los estudios epidemiológicos son útiles para evaluar los efectos a largo plazo de la exposición a concentraciones fisiológicas de polifenoles sobre la salud humana, pese a que el conocimiento del contenido exacto de polifenoles en los alimentos es todavía limitado (Pérez-Jiménez et al., 2010; Valdés et al., 2015). Estos estudios han relacionado el consumo de una dieta rica en frutas y verduras con la reducción del riesgo de padecer algunas enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, algunos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas, así como con la reducción a largo plazo de la mortalidad en una población, efectos que han sido relacionados en parte con la presencia de compuestos fenólicos y especialmente flavonoides (Buijsse et al., 2006; Dai et al., 2006; Yuan et al., 2011; Zamora-Ros et al., 2013; Oh et al.; 2017; Vitale et al.; 2017;). En los últimos años se han llevado a cabo muchos estudios de este tipo, especialmente después de las publicaciones sobre las observaciones epidemiológicas de Hertog y colaboradores a principios de la década de 1990 (Hertog et al., 1993 y 1995), que apuntaban a una relación inversa entre el consumo de flavonoides y la incidencia y mortalidad por enfermedades cardiovasculares (ECV). Sin embargo, algunos estudios epidemiológicos no se han llevado a cabo de una manera suficientemente rigurosa, bien porque carecen de controles apropiados, no consideran de manera detallada la composición de los alimentos estudiados o la población de estudio no es adecuada. Por lo tanto, son necesarios más estudios bien controlados y monitorizados para establecer el grado de implicación de los flavonoides/polifenoles en los efectos beneficiosos que se les atribuyen (Del Rio et al., 2013; Zamora-Ros et al., 2014).

A pesar de que los flavonoides no son nutrientes esenciales, como las vitaminas, actualmente están considerados como componentes responsables, al menos en parte, de los efectos protectores para la salud de las dietas ricas en frutas y verduras, y el estudio de su papel en la nutrición humana se ha convertido en un tema de interés en la investigación en alimentos. Además, debido a la variedad de actividades biológicas atribuidas a los flavonoides, como capacidad antioxidante, antiinflamatoria,

estrogénica, antimicrobiana, antiproliferativa o antitumoral, también se consideran como compuestos prometedores para el desarrollo de nuevos medicamentos (Santos-Buelga y González-Paramás, 2016).

- **Flavonoides y efectos cardiovasculares**

Una de las relaciones que cuenta con más evidencias es la establecida entre el consumo de una dieta rica en flavonoides y una menor incidencia de enfermedad coronaria y de mortalidad por accidente cardiovascular. Esto se atribuye a la modulación de los factores de riesgo relacionados con enfermedades cardiovasculares (CVD), como hipertensión, disfunción endotelial, metabolismo lipídico, intolerancia a la glucosa y actividad plaquetaria (Osakabe, 2013). Existen diversos estudios epidemiológicos que han relacionado el consumo de alimentos ricos en flavonoides con **un descenso en la presión arterial** tanto en individuos sanos como en hipertensos (Hertog et al., 1993 y 1995; Buijsse et al., 2006; McCullough et al., 2006). El consumo de flavonoides también se ha relacionado con una **mejora de la vasodilatación del endotelio**, que se ha asociado a un aumento en la biodisponibilidad de NO (óxido nítrico), tanto en individuos sanos como en pacientes con enfermedad coronaria, hipertensión o diabetes (Diebolt et al., 2001; Yang et al., 2004; Balzer et al., 2008; Hooper et al., 2012). Un posible mecanismo que puede explicar este efecto es la modulación de la actividad de ciertas enzimas relacionadas con riesgo cardiovascular. Está bien establecida la producción de una elevación en el nivel vascular de NO mediante la modulación por fosforilación de la enzima óxido-nítrico sintasa endotelial (eNOS) tras el consumo de alimentos ricos en flavonoides (Fisher et al., 2003). También se ha propuesto que podrían inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), aunque el mecanismo de acción no es bien conocido (Fraga, 2007). Existen también estudios que relacionan el consumo de alimentos ricos en flavonoides con una **mejora en los niveles de colesterol plasmático**, traducándose en un incremento de colesterol-HDL (lipoproteínas de alta densidad) y una disminución del c-LDL (lipoproteínas de baja densidad) (Shrime et al., 2011). En el caso del cacao se ha observado también la mejora de otros factores de riesgo de CVD, como la **mejora de la resistencia a la insulina** en individuos sanos, hipertensos y obesos, debido a una

reducción significativa de la insulina sérica, y la **inhibición de la activación plaquetaria** en individuos sanos (Holt et al., 2006; Guasch-Ferré et al., 2017).

La protección cardiovascular se ha relacionado, en general, con alimentos ricos en flavonoides/polifenoles, como bayas, cítricos, café, granada y nueces, pero sobre todo se ha observado para alimentos ricos en flavan-3-oles, como té, vino tinto y, de modo especialmente significativo, en ensayos con chocolate o cacao.

El estudio PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) es el estudio epidemiológico de prevención primaria más importante realizado en España (Estruch et al., 2013). En él, se evalúa la relación entre la dieta mediterránea y el riesgo cardiovascular, a través del seguimiento de un total de 7.447 personas entre 55 y 80 años con riesgo cardiovascular pero que no padecían enfermedades cardiovasculares en el comienzo del estudio. La dieta mediterránea se caracteriza por una alta ingesta de fruta, verdura, frutos secos, legumbres, aceite de oliva y cereales, y una baja ingesta de carnes rojas, carnes procesadas, mantequilla, nata y dulces; además de un consumo de vino moderado durante las comidas (Willett et al., 1995). En el ensayo se asignó al azar a los participantes tres dietas: una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra, una dieta mediterránea suplementada con frutos secos o una dieta control (aconsejando reducir las grasas de la dieta). Los resultados mostraron que, entre las personas con alto riesgo cardiovascular, la dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra o frutos secos reducía la incidencia de accidentes cardiovasculares graves (infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o muerte por enfermedad cardiovascular) (Estruch et al., 2013). El efecto cardioprotector de este patrón dietético se ha atribuido, en parte, a la gran cantidad de componentes antioxidantes, como los compuestos fenólicos (Bulló et al., 2011). El aceite de oliva, los frutos secos, el vino tinto, las legumbres, las frutas y las verduras, componentes clave de la dieta mediterránea, son todos alimentos ricos en polifenoles. Aunque algunos resultados del estudio PREDIMED han sido recientemente cuestionados por deficiencias en el diseño estadístico en algunos de los grupos de ensayo (Estruch et al., 2018a), sus conclusiones generales se siguen considerando válidas, de acuerdo con los nuevos datos revisados aportados por los investigadores (Estruch et al., 2018b).

- **Flavonoides y enfermedades neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de enfermedades del sistema nervioso, de incidencia creciente debido al aumento en el envejecimiento de la población, entre las que se incluyen la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Huntington. Estas enfermedades se caracterizan por la pérdida progresiva de la estructura y función de las neuronas e incluso la muerte neuronal, como consecuencia de procesos hereditarios, tóxicos, metabólicos o infecciosos. Los mecanismos exactos por los que se desarrollan no están bien esclarecidos, a pesar del constante avance de los conocimientos en neurobiología (Brettschneider et al., 2015; Losada-Barreiro et al., 2017).

Aunque se carece de confirmación directa y es necesario profundizar más, numerosos estudios preclínicos y epidemiológicos sugieren que los polifenoles podrían ser efectivos en la **reducción del riesgo de enfermedades neurodegenerativas** y de **deterioro cognitivo** relacionado con la edad (Scarmeas et al., 2006; Nehlig, 2013; Malar et al., 2014). Diferentes mecanismos podrían estar implicados en estos beneficios neurológicos, entre los que destacan la capacidad de los polifenoles para interactuar con la señalización intracelular neuronal y glial, para influir en el flujo sanguíneo periférico y cerebrovascular y para reducir el daño neuronal, la respuesta neuroinflamatoria y el estrés oxidativo (Del Rio et al., 2013; Fernandes et al., 2017). Existen, por ejemplo, estudios epidemiológicos que asocian un alto consumo de té verde con una menor incidencia de demencia y la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Mandel et al., 2008). Estos estudios están respaldados por múltiples ensayos *in vitro* e *in vivo* que observan neuroprotección por parte de los polifenoles del té, atribuida a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes y la estimulación de diferentes rutas de señalización y de la síntesis de moléculas endógenas antioxidantes mediante la activación de la ruta Nrf/ARE (Choi et al., 2012).

En el seno del proyecto Kame, donde fueron monitorizados 1836 japoneses estadounidenses que no padecían demencia al inicio del estudio, se relacionó el consumo de zumos de frutas y verduras con un alto contenido en polifenoles con un

retraso significativo en la aparición de la enfermedad de Alzheimer, especialmente en aquellas personas que estaban en alto riesgo de padecer la enfermedad (Dai et al., 2006). En otro estudio epidemiológico sobre 6434 individuos canadienses evaluados durante 5 años que presentaban una edad igual o mayor de 65 años y un estado cognitivo normal en el inicio del estudio, se relacionó el consumo moderado de vino y café, también ricos en polifenoles, con una menor incidencia de la enfermedad de Alzheimer (Lindsay et al., 2002).

Existen bastantes estudios que han relacionado el consumo de diferentes alimentos ricos en flavonoides, como uvas, granada, fresas o arándanos, así como flavonoides puros, incluyendo epicatequina y quercetina, con una **mejora de la memoria y el aprendizaje** (Scholey et al., 2010; Krikorian et al., 2010 a y b). También se han realizado estudios de intervención con algunos extractos, por ejemplo, de *Ginkgo biloba*, de pino o de cacao ricos en flavan-3-oles, en diferentes grupos de individuos, que sugieren que los flavonoides ejercen un **efecto en la prevención del deterioro cognitivo**. Sin embargo, aún no ha sido posible esclarecer la relación causa-efecto entre estos componentes y sus efectos biológicos (revisado en del Rio et al., 2013).

- **Flavonoides y cáncer**

Mientras que los estudios epidemiológicos indican de manera fehaciente que los flavonoides tienen un papel importante en la prevención de algunas enfermedades como las cardiovasculares, las evidencias epidemiológicas de que el consumo de flavonoides/polifenoles proteja frente al cáncer son limitadas y contradictorias (Arts y Hollman, 2005; Fink et al., 2007; Yuan et al., 2011; Bo et al., 2016). Aunque existen muchos estudios en cultivos celulares y modelos animales, así como algunas intervenciones en humanos que han mostrado efectos anticancerígenos (Zamora-Ros et al., 2014), son necesarios más estudios epidemiológicos que estudien las asociaciones entre el consumo de estos compuestos y el riesgo de cáncer. Así, por ejemplo, algunos de los estudios epidemiológicos que han analizado la relación entre el consumo de frutas y verduras y la incidencia de cáncer encuentran una correlación inversa entre el consumo de polifenoles y la incidencia de determinados tipos de

cáncer (Benetou et al., 2008; Turati et al., 2015), mientras que otros no encuentran ninguna asociación (Arts y Hollman, 2005; Larsson et al., 2008).

Algunos ensayos de intervención clínica han evaluado la relación entre el consumo té verde e incidencia de cáncer en poblaciones de riesgo, siendo los resultados poco concluyentes, aunque sugieren que su consumo regular podría retrasar el desarrollo de cáncer oral y de próstata (Li et al., 1999; Bettuzzi et al., 2006). En el caso del cáncer oral, los efectos observados pueden ser debidos a la interacción directa entre los polifenoles y las células cancerosas de la boca, ya que se observaba un descenso significativo en la proliferación de las células tumorales de la mucosa oral en los individuos tratados. Este mismo mecanismo podría también jugar un papel en el desarrollo de otros cánceres del sistema gastrointestinal, como los de esófago, estómago o intestino grueso y delgado.

Por otro lado, algunos estudios sugieren una influencia de los polifenoles en la prevención del daño u oxidación de ADN, lo cual estaría relacionado con el riesgo de padecer cáncer. Diferentes alimentos ricos en polifenoles han mostrado una protección frente al daño de ADN en linfocitos, sin embargo, ello no se ha podido vincular con una reducción de la incidencia de cáncer (Del Rio et al., 2013). Bo et al. (2016) realizaron un meta-análisis de estudios epidemiológicos sobre consumo de flavonoides y el riesgo de cánceres del tracto digestivo, encontrando escasas evidencias que apoyaran una relación con el riesgo de cáncer de esófago o colorrectal. Sin embargo, el análisis por subgrupos apuntaba a que los flavonoides de la dieta parecían estar relacionados con una reducción en el riesgo de cáncer gástrico en la población europea, aunque no en las de Estados Unidos o Asia.

Para validar la posible relación entre consumo de polifenoles y riesgo de cáncer, en futuras investigaciones epidemiológicas se requeriría disponer de biomarcadores fiables, así como el uso de mayor variedad de biomarcadores y el seguimiento a largo plazo de la exposición a polifenoles (Zamora-Ros et al., 2014). En ausencia de biomarcadores adecuados, para evaluar la relación entre consumo de polifenoles y el riesgo de cáncer son necesarios más estudios de intervención a largo plazo, de una manera más controlada, donde se analice la incidencia de cáncer, el tamaño del tumor

y/o la mortalidad por cáncer, tanto en individuos sanos como en pacientes de cáncer. Hasta que se realicen dichos estudios será difícil evaluar completamente el impacto de una dieta rica en polifenoles y el desarrollo de cáncer (Del Rio et al., 2013).

2.2.4.2 Biodisponibilidad y metabolismo

Los efectos saludables de los flavonoides, y polifenoles en general, dependen de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad.

El cálculo de la ingesta dietética de flavonoides es difícil. Por un lado, no se dispone de datos amplios y suficientemente precisos sobre composición de flavonoides en alimentos. Por otro, resulta complicado obtener este tipo de información, ya que diferentes autores emplean métodos de análisis distintos y no estandarizados y existen, además, variaciones muy importantes en la composición de un mismo alimento en función de las variedades y condiciones agroclimáticas. Igualmente, la composición está afectada por el procesado y el almacenamiento, que pueden llevar a degradaciones y a la formación de nuevos derivados no presentes originalmente en el alimento (p.ej., tearubiginas o pigmentos derivados de antocianos), modificando de esta manera el perfil y contenidos de flavonoides.

Una primera estimación de la ingesta dietética de flavonoides fue realizada por Kühnau (1976), que calculó un consumo diario medio de alrededor de 1 g en la dieta americana. Los flavan-3-ol monómeros (catequinas) y sus formas condensadas (proantocianidinas) serían los flavonoides más consumidos en dietas occidentales, seguidos por antocianos y flavonoles (Jaganath y Crozier, 2010). El consumo diario de flavonoides en Europa se ha estimado recientemente en unos 428 ± 49 mg/día, de los que aproximadamente 136 ± 14 mg/día corresponderían a compuestos monoméricos. Los principales tipos de flavonoides consumidos serían derivados complejos, como las teaflavinas y tearubiginas (168 mg/día), presentes en té, y las proantocianidinas oligo y poliméricas (124 mg/día), principalmente de frutas. Respecto a los compuestos monoméricos, los más consumidos son los flavan-3-oles, distribuidos en 53 mg/día de derivados galoilados y 24 mg/día no galoilados (Vogiatzoglou et al., 2015). Estos resultados están posiblemente sesgados por el hecho de que muchos de los

flavonoides indicados provendrían del consumo de té, bebida cuyo consumo está desigualmente repartido entre países europeos.

La biodisponibilidad puede definirse como "la tasa y el grado en que un ingrediente activo o fracción activa se absorbe desde una matriz y llega a estar disponible en el sitio de acción". Por tanto, la tasa de absorción y la disponibilidad en el lugar de acción son dos aspectos importantes para que un flavonoide pueda ser efectivo en un sistema biológico. La biodisponibilidad varía mucho de unas moléculas a otras, incluso dentro de compuestos dentro de la misma familia, y entre individuos, pero en general los flavonoides presentan una baja biodisponibilidad (Zamora-Ros et al., 2013). Se ha estimado que solo 5-10 % del total de los polifenoles consumidos son absorbidos en el intestino delgado, mientras que un 90-95 % alcanzarían el colon, donde podrían ser transformados por la microbiota en metabolitos biodisponibles que podrían ser incluso más bioactivos que sus precursores (Clifford, 2004).

- **Absorción**

La mayoría de los flavonoides presentes en los alimentos se encuentran en forma glicosilada, sin embargo, para su absorción suele ser necesaria una hidrólisis previa para liberar el aglicón. La desglicosilación de flavonoides ocurre en el intestino delgado y grueso de forma dependiente del tipo de resto azucarado. En el intestino delgado existen al menos dos enzimas de tipo β -glucosidasa que pueden actuar como hidrolasas de flavonoides glicosilados (Day et al., 2003). Una de ellas es el complejo lactasa-floricín hidrolasa (LPH), que se encuentra en las vellosidades de las células epiteliales del intestino delgado, que es capaz de hidrolizar algunos monoglucósidos de flavonoides (Day et al., 2000). Tras su separación, los aglicones entrarían al enterocito por difusión pasiva como resultado de su mayor lipofilicidad y su proximidad a la membrana celular. La otra enzima es la β -glucosidasa citosólica (CBG), localizada en el interior de los enterocitos. Para que tenga lugar la hidrólisis por CBG los glicósidos deben pasar previamente por difusión activa al interior de las células. Se ha visto que algunos flavonoides, como quercetina-4'-O-glucósido, pueden ser transportados por el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1) (Walgren et al., 2000; Day et al., 2003). También se ha propuesto que la hidrólisis de algunos glicósidos de

flavonoides podría comenzar con las β -glucosidasas presentes en la cavidad bucal procedentes de la saliva y de la microbiota oral (Requena et al., 2010). Las β -glucosidasas no actuarían sobre glicósidos de flavonoides no monoglucósidos, como rutina (quercetina-3-*O*-rutinósido) o hiperósido (quercetina-3-*O*-galactósido), por lo éstos que llegarían intactos al intestino grueso donde serían hidrolizados por la microbiota intestinal, liberando aglicones que podrían ser absorbidos en el intestino grueso o ser degradados a productos más sencillos (Erlund et al., 2000; Arts et al., 2004).

A diferencia del resto de flavonoides, los flavan-3-oles, no están habitualmente glicosilados en los alimentos, aunque a menudo se encuentran acilados con ácido gálico. Estos compuestos podrían ser parcialmente absorbidos en los enterocitos del intestino delgado sin desconjugación o hidrólisis previa, aunque en pequeña extensión y de forma muy variable dependiendo del grado de polimerización y estereoquímica de las moléculas, reduciéndose aún más por la presencia de restos galoilo (Marín et al., 2015). Por otro lado, las formas oligoméricas o poliméricas, apenas serían absorbidas en su forma nativa (Espín et al., 2007). La mayoría de los flavan-3-oles ingeridos pasan inalterados al intestino grueso, donde pueden ser catabolizados por la flora colónica dando lugar a una variedad de metabolitos de bajo peso molecular, como diversos ácidos, aldehídos fenólicos y productos derivados, como valerolactonas, que podrían ser absorbidos en el intestino grueso y ser, al menos en parte, responsables de los efectos biológicos y antioxidantes asociados al consumo de una dieta rica en flavan-3-oles (Aura, 2008).

Se ha indicado que los polifenoles que mejor se absorberían en humanos son las isoflavonas y el ácido gálico, seguido de catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina. Por el contrario, los de peor absorción serían las proantocianidinas, las catequinas galoiladas del té y los antocianos (Manach et al., 2005).

- **Metabolismo**

Los flavonoides se metabolizan ampliamente antes de ingresar a la circulación sistémica, encontrándose normalmente en plasma en forma de metabolitos conjugados. Las reacciones de conjugación se pueden producir en distintos tejidos y

células, siendo el intestino y el hígado los órganos más comúnmente implicados en la biotransformación de flavonoides, aunque otros órganos también pueden contribuir (Figura II.13) (Donovan et al., 2006). No hay que olvidar que 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.

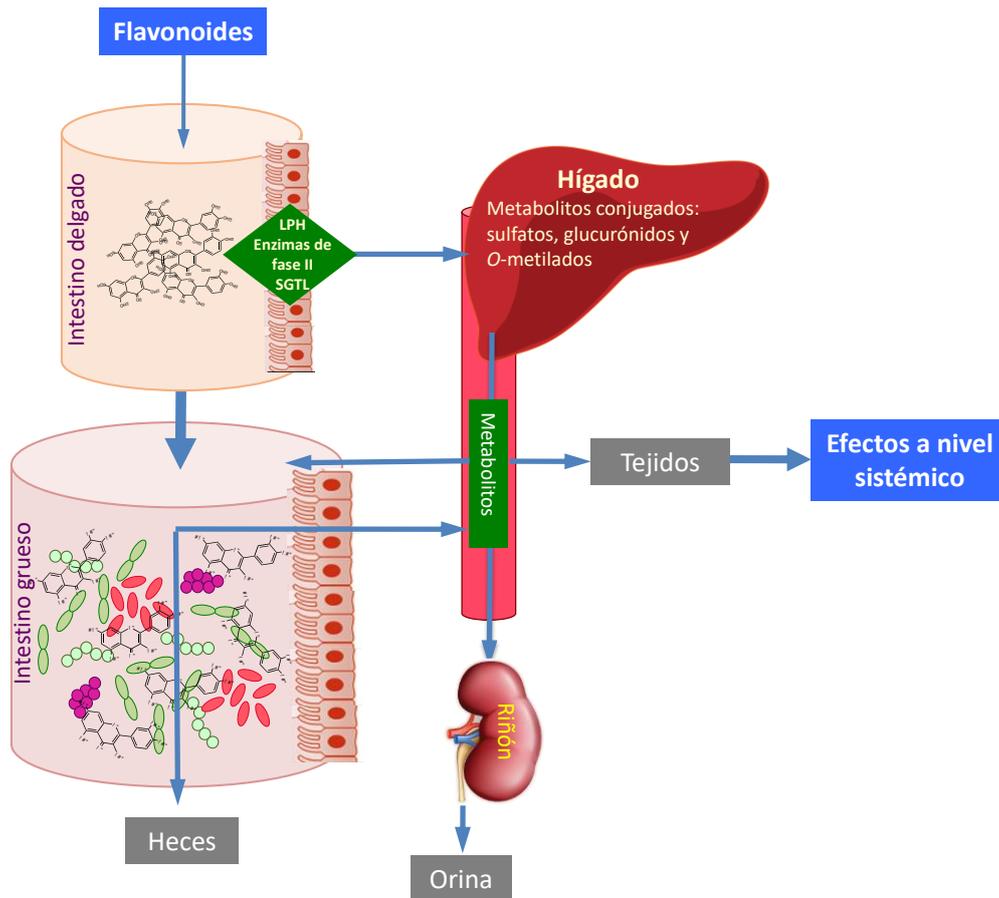


Figura II.13. Esquema del metabolismo y distribución de flavonoides.

Una vez que los aglicones de flavonoides entran en las células intestinales, se produce la conjugación por enzimas de fase II en el propio enterocito, dando lugar a la formación de sulfatos, glucurónidos y derivados metilados por acción de sulfotransferasas (SULT), uridin-5'-difosfato glucuronosiltransferasas (UGTs), y catecol-*o*-metiltransferasas (COMT), respectivamente (Donovan et al., 2006). También se ha visto la formación de conjugados con glutatión (Hong y Mitchell et al., 2006), con el fin

de inactivar productos intermedios potencialmente nocivos, ya que algunos flavonoides, como quercetina, presentan un grupo catecol que es susceptible de sufrir procesos de oxidación y dar lugar a quinonas reactivas que pueden desencadenar daño oxidativo en las células. Algunos metabolitos conjugados pueden regresar a la luz del intestino delgado a través de transportadores de membrana ABC (ATP-Binding Cassette), como las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (Multidrug Resistance Proteins, MRP), glicoproteína-P o el transportador BCRP (Breast Cancer Resistant Protein) (Del Rio et al., 2013; Zhang et al., 2015b).

En el hígado también tiene lugar un importante metabolismo de fase II. Tras la conjugación intestinal, los flavonoides absorbidos son transportados por la vena porta o por los capilares linfáticos de las microvellosidades (lacteales). En el hígado, se producen procesos adicionales de conjugación, que incluyen sulfatación y metilación, antes de entrar los metabolitos a circulación sistémica o sufrir excreción renal (Murota et al., 2018). La conjugación es un proceso de detoxificación metabólica común con muchos xenobióticos, que facilita su eliminación a través de la orina y de la bilis. Algunos metabolitos de fase II vuelven por vía biliar desde el hígado, mediante recirculación enterohepática, al intestino, donde pueden ser reabsorbidos (Rodríguez-Mateos et al., 2014).

Estos procesos metabólicos hacen que las formas circulantes en plasma sean derivados conjugados y que, a excepción de algunas catequinas y ciertas isoflavonas, rara vez se encuentren flavonoides sin metabolizar en la sangre (Poquet et al., 2009; Terao et al., 2009; Nakamura et al., 2014).

Existe un conocimiento todavía muy escaso sobre los procesos de distribución de los metabolitos de flavonoides, desconociéndose sus tejidos diana y los mecanismos de acción a través de los cuales podrían ejercer sus efectos en los mismos. En cualquier caso, las concentraciones de los metabolitos en plasma y tejidos diana serían muy bajas, en torno a valores de orden nM o, raramente, μM , siendo más altas las concentraciones en los tractos digestivo e intestinal (Rodríguez-Mateos et al., 2014). La presencia a tan bajas concentraciones hace pensar que estas sustancias podrían estar implicadas solamente en procesos biológicos altamente específicos (Fraga et al., 2011).

Algunos autores también han apuntado la posibilidad de que determinados metabolitos fenólicos pudieran unirse a biomembranas y lipoproteínas por la capacidad para establecer enlaces de H e interacciones hidrofóbicas. De este modo, al acumularse en las interfaces lípido-agua, podrían alcanzar localmente concentraciones suficientes para ejercer su actividad; por ejemplo, podrían contribuir a proteger las lipoproteínas de alta densidad de su oxidación (Laranjinha et al., 1994 y 1995).

Los procesos de conjugación que sufren los flavonoides pueden producir cambios significativos en su actividad biológica, hecho que no ha sido tenido en cuenta en muchos estudios *in vitro*, que en su mayoría han sido realizados con aglicones o con los compuestos en la forma en que se encuentran en plantas o alimentos. Por ejemplo, las formas conjugadas de quercetina poseen menor capacidad antioxidante que su respectivo aglicón (Dueñas et al., 2011). Estos supuestos ponen en duda que el efecto antioxidante directo pueda jugar un papel destacado *in vivo* (Kroon et al., 2004). Por otro lado, algunos autores han señalado la posibilidad de que en determinados tejidos o situaciones fisiológicas, como los procesos inflamatorios, pueda tener lugar una desconjugación de los metabolitos, liberando nuevamente los aglicones, que podrían ser, al menos en parte, responsables de los efectos *in vivo* de los flavonoides. Por lo tanto, el balance conjugación-desconjugación podría controlar la función fisiológica de los metabolitos de flavonoides (O'Leary et al., 2003; Menéndez et al., 2011; Murota et al., 2018).

Por último, hay que tener en cuenta que la mayoría de los flavonoides ingeridos llegan prácticamente inalterados al intestino grueso donde interactúan con la microflora colónica, que está involucrada en la producción de otros tipos de metabolitos, que podrían jugar un papel relevante en los efectos asociados al consumo de estas sustancias. Además, los compuestos fenólicos o sus metabolitos podrían también influir en la composición de la flora intestinal, ejerciendo efectos de tipo prebiótico. De este modo, el conocimiento de las interacciones polifenol-microbiota es crucial para poder explicar, al menos en parte, los efectos saludables de los mismos (Dueñas et al., 2015; Cueva et al., 2017). Sin embargo, el conocimiento de cómo la composición del microbioma intestinal puede afectar al metabolismo, bioactividad o absorción de los fitoquímicos no absorbibles de la comida es aún muy limitado. Estos

estudios representan un desafío para la investigación en alimentación, nutrición y salud.

- **Interacciones con la microbiota intestinal**

Como se ha señalado, la mayor parte de los polifenoles consumidos, y entre ellos los flavonoides, no son absorbidos en el intestino delgado y alcanzan el colon, donde interactúan con la microbiota de manera recíproca. Por un lado, los polifenoles sufren un metabolismo complejo por acción de las enzimas microbianas (además de las humanas), que conducen a la producción de un gran número de metabolitos y productos catabólicos. Por otro, los polifenoles y sus metabolitos pueden influenciar y modular la composición de la microbiota. En este sentido, los polifenoles podrían tener un doble efecto positivo sobre la microbiota, inhibiendo bacterias patógenas y estimulando bacterias beneficiosas, por lo que algunos autores sugieren que podrían actuar como un prebiótico metabólico (Hervert y Goñi, 2011).

El tracto buco-gastrointestinal humano está compuesto por un amplio espectro de especies metabólicamente muy activas, dominado por bacterias anaerobias. La placa dental contiene alrededor de 10^{11} bacterias/g, y la saliva en torno a 10^8 - 10^9 bacterias/mL, mientras que en las heces se puede llegar a 10^{11} - 10^{12} bacterias/g. El ecosistema bacteriano que predomina en la microbiota gastrointestinal humana pertenece a cuatro divisiones o filos bacterianos: *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Dentro del tracto gastrointestinal se encuentran especies nativas que lo colonizan permanentemente y un número variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo, estos últimos se ingieren continuamente a través de los alimentos, bebidas, etc. (revisado en Dueñas et al., 2015). Estas bacterias de la flora microbiana realizan diferentes funciones fisiológicas gracias a una gran variedad de actividades metabólicas y enzimáticas que repercuten en la salud y la nutrición del huésped.

Entre la gran diversidad de actividades enzimáticas se encuentra la capacidad de hidrolizar glucósidos, glucurónidos, sulfatos, amidas, ésteres y lactonas, a través de la acción de enzimas como α -ramnosidasa, β -glucuronidasa, β -glucosidasa, sulfatasa y estereras. Otras reacciones catalizadas por la flora colónica son la escisión del anillo

aromático, reducciones (reductasas, hidrogenasas), descarboxilaciones (descarboxilasas), desmetilaciones (desmetilasas), isomerizaciones (isomerasas) y deshidroxilación (deshidroxilasas) (Aura, 2008).

El resultado de la biotransformación colónica de polifenoles produce un espectro muy amplio de productos que pueden reabsorberse; entre ellos se encuentran los ácidos fenilacético, fenilpropiónico, fenilbutírico y valérico, valerolactonas, floroglucinol, o las dibenzopirranonas urolitina A y urolitina B, así como productos derivados de los mismos (Rechner et al., 2004; Hervert y Goñi, 2011.) Es importante señalar que existe una gran variabilidad inter-individual en el perfil y/o contenido de metabolitos fenólicos encontrados en fluidos fisiológicos (orina, plasma y heces) tras un consumo controlado de alimentos ricos en polifenoles (Feliciano et al., 2016).

En estudios sobre metabolismo de catequinas de té se observó que las reacciones catabólicas provocan la apertura del anillo C produciendo γ -valerolactonas, metabolitos consistentemente identificados en orina humana tras la ingestión de té verde. *Adlercreutzia equolifaciens* y *Flavonifractor plautii* son dos bacterias entéricas propuestas como responsables de la ruptura del anillo C de catequinas (Murota et al., 2018). En el metabolismo catabólico de procianidinas, las bacterias intestinales producen ácido 3,4-dihidroxifenilvalérico, que se puede seguir transformando hacia otros ácidos fenólicos, como ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, ácido fenilacético y ácido 3,4-dihidroxibenzoico (protocatéquico) (PCA) (Appeldoorn et al., 2009). Las γ -valerolactonas y los ácidos fenilvalérico son metabolitos microbianos exclusivos de flavan-3-oles. El PCA, sin embargo, es uno de los catabolitos más abundantes producidos en el intestino grueso, ya que puede provenir del metabolismo de distintos polifenoles, y ha sido relacionado con diversas actividades biológicas beneficiosas (Williamson y Clifford, 2010; Murota et al., 2018). En la Figura II.14 se recoge un esquema de la degradación de flavan-3-oles.

Los flavonoles también sufren una extensa degradación por la microbiota colónica para dar lugar a metabolitos fenólicos más simples procedentes de los restos derivados de los anillos A y B tras la ruptura del anillo C. Los compuestos de esta familia forman un mayor número de metabolitos, ya que la ruptura del anillo C tiene

lugar en diferentes posiciones. Los principales metabolitos identificados de quercetina son los ácidos 2-(3,4-dihidroxifenil) acético (DOPAC), 2-(3-hidroxifenil) acético (OPAC) y 3,4-dihidroxibenzoico (PCA), procedentes del anillo B, y floroglucinol, ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico y ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico, derivados del anillo A (Selma et al., 2009). Se ha visto que algunas bacterias humanas como *Clostridium perfringens* y *Bacteroides fragilis* presentan capacidad de producir DOPAC a partir de quercetina (Peng et al., 2014). En ensayos con ratas a las que se había suplementado la dieta con quercetina-4'-O-glucósido marcado radiactivamente, Mullen et al. (2008) encontraron que su conversión en ácidos fenólicos era prácticamente total en colon y recto, predominando DOPAC y OPAC y, en menor cantidad, PCA.

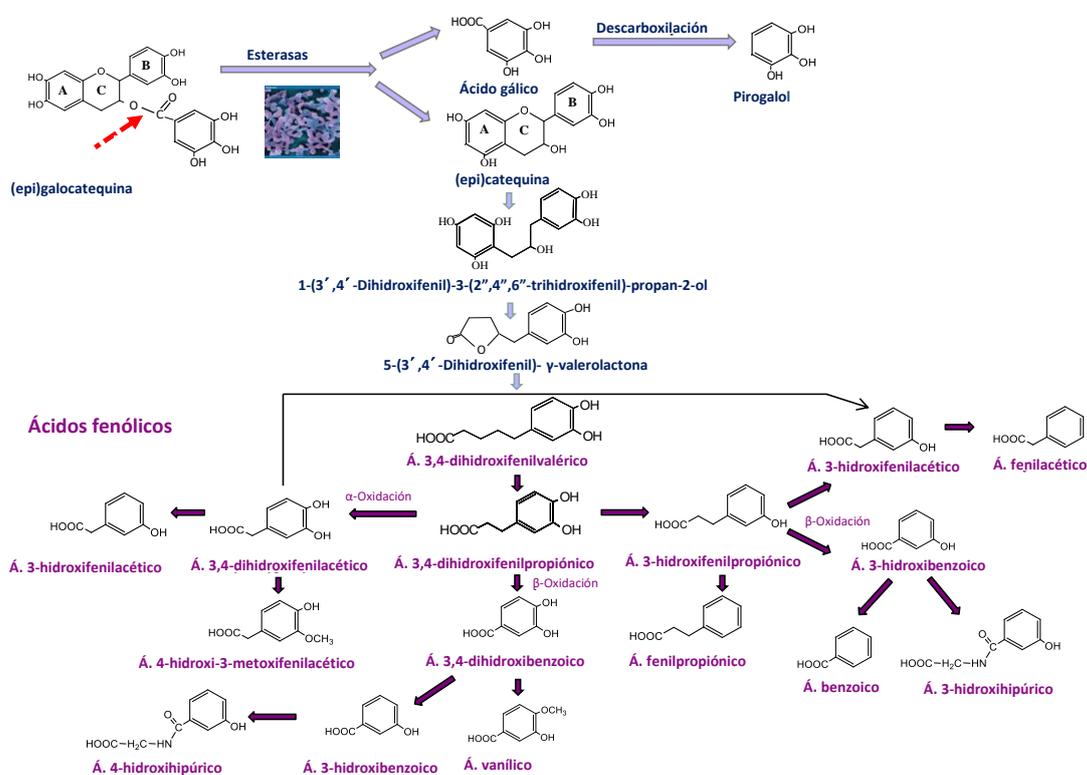


Figura II.14. Metabolismo microbio de flavan-3-oles. Adaptado de Dueñas et al. (2015).

2.2.4.3 Actividad antioxidante y flavonoides

Los mecanismos a través los cuales los distintos flavonoides ejercen su actividad biológica están todavía bajo discusión. Durante muchos años los efectos beneficiosos de flavonoides han sido atribuidos a sus propiedades antioxidantes, con numerosos

estudios que relacionan su estructura química con sus propiedades antioxidantes, incluyendo la captación de radicales libres y la quelación de metales con actividad redox (Rice-Evans et al., 1996; Trembl y Smejkal, 2016). Sin embargo, la capacidad antioxidante obtenida mediante ensayos químicos no puede extrapolarse al comportamiento *in vivo*. De hecho, las evidencias disponibles apuntan a que los flavonoides, más que como antioxidantes directos, podrían actuar mediante mecanismos indirectos, como la regulación de enzimas antioxidantes y desintoxicantes, y la modulación de rutas de señalización redox y de la expresión de genes (Hollman et al., 2011; López-Alarcón y Denicola, 2013). Por ello, es importante complementar los ensayos de actividad antioxidante *in vitro* que utilizan métodos químicos con ensayos celulares, modelos animales o estudios en humanos con el fin de considerar la complejidad existente en sus mecanismos de acción *in vivo* (López-Alarcón y Denicola, 2013).

Un antioxidante se define como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina daño oxidativo de una molécula diana” (Halliwell y Gutteridge, 1998). Las propiedades antioxidantes de flavonoides se han relacionado clásicamente con su capacidad reductora y captadora de la mayoría de especies oxidantes, como los aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y los radicales hidroxilo ($\cdot OH$), peróxido, alcoxilo y $NO\cdot$, gracias a un mecanismo que implica la transferencia (donación) de un átomo de H desde el flavonoide al radical, que lo estabiliza. Como consecuencia, se forma un radical aroxilo o fenoxi derivado de flavonoides que se supone es bastante estable (Bors et al., 1997).

En general, los polifenoles muestran mayor potencial antioxidante cuando presentan mayor número de sustituyentes hidroxilo, aunque la posición que ocupen dichos grupos dentro de la molécula también es determinante (Blokhina et al., 2003). La presencia de agrupamientos galol y catecol (con al menos dos grupos hidroxilo adyacentes) en el anillo B ha sido propuesta como la característica más importante en relación con una mayor actividad captadora de radicales. De hecho, la eliminación de un grupo hidroxilo de un catecol produce una importante disminución de la capacidad antioxidante (Shiba et al., 2008). Por el contrario, un grupo hidroxilo adicional en el anillo B, para formar un resto galol, aumenta la capacidad captadora de radicales

comparada con el catecol. Sin embargo, la adición de otro grupo hidroxilo no produce un cambio significativo en la capacidad captadora de ROS (Shiba et al., 2008; Wang y Brumaghim, 2011). Otros criterios estructurales que también aumentan la capacidad captadora de radicales libres son la presencia de un doble enlace en C2-C3, conjugado con un sustituyente 4-oxo (C=O en posición C4) en el anillo C, ya que facilitan la deslocalización de electrones del anillo B y la estabilización del radical fenoxi intermedio, así como la presencia adicional de grupos hidroxilos en las posiciones C5 y C7, aunque éstos deberían ir acompañados por el doble enlace C2-C3 (Wang y Brumaghim, 2011).

La polimerización de flavonoides, como ocurre en los taninos condensados (proantocianidinas), promueve la captación de radicales debido a la presencia de un mayor número de grupos hidroxilo. Mientras que la sustitución de los grupos hidroxilo, como ocurre en la glicosilación o metilación, disminuye generalmente la capacidad antioxidante en relación con los flavonoides originales (Heim et al., 2002; Dueñas et al., 2010).

Algunos autores han cuestionado la estabilidad de los radicales aroxilo derivados de flavonoides y han descrito su conversión en radicales secundarios más reactivos, como quinonas y semiquinonas y algunas ROS, que pueden provocar efectos prooxidantes o potencialmente citotóxicos (Halliwell, 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que la quercetina forma un radical *o*-semiquinona que puede producir *o*-quinonas, así como reaccionar con O₂ y formar superóxido (Metodiewa et al., 1999). Sin embargo, como ya se ha mencionado, aunque altos niveles de actividad prooxidante hayan sido relacionados con efectos tóxicos, una ligera cantidad de prooxidantes, como podría ser la generada por la oxidación y metabolismo de los flavonoides *in vivo*, podría resultar beneficiosa, ya que conduciría a la estimulación de defensas antioxidantes y enzimas metabolizadoras de xenobióticos, resultando en una citoprotección general (Halliwell, 2008; Tang y Halliwell, 2010).

Otro punto a tener en cuenta es la posible interacción de los flavonoides con otros antioxidantes. Por ejemplo, se ha visto que los radicales aroxilo pueden ser reciclados gracias a la interacción con antioxidantes como el ascorbato, que a su vez

sería regenerado por el glutatión (Pietta, 2000). También se ha propuesto la interacción de flavonoides de la dieta con el α -tocoferol (α -T), un importante antioxidante liposoluble, que tiene la capacidad de captar especies reactivas formando los correspondientes radicales tocoferoxilo (α -T \cdot). Los flavonoides producirían la regeneración del α -T desde su radical α -T \cdot (Frank et al., 2006).

Otro mecanismo que puede contribuir a la actividad antioxidante de los flavonoides es su capacidad para actuar como quelantes de metales con actividad redox, evitando así las reacciones catalizadas por Fe^{2+} y Cu^+ que conducen a la formación de ROS y RNS en células (Fernandez et al., 2002). La producción de radicales hidroxilo tiene lugar principalmente por reacciones catalizadas por Fe^{2+} y Cu^+ , ya que son los iones metálicos más abundantes en sistemas biológicos, aunque otros iones metálicos redox activos como Cr^{3+} o Co^{2+} también pueden catalizar la generación de $\cdot\text{OH}$ a partir de H_2O_2 . La reacción catalizada por Fe^{2+} en presencia de peróxido de hidrógeno se conoce como la reacción de Fenton (Wang y Brumaghim, 2011). Los polifenoles presentan valores de pKa entre 6-9, por lo que *in vivo*, a pH fisiológico, se encuentran parcialmente desprotonados. El hierro puede unirse al polifenol a través de los dos átomos de oxígeno desprotonados de los grupos catecol o galol, previniendo así la generación de ROS (Perron y Brumaghim, 2009). Además de los grupos catecol y galol, algunos flavonoles como quercetina y miricetina también presentan dos sitios adicionales que pueden unir metales de transición: entre el 5-hidroxil y 4-carbonil (sitio 5-hidroxil-4-ceto) o entre el 3-hidroxil y 4-carbonil (sitio 3-hidroxil-4-ceto) del anillo C (Figura II.15) (Mira et al., 2002). En estudios de unión de metales a rutina y quercetina a pH fisiológico, se encontró que la unión de metales en el sitio 3-hidroxil-4-ceto es más favorable que en el sitio 5-hidroxil-4-ceto, muy probablemente debido a las diferencias de pK entre ambos grupos hidroxil (Fernandez et al., 2002; Mira et al., 2002).

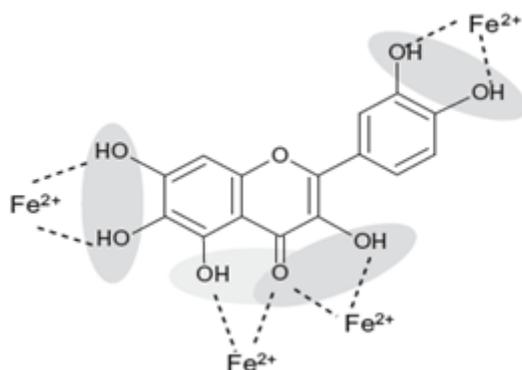


Figura II.15. Posibles sitios de unión de metales en la molécula de quercetina Fraga et al. (2010).

En general, la actividad quelante de los flavonoides ha sido menos estudiada que su capacidad captadora de radicales libres, sin embargo, es destacable que la actividad quelante de flavonoides tiene la capacidad de inhibir la formación de ROS en lugar de captar estas especies después de que se hayan formado (Wang y Brumaghim, 2011). Mira et al. (2002) estudiaron la actividad quelante de diferentes familias de flavonoides, encontrando que todos los flavonoides estudiados mostraban mayor capacidad de reducción de iones de cobre que de iones de hierro y que los polifenoles con grupos catecol y galol eran los más efectivos como quelantes de ambos iones.

Otra función importante de los polifenoles es la regulación de enzimas relacionadas con los niveles de ROS. Los polifenoles pueden disminuir las concentraciones celulares de radicales libres mediante la inhibición de la expresión o de la actividad de enzimas generadores de los mismos, como NAD(P)H oxidasa o xantina oxidasa (XO), o bien aumentando la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Lü et al., 2010).

La nicotidamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa es un grupo de enzimas asociadas a la membrana plasmática, que transfieren un electrón desde NADPH citosólico a una molécula de oxígeno extracelular, produciendo $O_2^{\cdot-}$. El $O_2^{\cdot-}$ es biológicamente bastante tóxico y está relacionado con condiciones patológicas como la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). También es usado por el sistema inmune para neutralizar organismos invasores, por lo tanto, su producción controlada

en fagocitos es esencial para la defensa de un organismo (Lü et al., 2010). Castilla et al. (2008) mostraron que la ingestión regular de zumo de uvas tintas, como fuente de polifenoles, en pacientes en hemodiálisis, reducía la actividad de NADPH-oxidasa en neutrófilos y las concentraciones plasmáticas de LDL oxidado y de biomarcadores inflamatorios, considerando estos efectos como protectores del riesgo cardiovascular. Los flavonoides también son capaces de inhibir la enzima xantina oxidasa (XO) que produce O_2^{\bullet} y H_2O_2 (Hanasaki et al., 1994).

Por otro lado, los polifenoles se han relacionado con una mayor actividad y expresión de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT y GPX, o enzimas destoxicantes de fase II (Panchatcharam et al., 2006; González-Manzano et al., 2012; Shih et al., 2007). Estas enzimas suponen una importante línea de defensa frente a radicales libres; por ejemplo, SOD puede convertir dos O_2^{\bullet} (superóxido) en H_2O_2 y oxígeno. Las enzimas CAT y GPx también son utilizadas por los organismos para eliminar H_2O_2 antes de que la reacción Fenton pueda formar $^{\bullet}OH$. Las enzimas de fase II como, por ejemplo, NAD(P)H-quinona oxidorreductasa (NQO-1), glutatión transferasa y UDP-glucuronosil transferasa son inducidas por polifenoles a través de la ruta Keap-Nrf2 (Shih et al., 2007).

La interferencia de flavonoides con la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es otro mecanismo potencial para disminuir el daño oxidativo celular. La NOS es una enzima oxidorreductasa responsable de la síntesis de óxido nítrico. Existen diferentes isoformas conocidas, que pueden tener actividades constitutivas o inducibles. Por un lado, la NOS endotelial (eNOS) tiene una actividad constitutiva dependiente de calmodulina en el endotelio de los vasos sanguíneos y neuronas cerebrales, donde sintetiza constitutivamente las pequeñas cantidades de NO necesarias para diversos procesos fisiológicos, como el mantenimiento de la dilatación de los vasos sanguíneos. Sin embargo, durante una infección, inflamación y en carcinogénesis se aumenta la producción de NO, debido a la síntesis de proteínas que activan la NOS inducible (iNOS) en macrófagos, alcanzando concentraciones muy superiores a las que se dan en condiciones fisiológicas, lo que puede causar daños en el ADN. Se ha visto que epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), una de las principales catequinas del té, disminuye la actividad de la iNOS en macrófagos activados (Lin y Lin,

1997b). La disminución en la actividad de la iNOS asociada al consumo de flavan-3-oles se atribuye a una reducción en la expresión de ARNm de iNOS, que podría ocurrir impidiendo la unión del factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) al promotor de iNOS, inhibiendo de este modo la transcripción del gen que codifica la enzima (Lin y Lin, 1997b). También se ha encontrado que las valerolactonas, metabolitos derivados de flavanoles producidos por la flora intestinal, son capaces de inhibir la producción de NO en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) en ratones (Lambert et al., 2005). La observación de que los polifenoles puedan modular la expresión de la actividad enzimática, ha abierto una nueva línea para explicar los posibles mecanismos de acción moleculares de los polifenoles.

2.3 Rutas moleculares y genes implicados en envejecimiento y respuesta a estrés

Los estudios con *C. elegans* han proporcionado gran cantidad de información sobre los mecanismos que modulan el envejecimiento y la respuesta al estrés. Existen numerosos trabajos, como los mencionados en el apartado 2.4 (Flavonoides y *C. elegans*), donde se estudia la modulación de algunas rutas moleculares y genes relacionados con la respuesta al estrés y longevidad por diferentes flavonoides. Entre estos mecanismos moleculares se encuentran las rutas de señalización de la insulina/IGF-1, TOR, *sir-2.1*/SIRT1, línea germinal, *skn-1* y genes relacionados con mitocondria, que controlan procesos biológicos fundamentales, entre los que se incluyen desarrollo, metabolismo, reproducción, mantenimiento somático y resistencia al estrés. Estas rutas se encuentran conservadas evolutivamente, existiendo estrechas relaciones entre las mismas.

- **Ruta de señalización por insulina/IGF-1 (IIS)**

La ruta de señalización por insulina/factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1, Insulin-like **G**rowth **F**actor), conocida abreviadamente como **IIS**, de sus siglas en inglés Insulin/IGF-1 **S**ignaling, presenta muchos componentes evolutivamente conservados que regulan el envejecimiento y el metabolismo en diferentes especies (Figura II.16) (Kenyon, 2005; Altintas et al., 2016). En *C. elegans*, la ruta de la insulina regula procesos como envejecimiento/longevidad, formación del estado de resistencia *dauer*, metabolismo y resistencia al estrés. De hecho, la ruta de la insulina está implicada en la respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental, entre los que se encuentran el estrés térmico, el estrés oxidativo, la hipoxia, estrés osmótico, toxicidad a los metales pesados o escasez de alimento. Para ello, la IIS transmite señales de manera secuencial y bien organizada que dependen de las condiciones ambientales (Schuster et al., 2010; Murphy y Hu, 2013; Tullet, 2015; Altintas et al., 2016).

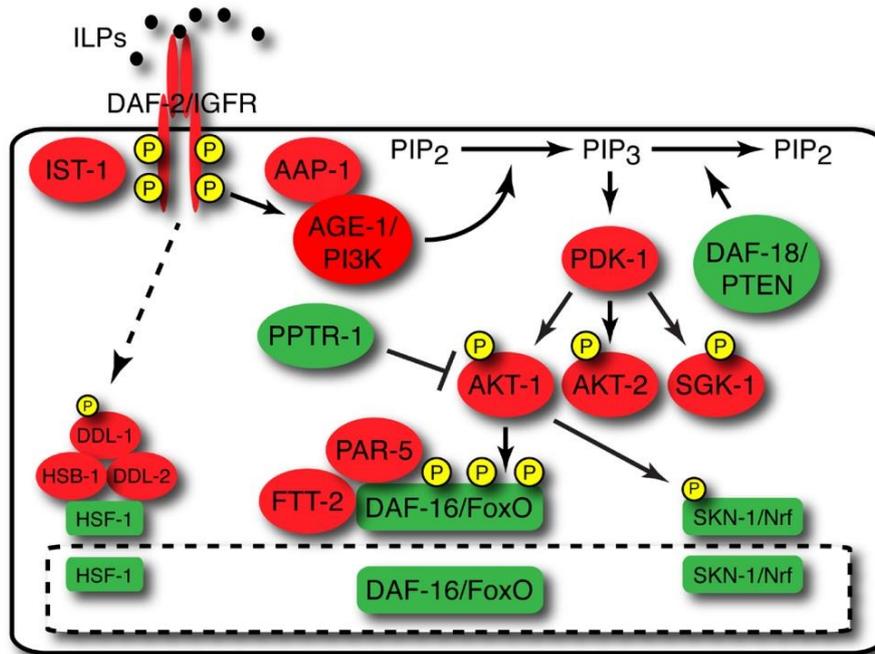


Figura II.16. Ruta de señalización de la insulina (IIS) en *C. elegans*. La activación de IIS dependiente de una cascada de fosforilación promueve el secuestro citoplasmático de los factores de transcripción DAF-16/FOXO, HSF-1 y SKN-1/Nrf. DAF-2, ortólogo del receptor insulina/IGF-1, y otros componentes de la ruta que promueven IIS están coloreados en rojo, mientras que las moléculas que antagonizan a IIS o son antagonizadas por IIS están en color verde. Los péptidos similares a la insulina (ILPs) que pueden promover o antagonizar la actividad de DAF-2 se representan como puntos de color negro. Fuente: wormbook.org.

Dos componentes claves en la ruta de señalización de la insulina son los gerontogenes *daf-2* y *age-1*, ortólogos del receptor insulina/IGF-1 (InR) y de la quinasa-3-OH fosfatidilinositol (PI3K), respectivamente. Dos de los descubrimientos pioneros y más importantes en genética del envejecimiento en *C. elegans* fueron el hallazgo de que las mutaciones en los genes *daf-2* y *age-1* duplicaban la vida media de la cepa silvestre del nematodo (Friedman y Johnson, 1988; Kenyon et al., 1993). Otra implicación importante de estos descubrimientos fue conocer que el envejecimiento puede estar modulado por hormonas peptídicas (Kimura et al., 1997). *Caenorhabditis elegans* expresa unos 40 péptidos del tipo a la insulina (ILPs), que pueden ser agonistas (como INS-7) o antagonistas (como INS-1) de DAF-2 (Lapierre y Hansen, 2012). La activación de DAF-2, un receptor tirosina quinasa, se produce gracias a la unión al receptor a péptidos similares a la insulina. Dicha activación causa la fosforilación del receptor que produce la activación AGE-1, lo que conlleva el aumento en la

concentración de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Este proceso es antagónico al que produce DAF-18/PTEN, que promueve la conversión de PIP3 a fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2). Las señales proporcionadas por PIP3 activan la cascada de señalización a través de diferentes quinasas, formadas por la proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol (PDK-1), la proteína quinasa B (AKT-1/-2) y la quinasa 1 inducible de suero y glucocorticoide (SGK-1). El proceso culmina con la fosforilación y, por tanto, la inactivación del factor de transcripción DAF-16/FOXO, que queda secuestrado en el citoplasma (Lin et al., 1997a; Ogg et al., 1997). De esta manera, los animales presentan un crecimiento y una esperanza de vida normal.

Junto a DAF-16/FOXO, los factores de transcripción más importantes en longevidad regulados por IIS son el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1) y SKN-1/factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). La fosforilación de dichos factores regula la interacción con otras proteínas que controlan su localización subcelular e impiden su entrada al núcleo. Entre ellas se encuentran las proteínas PAR-5 y FTT-2, homólogas de la familia de proteínas 14-3-3, que interaccionan con DAF-16 controlando su localización citoplasmática, y las proteínas DDL-2, DDL-1 y HSB-1 que interaccionarían con HSF-1 inhibiéndolo (Figura II.16) (Chiang et al., 2012; Altintas et al., 2016). Por el contrario, la inhibición de DAF-2, por incremento de la actividad DAF-18/PTEN, estrés (térmico, oxidativo, inanición) o una reducida señal de IIS (Antebi, 2007), produce translocación de los factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo, lo que da lugar a cambios en la expresión de varios genes. De esta manera la ruta IIS actúa como un sistema en el cual muchos componentes transducen señales que modulan el proceso de envejecimiento dependiendo de las condiciones extracelulares.

Existen, además, otros mecanismos que influyen en la actividad de DAF-16/FOXO; por ejemplo, la actuación de diferentes quinasas alternativas como la ruta JNK-1 (homóloga de la ruta quinasa Jun-N-terminal) (Oh et al., 2005), AAK-2 (homólogo de la proteína quinasa activada por AMP, AMPK) (Greer et al., 2007) o CST-1 (homólogo de la proteína quinasa Ste20 de mamíferos MST-1) (Lehtinen et al., 2006). Otras proteínas que también están implicadas en la regulación de DAF-16/FOXO son PRMT-1, unas proteínas de la familia de metiltransferasas de arginina (Takahashi et al.,

2011), y RLE-1, una enzima E3 ubiquitín ligasa que cataliza la ubiquitinación de DAF-16/FOXO. En definitiva, son diversos los factores que modulan la actividad de IIS para asegurar la respuesta transcripcional adecuada a diferentes señales ambientales u hormonales.

Una vez en el interior nuclear, DAF-16/FOXO, HSF-1 y SKN-1/Nrf2 regulan la expresión de muchos genes diana, por ejemplo, genes de defensa frente a patógenos bacterianos (*lys-7*, *spp-1*), catalasa (*ctl-1*), superóxido dismutasa-3 (*sod-3*), metalotioneína (*mtl-1*) o chaperonas moleculares (p.ej., proteína de choque térmico pequeña (*hsp*)-16.2 (*hsp-16.2*) y glutatión-S-transferasa (*gst-4*)). Todos ellos son factores clave que contribuyen a la longevidad, la tolerancia al estrés, la respuesta a bacterias patógenas y la supresión del plegamiento incorrecto de proteínas (Hsu et al., 2003; Murphy et al., 2003; Antebi, 2007; Tullet et al., 2008). El factor de transcripción SKN-1/Nrf2, regula la expresión de genes involucrados en resistencia a estrés oxidativo y desintoxicación en respuesta a una reducción en la señalización IIS. SKN-1 también promueve la homeostasis proteica a través de la regulación del proteosoma (Kahn et al., 2008) y produce un aumento de la longevidad, aunque de manera independiente a DAF-16/FOXO (Tullet et al., 2008 y 2017). Por su parte, el factor de transcripción HSF-1 guía la actividad de DAF-16/FOXO e induce de forma cooperativa la transcripción de un conjunto de genes diana, como las proteínas de choque térmico implicadas en proteostasis (Hsu et al., 2003). HSF-1 se une a regiones específicas del ADN que contienen elementos de choque térmico (HSEs) (Kay et al., 1986). La unión de HSF-1 a HSEs conduce a la inducción de genes que codifican chaperonas moleculares, como HSP-16 o HSP-70, cuya sobreexpresión aumenta la esperanza de vida (Yokoyama et al., 2002; Walker et al., 2003). De esta manera, HSF-1 conduciría a un aumento de la longevidad gracias a la sobrerregulación de una red de chaperonas que mejoraría el plegamiento adecuado de varias proteínas (Hsu et al., 2003).

- **Ruta de señalización SKN-1/ Nrf2**

El factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) pertenece a una familia de proteínas que poseen un dominio cremallera de leucinas (bZip) en la región C-terminal (Kensler et al., 2007; Blackwell et al., 2015). Este factor junto con otras

proteínas Nrf/CNC realizan en mamíferos funciones de protección y mantenimiento. La función más conocida del factor de transcripción Nrf2 es regular las defensas antioxidantes y xenobióticas, aunque también se ha relacionado con otras funciones, como la homeostasis y la regulación metabólica (Kensler et al., 2007; Hayes y Dinkova-Kostova, 2014; Blackwell et al., 2015). Nrf2 regula la expresión de genes de enzimas detoxificantes de fase II y proteínas antioxidantes, como superóxido dismutasas (SOD), glutatión-S-transferasas (GST), glutatión peroxidasas (GPx), NAD(P)H-quinona oxidoreductasa (NQO-1) o glutatión (Nguyen et al., 2009; Chen et al., 2014). En condiciones fisiológicas, Nrf2 permanece unido a la proteína Keap1 que lo retiene constitutivamente en el citoplasma; dicha unión conlleva la degradación permanente de Nrf2 por el proteosoma. Diversos estímulos oxidativos o electrofílicos, de naturaleza química muy diversa, pueden inducir la disociación del complejo Nrf2-Keap1 por modificación de los residuos de cisteína de Keap1. Esto lleva a la translocación eventual de Nrf2 al núcleo y, una vez allí, puede dimerizar con otros factores de transcripción bZIP, como las proteínas Maf pequeñas (MafG, MafK y MafF), con las Maf grandes (c-Maf) o con otras proteínas bZIP. El heterodímero se une a una secuencia específica del ADN, los elementos de respuesta antioxidante (ARE), que se encuentran en la región promotora de genes que codifican enzimas de fase II y proteínas antioxidantes (Figura II.17) (Surh et al., 2008; Nguyen et al., 2009; Hayes y Dinkova-Kostova, 2014; Koch et al., 2014).

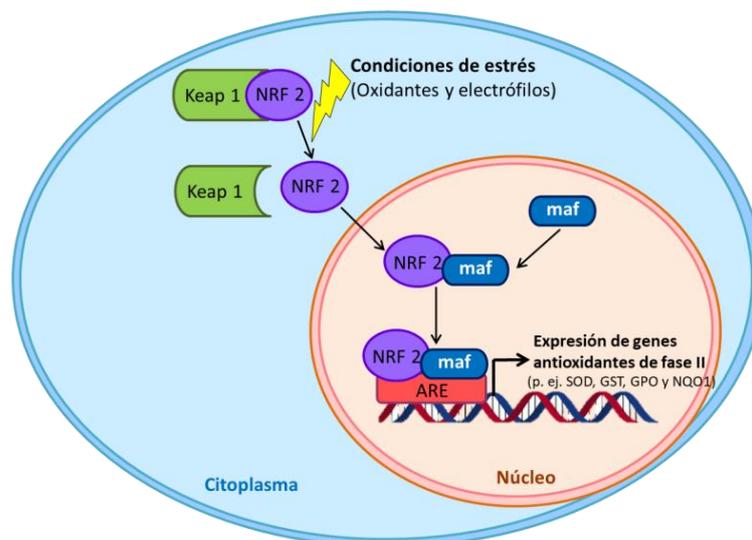


Figura II.17. Esquema de la ruta de señalización SKN-1/ Nrf2.

En *C. elegans*, *skn-1* codifica una secuencia funcional del ortólogo de proteínas Nrf/CNC. Aunque SKN-1 ha divergido de las proteínas Nrf/CNC de mamíferos en aspectos como el modo de unión al ADN, ya que carece del módulo de dimerización bZIP, muestra una conservación funcional destacable con las proteínas Nrf/CNC de otras especies y regula muchas de las mismas familias de genes diana (Blackwell et al., 1994). Al igual que con Nrf2, aunque inicialmente se descubrió que controlaba la defensa frente al estrés oxidativo, posteriormente se vio que participa en un amplio rango de procesos de detoxificación, como inmunidad, proteostasis y metabolismo. Además, actualmente se considera que SKN-1 también funciona manteniendo la homeostasis de estos procesos (Blackwell et al., 2015). En situaciones de un aumento de ROS o en presencia de xenobióticos, SKN-1 es activado mediante su translocación nuclear, lo que induce la activación de genes involucrados en la respuesta frente a estrés oxidativo (An y Blackwell 2003; Miranda-Vizuete y Veal, 2017). Los mutantes *skn-1* son sensibles al estrés oxidativo y presentan una vida media más corta, mientras que la sobreexpresión de *skn-1* (constitutivamente localizado en los núcleos intestinales) contribuye a aumentar la longevidad y la resistencia al estrés (An y Blackwell 2003; Tullet et al., 2008; Shen et al., 2018).

- **Señalización a través de TOR (Target Of Rapamycin)**

La ruta de señalización TOR regula el crecimiento, proliferación, motilidad y supervivencia celular, así como autofagia, síntesis y transcripción de proteínas en respuesta a la disponibilidad de aminoácidos y factores de crecimiento (Wullschleger y Loewith, 2006; Lapierre y Hansen, 2012; Uno y Nishida, 2016). TOR es un sensor de nutrientes, diana de rapamicina, que media la respuesta metabólica en la restricción calórica, influyendo en la longevidad. Condiciones deficientes de nutrientes y energía inhiben la actividad de TOR en *C. elegans* lo que supone un aumento de la vida media de manera dependiente de DAF-16/FOXO y de SKN-1/Nrf (Robida-Stubbs et al., 2012). Además, el aumento de la longevidad inducida por la inhibición de TOR en *C. elegans* también está mediada por el factor de transcripción PHA-4/FOXA (Sheaffer et al., 2008). PHA-4 regula la autofagia, un proceso que produce la degradación lisosómica a gran escala y el reciclaje del cargamento citosólico secuestrado por vacuolas. Se ha

visto que la autofagia tiene un papel importante en la regulación de la vida media, ya que parece que un aumento de la misma protege de la agregación de proteínas al conducir a una eliminación más eficiente de los agregados de proteínas tóxicas, lo que retrasaría el colapso de la proteostasis observado durante el envejecimiento (Revisado en Lapierre et al., 2011).

Por último, TOR regula la expresión del péptido similar a la insulina INS-7 (Honjoh et al., 2009), lo que sugiere que TOR, al igual que DAF-2, modula el envejecimiento a través de efectos sistémicos en hormonas. Recientemente se ha visto que la inhibición doble de *daf-2* y *rsk-1* (quinasa ribosomal S6 de *C. elegans* y diana/blanco de TOR) aumenta la longevidad en *C. elegans* de manera sinérgica (Chen et al., 2013). Este aumento sinérgico de la longevidad requiere la regulación de DAF-16 mediante la activación del complejo de proteínas quinasas activada por AMP (AMPK) (Chen et al., 2013). También se ha visto que la ruta de señalización TOR promueve la longevidad por inhibición de la ruta IIS en ayuno (Honjoh et al., 2009).

Por lo tanto, aunque son necesarios más estudios para entender completamente los mecanismos moleculares de TOR en *C. elegans*, parece que las rutas de señalización IIS y TOR actúan en varios puntos comunes, como los factores de transcripción (DAF-16, SKN-1), los genes diana codificantes de lipasas y *ins-7*, y comparten posibles mecanismos como la autofagia y el metabolismo lipídico (Lapierre y Hansen, 2012).

- **Sirtuinas (ruta de señalización SIR-2.1/SIRT1)**

Las sirtuinas pertenecen a una familia de proteínas desacetilasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y están relacionadas con la señalización de nutrientes celulares a través de NAD (Shen et al., 2018). Estas proteínas están evolutivamente conservadas y se encuentran presentes en muchos organismos, Sir2 en *Saccharomyces cerevisiae*, SIRT1 en mamíferos y su homólogo SIR-2.1 en *C. elegans*. Originariamente fueron caracterizadas como reguladores positivos de longevidad en levaduras (Kaeberlein et al., 1999), habiéndose demostrado que Sir2 puede mediar la inducción de la longevidad por restricción calórica moderada (Lin et al., 2002), aunque no por restricción calórica severa inducida (Kaeberlein et al., 2004). En *C. elegans*, la expresión *sir-2.1* es sensible a cambios metabólicos en el medio celular, incluyendo

disponibilidad de energía y nutrientes y el estrés celular (Lin y Guarente, 2003). Pese a algunas controversias surgidas en los primeros estudios sobre *sir-2.1* (Tissenbaum y Guarente, 2001; Uno y Nishida, 2016), se ha demostrado que la sobreexpresión de *sir-2.1* en *C. elegans* aumenta la vida media, sugiriendo que es un regulador conservado del envejecimiento en el organismo. Además, esta extensión de la longevidad requiere DAF-16/FoxO (Berdichevsky et al., 2006).

- **Señalización de la línea germinal (mediante hormonas esteroideas)**

La línea germinal de *C. elegans* integra la señalización de nutrientes y comunicación con otros tejidos que modulan el envejecimiento. La señalización procedente de las células madre de la línea germinal en proliferación actuaría como regulador negativo de la longevidad mediante la inhibición de la actividad de DAF-16/FOXO y de DAF-12 (receptor nuclear de hormonas) (Hsin y Kenyon, 1999; Baumeister et al., 2006). La eliminación de la línea germinal produce aproximadamente un aumento del 60 % en la longevidad y dicho aumento requiere de DAF-16/FOXO. Sin embargo, los individuos en los que se elimina conjuntamente la línea germinal y la gónada somática muestran una duración normal de la vida media (Hsin y Kenyon, 1999). Por ello, es posible que existan rutas de señalización opuestas producidas desde la línea germinal y la gónada somática. La relación entre la línea germinal y la longevidad no es exclusiva de *C. elegans*, sino que se han descrito efectos similares tanto en *Drosophila* como en ratones (Kenyon, 2005). Se ha propuesto que la proliferación de estas células madres influye en la longevidad afectando bien la producción de hormonas esteroideas, que son ligando de DAF-12, o la respuesta a las mismas (Arantes-Oliveira et al., 2002). De hecho, se ha demostrado que la línea germinal regula el gen *daf-9*, ortólogo del citocromo P450, que sintetiza un ligando esteroide para el receptor DAF-12 (Gerisch y Antebi, 2004).

También se requieren otros factores que influyen en la señalización de la ruta de la insulina/IGF-1 para que los animales que carecen de línea germinal aumenten la longevidad, como DAF-18/PTEN, el cofactor SMK-1/SMEK-1 y HSF-1, además de otros específicos de la señalización de la línea germinal, como el factor de transcripción de

elongación TCER-1/TCERG1 y la proteína KRI-1/KRIT-1 (Revisado en Lapierre y Hansen, 2012).

- **Señalización por mitocondria**

Las mitocondrias son orgánulos esenciales implicados en metabolismo celular y apoptosis. Como consecuencia del metabolismo celular, los organismos producen radicales libres endógenos, entre los que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS). La mayor producción de ROS tiene lugar en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (Van Raamsdonk y Hekimi, 2010), siendo ésta, por tanto, su mayor fuente. La generación de ROS puede resultar beneficiosa para las células, mediante su implicación en funciones inter- e intracelulares de señalización, y perjudicial debido a las modificaciones que producen en biomoléculas celulares (proteínas, lípidos y ADN), cuya acumulación ha sido asociada con numerosas enfermedades (Evans et al., 2004).

Las ROS mitocondriales fueron propuestas como la causa principal del envejecimiento. Esta hipótesis se conoce como la teoría de radicales libres mitocondriales del envejecimiento (Harman, 1972). De hecho, estudios no sesgados con RNAi a gran escala de genes asociados con la extensión de la vida media han revelado que la mayoría de los genes que promueven la extensión de la longevidad están involucrados en rutas metabólicas y componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Lee et al., 2003; Hamilton et al., 2005; Hansen et al., 2005).

Sin embargo, se vio que la disfunción de SOD-2 (superóxido dismutasa) en *C. elegans*, que predice un aumento del daño oxidativo, producía un aumento de la vida media (Van Remmen et al., 2003; Van Raamsdonk y Hekimi, 2009). En estudios realizados por Yang y Hekimi (2010) se encontró que mutantes que presentaban mayor cantidad del radical anión superóxido mostraban una mayor longevidad. Estos autores también comprobaron que un tratamiento leve con el pro-oxidante paraquat también provocaba un aumento de la vida media. También se ha visto que la inhibición de la respiración puede alargar la vida induciendo un aumento moderado de ROS, efecto que parece estar mediado por HIF-1 (homólogo del factor inducible de hipoxia), AAK-2 (homólogo de AMPK en *C. elegans*) (Hwang et al., 2014), CEH-23 (codifica una proteína

nuclear de homeodominio) (Walter et al., 2011), CEP-1 (codifica el ortólogo en humanos de la proteína supresora de tumores p53) (Baruah et al., 2014), SKN-1 y DAF-16 (Schmeisser et al., 2013; Uno y Nishida, 2016). Además, como las mitocondrias tienen un papel central en la producción de energía celular, es probable que tengan también un papel importante en la regulación de la longevidad en respuesta a la restricción dietética. La restricción de glucosa promueve la formación de ROS, lo cual podría provocar una respuesta que en última instancia condujera a una variedad de efectos anti-envejecimiento y longevidad. SKN-1 y AAK-2 (de manera dependiente a DAF-16) median la respuesta tanto de la longevidad inducida por restricción calórica (Bishop y Guarante, 2007; Greer et al., 2007) como el aumento de longevidad inducido por un leve incremento de los niveles de ROS (Schmeisser et al., 2013; Hwang et al., 2014), lo que sugiere que SKN-1 y AAK-2 podrían funcionar como un enlace entre la restricción dietética y la función mitocondrial (Uno y Nishida, 2016)

Por otro lado, la activación de UPR^{mt} (respuesta mitocondrial a proteínas desplegadas) se ha relacionado con la extensión de la longevidad en *C. elegans* y otros organismos (Durieux et al., 2011; Houtkooper et al., 2013; Jovaisaite et al., 2014), aunque la relación de este sistema con el envejecimiento es compleja y se encuentra aún bajo discusión (Bennett et al., 2014). La UPR^{mt} es un mecanismo de respuesta a estrés específico de las mitocondrias, que responde a diferentes tipos de perturbaciones, como el mal plegamiento de proteínas mitocondriales o alteraciones en complejos multiméricos, como la cadena de transporte de electrones, produciendo una señal que es transmitida desde la mitocondria al núcleo para aumentar la expresión de proteínas chaperonas como HSP-6 y HSP-60 (Benedetti et al., 2006; Durieux et al., 2011). HSP-6 pertenece a la familia de chaperonas de choque térmico HSP-70, y HSP-60 a la familia de chaperonas GroE/HSP60/HSP10, ambas implicadas en la respuesta mitocondrial a proteínas desplegadas. Estas proteínas son transportadas a la matriz de la mitocondria para restablecer la homeostasis como respuesta al estrés (Haynes y Ron, 2010). Los mecanismos de respuesta UPR existen en diferentes compartimentos de la célula; además de en las mitocondrias, se encuentran en citoplasma y retículo endoplasmático. Todos ellos se encuentran relacionados, requieren una estrecha comunicación con el núcleo y tienen por objetivo mantener la

homeostasis proteica o proteotasis, es decir, el mantenimiento de todas las rutas implicadas en la producción, plegamiento y degradación de las proteínas, lo que resulta esencial para la función y supervivencia celular y del organismo (Jovaisaite et al., 2014).

Pese a las diferencias observadas en los distintos estudios, todos los autores parecen coincidir en resaltar la importancia central de esta ruta y en que parece una vía clave para investigaciones futuras en estudios sobre mecanismos de control, calidad mitocondrial y envejecimiento, además de proporcionar oportunidades terapéuticas para enfermedades metabólicas y neurodegenerativas o cáncer (Bennett et al., 2014; Jovaisaite et al., 2014).

2.4 Estudios de flavonoides (flavan-3-oles y flavonoles) en *Caenorhabditis elegans*

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios con flavonoides o extractos ricos en los mismos para investigar los efectos y los mecanismos moleculares a través de los que actúan, usando *C. elegans* como organismo modelo. Para esta revisión, se han seleccionado los trabajos realizados con las dos familias de flavonoides que son objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral: flavan-3-oles y flavonoles, tanto de compuestos puros como de extractos que presenten una fracción destacable de los mismos. Se puede anticipar que muchos de los estudios realizados coinciden en señalar que diferentes clases de flavonoides parecen influir en la ruta de la señalización de la insulina/IGF-1, representada nuevamente en la Figura II.18 en forma de esquema simplificado.

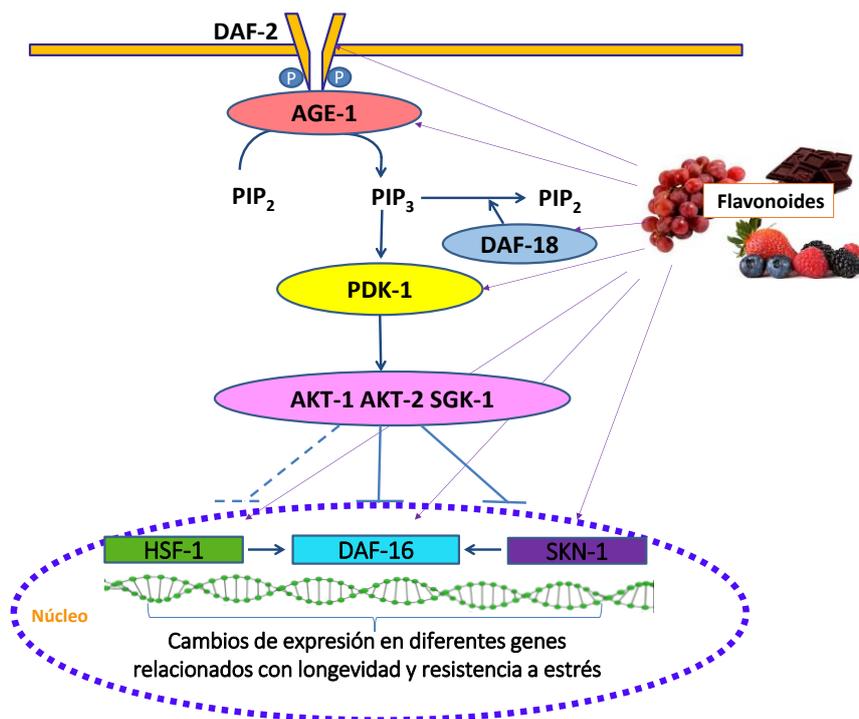


Figura II.18. Esquema simplificado de la ruta de señalización de la insulina indicándose los objetivos moleculares que, de acuerdo con la bibliografía, podrían estar modulados por flavonoides.

- **Estudios con flavan-3-oles puros**

Brown et al. (2006) observaron que el tratamiento de *C. elegans* con **epigallocatequina-3-O-galato** (EGCG), catequina mayoritaria en el té, era capaz de reducir los niveles endógenos de peróxido de hidrógeno de manera dependiente de la dosis, a partir de 10 μM y hasta una concentración de 100 μM en el medio de cultivo, cuando el tratamiento se realizaba en individuos hasta el 5º día de adulto, pero no en gusanos de mayor edad. También determinaron que EGCG producía una disminución moderada en la parálisis inducida por el péptido β -amiloide en *C. elegans* transgénicos, lo que confirmaba lo observado en estudios *in vitro*, que mostraban que esta catequina era capaz de atenuar la toxicidad inducida por el péptido en cultivos de neuronas del hipocampo. Sin embargo, EGCG no inducía un aumento en la vida media ni máxima del gusano (Brown et al., 2006). En gusanos tratados con EGCG (0,2 μM , 2,2 μM y 22 μM), Zhang et al. (2009) también encontraron una reducción en los niveles de ROS en el 2º día de adulto, tanto en condiciones normales de cultivo como tras aplicación de estrés oxidativo por tratamiento con juglona (300 μM). En este caso, se producía un aumento en la vida media en los individuos sometidos a estrés, pero no bajo condiciones normales de crecimiento. Estos resultados fueron justificados por la sobrerregulación de proteínas relacionadas con resistencia al estrés, incluyendo superóxido dismutasa 3 (SOD-3) y proteína de shock térmico (HSP-16,2), y con la sobrerregulación significativa (*sod-3* y *skn-1*) y no significativa (*daf-16*) de genes relacionados con envejecimiento (Zhang et al., 2009). Abbas y Wink (2009) observaron que el tratamiento con EGCG (220 μM) aumentaba la resistencia al estrés y la vida media en la cepa silvestre N2 de *C. elegans* y en las cepas mutantes *mev-1(kn1)* y *fem-1(hc17)*, y también que reducía los niveles intracelulares de H_2O_2 y la expresión de *Phsp-16.2::gfp* inducida por juglona. En estudios posteriores, estos mismos autores encontraron que la expresión de *hsp-16.1* y *hsp-16.2*, cuantificada mediante RT-qPCR, era significativamente menor bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por juglona (20 μM) en gusanos cultivados en presencia de EGCG (220 μM) que en controles sin EGCG (Abbas y Wink, 2010). Además, vieron que el tratamiento con EGCG inducía la translocación de DAF-16 desde el citoplasma al núcleo, sugiriendo la implicación de la ruta de la insulina/IGF-1, así como que disminuía los depósitos de β -

amiloide y la acumulación de lipofuscina, un pigmento relacionado con el envejecimiento. De modo similar, Bartholome et al. (2010) encontraron un aumento en la vida media en *C. elegans* tratado con EGCG (100 μ M) y EC (100 μ M) y observaron que la exposición del gusano a EGCG suponía una translocación de DAF-16 al núcleo y una mayor expresión de *sod-3*.

En un estudio reciente, Xiong et al. (2018) investigaron los efectos de diferentes concentraciones de EGCG en *C. elegans*, encontrando que producía un aumento de la vida media con una relación dosis-respuesta en forma de U invertida cuando se administraba EGCG a lo largo de toda la vida del gusano o desde principios a mediados de la edad adulta. La respuesta a EGCG disminuía con el envejecimiento, el cual neutralizaba sus efectos beneficiosos. El aumento en la longevidad fue asociado a un incremento transitorio de las ROS, que producía una activación de la respuesta antioxidante, y a la modulación de la señalización AAK-2/AMPK, SIR-2.1/SIRT1 y DAF-16/FOXO (Xiong et al., 2018).

De manera general, pese a los distintos resultados en cuanto a la influencia sobre la longevidad, todos los estudios coinciden en señalar que EGCG mejora la resistencia al estrés oxidativo o térmico del gusano.

Saul et al. (2009, 2011) realizaron ensayos con diferentes concentraciones de **catequina** (C) en distintas cepas de *C. elegans*, encontrando una mejora en la resistencia al estrés oxidativo y la termotolerancia y un aumento en la vida media en la cepa silvestre N2, observando el mayor efecto a concentraciones de 200 μ M en el medio de cultivo. Igualmente, diversas cepas mutantes (*age-1*, *daf-16*, *jnk-1*, *osr-1*, *sek-1*, *sir-2.1*, *skn-1* y *unc-43*) experimentaban un aumento de la vida media en presencia de catequina, aunque no otras (*mev-1*, *akt-2*, *nhr-8* y *daf-2*). En este caso, los autores no encontraban que las cascadas de señalización de insulina/IGF-1 y la calmodulina quinasa II jugaran un papel mecánico relevante, y explicaban la extensión de vida del gusano por la teoría del soma disponible, es decir, que la energía requerida para el aumento de la vida del gusano era sustraída de otros procesos como reproducción y crecimiento. Así, los gusanos tratados con catequina presentaban una reducción en la longitud del cuerpo, que era interpretada como consecuencia de la influencia del

flavonoide en la modulación de la energía en respuesta al estrés y a la activación de los sistemas de reparación que conducen en última instancia al aumento de la vida media del gusano. Saul et al. (2011), además de catequina, estudiaron otros polifenoles (ácido tánico, ácido gálico y ácido elágico), encontrando que todos ellos producían un aumento en la vida media, aunque solo catequina y ácido tánico mejoraban la resistencia al estrés térmico y oxidativo. El aumento de la longevidad era explicado por efectos de la restricción calórica y mecanismos horméticos, en el caso de los ácidos tánico y elágico, y por la existencia de propiedades antimicrobianas, para gálico y elágico. Como conclusión del estudio, los autores destacan la diversidad de mecanismos de acción que pueden intervenir en los efectos de los diferentes polifenoles.

En nuestro departamento se ha investigado el efecto de catequina, **epicatequina** (EC), 3'-*O*-metilepicatequina y 4'-*O*-metilepicatequina en la resistencia al estrés y la duración de vida de *C. elegans* (Surco-Laos et al., 2012). Se encontró un aumento en la vida media de la cepa silvestre del gusano entre un 6-12 % cuando era tratada con los derivados metilados de epicatequina, mientras que este efecto no se observaba en gusanos tratados con EC o C. Al comparar la duración máxima de vida, determinada como la del 10 % de la población más longeva, sí se veía, sin embargo, un aumento en los individuos tratados tanto con EC como con sus derivados metilados, mientras que la catequina seguía sin mostrar efecto. Por otra parte, todos los compuestos producían una mejora de la resistencia a estrés térmico y estrés oxidativo inducido con juglona, con un aumento en la supervivencia de entre un 28 % y un 44 %, siendo EC el compuesto más eficaz en este sentido. Sunagawa et al. (2011) tampoco encontraron un aumento de la vida media en gusanos tratados con EC.

En un estudio posterior (González-Manzano et al., 2012), se evaluó el efecto antioxidante en gusanos tratados con EC y sometidos a estrés térmico el día 6º de adulto. Para ello se analizaron diferentes biomarcadores: ROS, niveles intracelulares de glutatión, y actividades catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD). Tras ser expuestos a estrés térmico, los gusanos que habían sido cultivados en presencia de EC (200 µM), comparados con los no tratados con el flavonoide, presentaban un aumento en los niveles de glutatión reducido (GSH) y una

reducción en los niveles de ROS hasta valores considerados fisiológicos. Sin embargo, no había cambios significativos en la actividad de GPx, CAT y SOD, lo que parecía sugerir que la elevación en los niveles de GSH inducida por EC era suficiente para disminuir los niveles de ROS y aumentar la supervivencia del gusano en condiciones de estrés.

- **Estudios con flavonoles puros**

Existen muchos estudios con el flavonol **quercetina** (Q), probablemente el flavonoide más estudiado en *C. elegans*. Prácticamente en todos los trabajos recogidos en la bibliografía se observa un aumento en la vida media de la cepa silvestre N2 del gusano cuando es tratado con concentraciones de quercetina entre 70 y 200 μM (Kampkötter et al., 2008; Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009; Surco-Laos et al., 2011; Xue et al., 2011; Grünz et al., 2012; Dueñas et al., 2013). Sin embargo, Pietsch et al. (2011) encontraron que concentraciones inferiores (50 μM) y superiores (250 μM) de este flavonol no modificaban la extensión de la vida. Asimismo, quercetina produce una mejora en la resistencia a estrés térmico y oxidativo (inducido por juglona o paraquat) y una reducción en los niveles intracelulares de ROS, tanto en condiciones normales como de estrés térmico (Kampkötter et al., 2007b; Pietsch et al., 2009 y 2011; Surco-Laos et al., 2011; Grünz et al., 2012), así como una reducción en los niveles de proteínas carboniladas (Surco-Laos et al., 2011; Grünz et al., 2012).

En estudios con cepas mutantes, Pietsch et al. (2009) concluyeron que los genes *daf-2* (receptor de la ruta de señalización de la insulina/IGF-I), *age-1* (ortólogo de la subunidad catalítica p110 fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), con un papel central en la ruta de la insulina), *unc-43* (proteína quinasa II dependiente de calmodulina/ Ca^{2+} (CaMKII)) y *sek-1* (ortólogo de MAP2K, que forma parte de la ruta MAP quinasa) eran necesarios para la extensión de la longevidad y el aumento de la resistencia a estrés térmico proporcionada por quercetina (200 μM). Sin embargo, la quercetina seguía aumentando la longevidad en los mutantes *daf-16*, *nhr-8* y *skn-1* (los cuales promueven la expresión de enzimas antioxidantes), *daf-12* (receptor de hormonas esteroideas) y *jnk-1* (regulador postranscripcional de DAF-16), indicando que el aumento en la longevidad inducido por dicho flavonoide era probablemente

independiente de esos genes. De la misma manera, ni la restricción calórica ni las sirtuinas (*sir-2.1*) eran necesarias para aumentar la longevidad mediante el tratamiento con quercetina (Pietsch et al., 2009). En el mismo estudio, estos autores también encontraron que la quercetina (200 μ M) podía prolongar la vida media de los mutantes *mev-1*, los cuales presentan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por el contrario, Grünz et al. (2012) no observaron aumento de la longevidad en esos mutantes al ser suplementados con Q (100 μ M), además vieron que los niveles de ROS disminuían de la misma manera en mutantes *daf-16* que en la cepa silvestre N2, por lo que el descenso de ROS observado en el tratamiento con quercetina no dependía de *daf-16*.

La influencia de DAF-16 en los efectos de quercetina ha sido objeto de controversia. Distintos autores encontraron que la misma era capaz de producir una translocación de DAF-16 del citosol al núcleo (Kampkötter et al., 2007b y 2008; Grünz et al., 2012). Kampkötter et al. (2007b y 2008) sugirieron que esta translocación era la responsable en la mejora de la longevidad y la resistencia a estrés térmico producida por quercetina. Sin embargo, son varios los autores que han observado que este flavonol sigue provocando un aumento de la longevidad y resistencia a estrés térmico en mutantes *daf-16* (Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009; Grünz et al., 2012), por lo que concluyen que la producción de esos efectos es independiente de DAF-16. Aunque está bien descrito que DAF-16 es un componente principal de las rutas de longevidad (Gems y McElwee, 2005), algunos autores también han apuntado que la translocación de DAF-16 al núcleo no garantiza una vida más larga (Lin et al., 2001; Wolff et al., 2006). De acuerdo con Saul et al. (2008), la translocación de DAF-16 al núcleo en respuesta a quercetina sería un efecto circunstancial más que una prueba de un mecanismo de longevidad subyacente.

Resultados diferentes fueron también obtenidos por Kampkötter et al. (2008) y Grünz et al. (2012) al estudiar la expresión de *sod-3*, diana de DAF-16, usando una cepa reportera que expresa GFP bajo el control del promotor de *sod-3*. Grünz et al. (2012) observaron un aumento en *sod-3* tras tratamiento con quercetina (100 μ M, 48 h, empleando al menos 10 gusanos por tratamiento), mientras que Kampkötter et al. (2008) encontraban una reducción de la expresión de *sod-3* (100 μ M de quercetina, 72

h de incubación $n = 170$). Estos últimos autores también observaron una disminución en la expresión de *gst-4* tras someter los gusanos tratados con quercetina (100 μM , 48 h de incubación) a estrés oxidativo inducido con juglona (20 μM , 24 h, $n = 25\text{-}37$ gusanos por grupo de tratamiento).

No solo la concentración, sino también la glicosilación y el patrón de metilación muestran gran influencia en los efectos de quercetina sobre la duración de vida en *C. elegans*. Así, el tratamiento con isoramnetina (3'-*O*-metilquercetina) conducía a una mayor duración en la vida media y máxima de la cepa silvestre del gusano que la exposición a las mismas dosis (200 μM) de tamarixetina (4'-*O*-metilquercetina) o quercetina aglicón (Surco-Laos et al., 2011). Por su parte, el tratamiento con quercetina-3-*O*-glucósido aumentaba la vida de *C. elegans* a bajas concentraciones (10-25 μM), mientras que la exposición a dosis mayores (50-200 μM), a las que el aglicón prolongaba la vida, producía una reducción dosis-dependiente en la duración de vida, sugiriendo una respuesta hormética (Dueñas et al., 2013). Este distinto comportamiento podía explicarse por diferencias en la biodisponibilidad del compuesto, siendo el glucósido captado de manera más eficiente por *C. elegans* que el aglicón, para posteriormente desglicosilarse en el organismo del gusano que, de este modo, acumularía mayores cantidades de quercetina, que sería el compuesto realmente activo. Esta circunstancia se confirmó en ensayos realizados con cepas mutantes de *C. elegans* carentes de actividad β -glucosidasa, en las cuales se anulaban los efectos producidos por quercetina-3-*O*-glucósido (Dueñas et al., 2013). Estos resultados sugerían que la desglicosilación es un paso clave en los efectos de los flavonoles y que el aglicón sería el principal responsable de la actividad biológica *in vivo*, como también se había concluido en estudios con células y tejidos aislados y en modelos animales (Pérez-Vizcaíno et al., 2012).

El tipo de resto azucarado también parece ser importante en los efectos producidos por los flavonoles. Por ejemplo, homo-disacáridos, como quercetina-3-*O*-diramnósido (100 y 200 μM ; Ahn et al., 2014) o quercetina 3-*O*- β -D-glucopiranosido-(4 \rightarrow 1)- β -D-glucopiranosido (66 μM ; Xue et al., 2011) producían un aumento de la longevidad en *C. elegans* que no se observaba en el caso de hetero-disacáridos como quercetina-3-*O*-ramno-glucósido (rutina, 66 μM ; Xue et al., 2011). En el caso de

quercetina 3-*O*-diglucósido, Xue et al. (2011) encontraron que el tratamiento no influía en la expresión de *daf-16*, *age-1* y *sir-2.1*, pero sí producía un aumento significativo en la expresión de *daf-2*, *old-1* (receptor de proteína tirosina quinasa), *osr-1* (resistencia a estrés osmótico-1) y *sek-1* (MAP2K), mucho más acentuado en el caso de *old-1*, que juega un papel importante en resistencia a estrés y longevidad.

Otros flavonoles han sido también objeto de estudio en *C. elegans*. El tratamiento con **kaempferol** (100 μ M) producía en la cepa silvestre un ligero aumento de la longevidad (Grünz et al., 2012), así como un aumento de la supervivencia y una reducción de los niveles intracelulares de ROS bajo condiciones de estrés térmico (Kampkötter et al., 2007a). Como posibles mecanismos de acción se propusieron la activación en la expresión de *sod-3* (Grünz et al., 2012) y la inducción de la translocación de DAF-16 al núcleo (Kampkötter et al., 2007a), aunque mediante el uso del mutante *daf-16*, Grünz et al. (2012) demostraron que esta última era independiente del aumento en la longevidad y de la reducción de los niveles de ROS. Cai et al. (2011) comprobaron que el tratamiento de *C. elegans* con una concentración 45 μ M de icariina (derivado 8-prenil de kaempferol 3,7-*O*-diglucósido) producía un aumento en la longevidad que, sin embargo, no se observaba con concentraciones 15 o 75 μ M. El efecto estaba influido por el patrón de glicosilación, ya que eliminación del azúcar, ya fuera en las dos posiciones 3 y 7 (icaritina) o solo en la 3 (icariside I), anulaba la extensión de la vida media, mientras que el derivado desglucosilado en posición 7 (icariside II) la aumentaba a una concentración 20 μ M, pero no a 10 y 40 μ M. La extensión de la vida media inducida por icariside II era dependiente de la ruta de la insulina (IIS), concretamente de *daf-16*, *daf-2* y *hsf-1*. Asimismo, este compuesto producía un aumento en la expresión de ARNm de *sod-3* y *hsp-12.3*, genes diana de DAF-16, que podía estar relacionado con el aumento también observado en la resistencia al estrés térmico y oxidativo (Cai et al., 2011).

Gusanos tratados con el flavonol **miricetina** (100 μ M) presentaban un aumento en la vida media y un descenso en los niveles intracelulares de ROS respecto a gusanos cultivados en ausencia de dicho flavonol, existiendo una mayor translocación de DAF-16 del citoplasma al núcleo en los gusanos tratados (Grünz et al., 2012; Büchter et al., 2013). En el estudio realizado por Grünz et al. (2012), la extensión de la longevidad era

observada tanto en la cepa silvestre N2 como en mutantes *mev-1* y *daf-16*, mientras que Büchter et al. (2013) no la encontraban en mutantes *daf-16*. Estos últimos autores también señalan que la miricetina no produce una mejora en la resistencia a estrés térmico ni la translocación de SKN-1 al núcleo. Büchter et al. (2015) también estudiaron el efecto en *C. elegans* de distintos derivados metilados de miricetina (laricitrina, siringetina y miricetina trimetiléter; 100 μ M), observando, al igual que para el aglicón, un aumento en la longevidad y una disminución en los niveles intracelulares de ROS. Sin embargo, a diferencia de miricetina, los metilados producían una mejora en la resistencia frente al estrés térmico, así como una translocación de DAF-16 del citoplasma al núcleo mucho más acusada. Los efectos sobre longevidad y resistencia a estrés térmico eran abolidos o menores cuando se estudiaba el efecto de los derivados metilados en la cepa mutante *daf-16* (Büchter et al., 2015).

Por último, Kampkötter et al. (2007a) estudiaron los efectos del flavonol fisetina (100 μ M), comprobando que aumentaba la vida media y reducía la acumulación intracelular de ROS asociada a estrés térmico, y que también causaba la translocación de DAF-16 del citosol al núcleo.

- **Estudios con extractos ricos en flavonoides**

Además de estudios con flavonoides puros, se han realizado ensayos para evaluar los efectos en *C. elegans* de extractos naturales que presentan diferentes tipos de flavonoides. Por ejemplo, se ha visto que algunos **extractos ricos en catequinas y proantocianidinas**, como los obtenidos de arándanos, uvas, manzanas, cacao o raíces de *Cassia abbreviata*, producían un aumento de la resistencia del nematodo frente a estrés oxidativo, un alargamiento de la vida media y/o una modulación de los niveles de ROS (Wilson et al., 2006; Martorell et al., 2011; Sunagawa et al., 2011; Jara-Palacios et al., 2013; Sobeh et al., 2018). Se han descrito diferentes mecanismos de acción según el tipo de extracto. Así, por ejemplo, en los estudios con extractos de cacao (4 mg/mL) enriquecido en flavonoides (12 % de polifenoles totales, donde se incluyen catequina, epicatequina y procianidinas) se apuntaba a que los efectos observados eran dependientes del factor de transcripción DAF-16, lo que implicaba un papel fundamental de la ruta de la insulina, y de sirtuinas, concretamente de SIR-2.1, una

proteína histona deacetilasa NAD⁺-dependiente que se ha visto que juega un papel importante en el estado metabólico y la extensión de la vida media (Martorell et al., 2011). Sunagawa et al. (2011) también observaron que los efectos antienvjecimiento en *C. elegans* producidos por extractos de procianidinas (65 µg/mL) obtenidos de manzanas eran dependientes de *sir-2.1*. Abbas y Wink (2014) relacionaron las catequinas presentes en extractos de té (EC, C, ECG, GC, EGC y EGCG) con una reducción en los niveles de expresión de *hsp-16.2* en gusanos pretratados con una cantidad subletal de juglona. En gusanos pretratados con una cantidad subletal de juglona, Sobeh et al. (2018) asociaron el tratamiento con un extracto de la raíz de *Cassia abbreviata* (100 y 200 µg/mL) rico en proantocianidinas con una reducción de los niveles de *hsp-16.2* y con la activación de la ruta de la insulina mediante la translocación nuclear de DAF-16 del citoplasma al núcleo. En el caso de extractos de arándanos, se vio que el aumento de la longevidad implicaba la ruta CaMKII, que media la resistencia a estrés osmótico, y en concreto a las proteínas OSR-1, UNC-43 y SEK-1, pero no otras rutas que suelen afectar a estrés y longevidad como sirtuinas o los factores de transcripción DAF-16 y SKN-1 (Wilson et al., 2006).

Por otro lado, también se han evaluado en *C. elegans* **extractos que presentan una fracción destacable de flavonoles**, como son los extractos de *Ginkgo biloba* EGb 761, de orujo de semillas de té, de plantas como *Baccharis trimera* o de hojas de árboles como *Chamaecyparis obtusa* y *Alpinia zerumbet* (Strayer et al., 2003; Kampkötter et al., 2007c; Upadhyay et al., 2013; Cheng et al., 2014; Wei et al., 2014). Todos los extractos ensayados producían un aumento en la vida media del gusano, mejora de la resistencia a estrés oxidativo y/o un descenso de los niveles intracelulares de ROS. En el caso de algunos extractos, como los de orujo de semillas de té y de hojas de *Chamaecyparis obtusa*, era destacable que el incremento en la longevidad se producía a muy baja concentración (1-2 mg/L) de extracto (Cheng et al., 2014; Wei et al., 2014). Respecto al mecanismo de acción, Upadhyay et al. (2013) atribuyó el aumento de longevidad a una sobrerregulación de proteínas de resistencia a estrés, SOD-3 y HSP-16.2. Por su parte, los efectos observados en el tratamiento de *C. elegans* con *Ginkgo biloba* se han relacionado con un descenso en la transcripción de los genes de catalasa y en la expresión de *gst-4*, tanto en condiciones normales como de estrés

oxidativo. Además, el extracto reducía la expresión de *Phsp-16.2::gfp* inducida por juglona y por estrés térmico, lo que se interpretaba como capacidad del extracto para reducir los niveles intracelulares de H₂O₂ (Strayer et al., 2003; Kampkötter et al., 2007c). En estudios con extractos de *Baccharis trimera* (carqueja), Paiva et al. (2015) concluían que la mejora en la resistencia a estrés era independiente de las rutas de señalización relacionadas con estrés (p38, JNK y ERK) y de los factores de transcripción SKN-1 y DAF-16. También estudiaron genes de enzimas antioxidantes (*sod-3*, *gcs-1* (γ -glutamylcisteína sintetasa) y *gst-4*, observando una menor expresión de *sod-3* en condiciones normales y de *gcs-1* en condiciones de estrés y un aumento de la expresión de *gst-4* en condiciones normales. Además, encontraron que este extracto producía una mayor actividad del proteosoma y de la expresión de proteínas de choque térmico (Paiva et al., 2015).

La mayoría de estudios en *C. elegans* muestran efectos positivos en longevidad cuando se emplean concentraciones de orden μ M, mientras que dosis más elevadas pueden acortar la vida media del gusano. Sin embargo, parece que no todos los flavonoides actúan a través de los mismos mecanismos de acción, sino que éstos afectan a diferentes dianas moleculares.



III. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Materiales y equipos

3.1.1 Equipos

- ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems).
- Agitador magnético SBS.
- Agitador Vortex IKA Genius 3.
- Autoclave Selecta modelo Presoclave II.
- Balanza analítica Mettler Toledo AG245.
- Baño de agua termostático P-selecta.
- Baño de ultrasonidos Branson modelo 5510.
- Campana de flujo laminar Telstar modelo AV-30/70.
- Centrífuga para tubos eppendorf (Thermo Scientific heraeur Fresco 17).
- Concentrador rotatorio Genevac modelo Mivac.
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) Agilent Technologies serie 1200.
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453 acoplado a un ordenador HP LE 2001 con programa de procesamiento de datos Agilent ChemStation.
- 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.
- Homogeneizador Fastprep THERMO SAVANT FP120.
- Incubadora de agitación VWR.
- Incubadoras refrigeradoras Velp modelo FTC 901y IPP SS Memert.
- Lector de placas FLUOstar Omega Ser.415-1562 BGM LABTECH.
- Lupa Leica M250 FA con cámara Leica DFC420C.
- Microcentrífuga, MiniStar silverline de VWR.

- Microscopio de fluorescencia Olympus BX61 con cámara digital DP72.
- pHmetro Crisol Basic 20.
- Placa térmica para tubos eppendorf (P Selecta).
- Sistema de producción de agua ultra pura Direct-QTM 3 (Millipore).
- Sonicador Microson™ XL2000 100.
- Termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems, Fisher Scientific).
- Ultracentrífuga refrigerada Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments).
- Espectrofotometro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher).
- Rotavapores Büchi R-124, con baño de agua termostatizable B-480 y bombas de vacío B-270.

3.1.2 Materiales, reactivos y disolventes

Applied Biosystems (Carlsbad, USA): SYBR®SelectMaster Mix y kit de retrotranscripción High Capacity cDNA.

Brand GMBH (Wertheim, Germany): placas microtiter Brand 96 pocillos pureGrade y placas Petri de 35 y 60 mm.

Carbosynth (Berkshire, UK): fluoresceína tiosemicarbazida.

Carlo Erba (Rodano, Italia): acetonitrilo.

Fluka Analytical (Madrid, España): medio triptona, ácido tricloroacético.

Francisco Soria Melguizo, Valdemoro (Madrid): Placas de 90 mm.

G.E. Healthcare (Buckinghamshare, U.K): kit para el aislamiento de ARN total Illustra RNAspin mini RNA Isolation Kit.

Merck (Darmstadt, Alemania): dihidrógeno fosfato de potasio, monohidrógeno fosfato de potasio, monohidrógeno fosfato de sodio, Tween 20, ácido acético, sulfato de magnesio, metanol, acetonitrilo.

Panreac (Barcelona, España): cloruro de sodio, cloruro de calcio, solución de hipoclorito de sodio 10 % w/v, metanol, cloruro de hidrógeno, hidróxido de sodio y dimetil sulfóxido (DMSO).

Sigma-Aldrich (Madrid, España): (-)-epicatequina, quercetina, ampicilina (sal sódica), nistatina, agar, extracto de levadura, colesterol, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), peróxido de hidrógeno 30 %, tampón fosfato salino (PBS), 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUDR), reactivo Bradford, seroalbúmina bovina, clorhidrato de guanidina, triptona, 2,4-dinitrofenilhidrazina y patrones de malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (HNE) y hexenal.

VWR (Fontenay-sous-bois, Francia): etanol, ácido fórmico.

3.1.3 Material biológico

La cepa silvestre N2 de *C. elegans* y las cepas mutantes CB1270, *daf-2(e1370)* III; TJ1052, *age-1(hx546)* II; CF1038, *daf-16(mu86)* I; CB1375, *daf-18(e1375)* IV; BQ1, *akt-1(mg306)* V; KQ1323, *akt-2(tm812) sgk-1(ft15)* X; PS3551, *hsf-1(sy441)* I; EU1, *skn-1(zu67)* IV/*nT1[unc-?(n754)let-?]* (IV;V); VC475, *hsp-16.2(gk249)* V; CF1553, *mls84 [(Psod-3::gfp)]*; TJ356, *zls356 [Pdaf-16::daf-16::gfp; rol-6 (su1006)]* IV; CL2166, *dvls19 [(Pgst-4::gfp::NLS; rol-6 (su1006)]* III; AM446, *rmls223 [Phsp70::gfp; rol-6(su1006)]*; CL2070, *dvls70 [Phsp-16.2::gfp; rol-6 (su1006)]* y *E. coli* OP50 resistente a ampicilina fueron obtenidas del Caenorhabditis Genetic Center (CGC) de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, EEUU).

3.1.4 Extractos de orujo de uva

Las muestras secas de extractos de orujo de uva L1, L2, L3 y L4 se produjeron industrialmente por el Grupo Matarromera (Valbuena de Duero, Valladolid, Spain) y fueron preparadas según la metodología explicada en la Patente ES2319032A1 (Moro-González, 2009), para elaboración del producto comercial denominado Eminol®, con variaciones en el proceso de obtención en cada caso (Figura III.1) Las muestras se obtuvieron de orujos de uva utilizados en procesos de vinificación en tinto o en rosado. Todas las uvas empleadas fueron de la variedad Tempranillo de *Vitis vinifera* de viñedos ubicados en la Denominación de Origen Ribera de Duero.

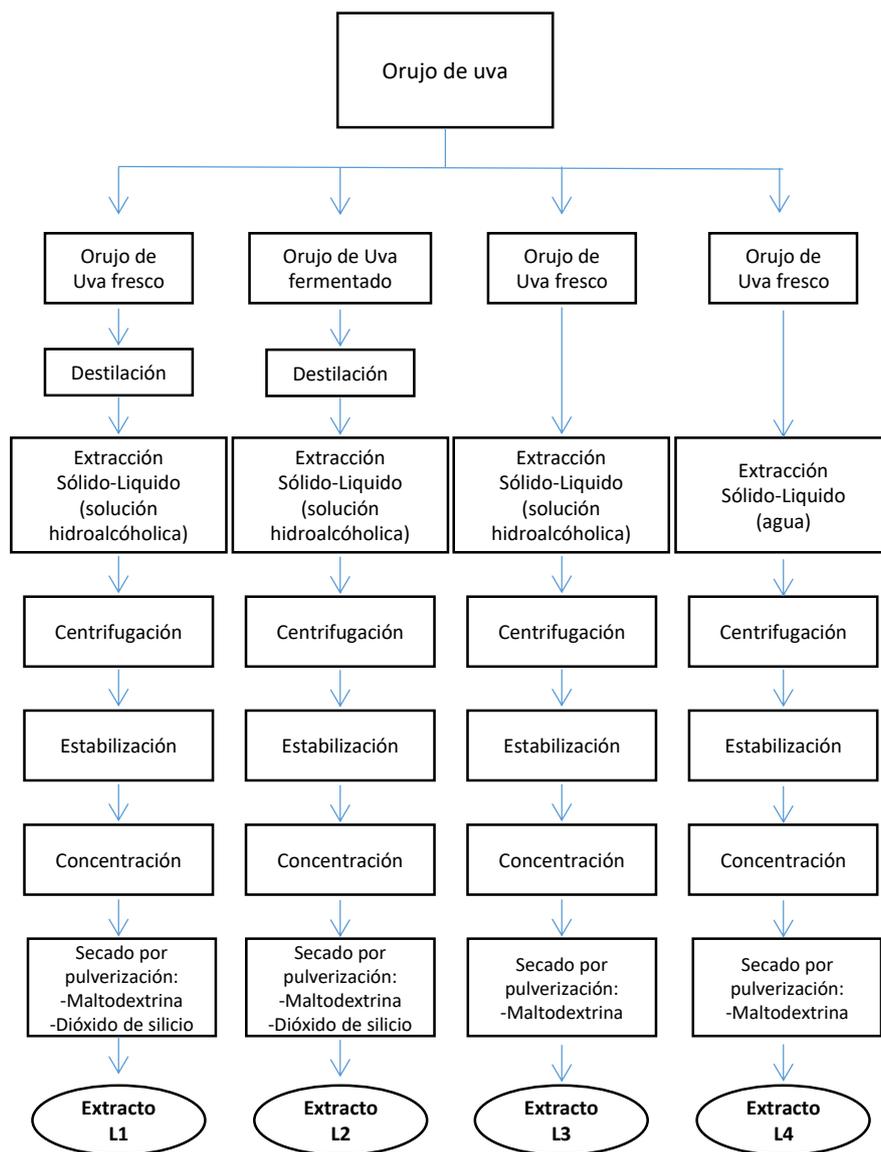


Figura III.1. Diagrama de flujo para la obtención de extractos de orujo de uva (L1, L2, L3 y L4). Esquema adaptado de Gil-Sánchez et al. (2017)

Para las muestras L1 y L2 se realizó un proceso de destilación a la materia prima (orujo de uva fresco para L1 y orujo de uva fermentado para L2) para eliminar los compuestos aromáticos y el alcohol. El residuo se sometió a extracción sólido-líquido, mediante la técnica de difusión, usando como disolvente una solución hidroalcohólica (agua-etanol). Una vez obtenido el extracto líquido, el producto resultante se centrifugó para eliminar posibles residuos sólidos. La solución rica en polifenoles se concentró y finalmente secó mediante un proceso de secado por pulverización, empleando maltodextrina y dióxido de silicio como agentes de encapsulación.

En el caso de L3, orujo de uva fresco se sometía directamente a un proceso de extracción, mediante la técnica de difusión, utilizando una solución hidroalcohólica como disolvente. El extracto líquido obtenido se centrifugó, se concentró y se secó por pulverización. Para el proceso de secado se usó maltodextrina como único agente de encapsulación. La obtención del extracto de L4 se realizó de manera similar a L3, pero utilizando agua como disolvente.

En todos los extractos el contenido de humedad era de un 4,6 %. También se determinaron en los extractos los contenidos de proteínas (8,7 %), grasas (0,8 %) y cenizas (20,7 %).

3.2 Métodos

3.2.1 Determinación de polifenoles totales

La evaluación del contenido de compuestos fenólicos totales presentes en las muestras se realizó mediante el método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 760 nm. Este método proporciona una idea global del contenido fenólico y de la capacidad antioxidante total, pero no es específico de fenoles puesto que evalúa la capacidad de reducción de todas las sustancias presentes en la muestra. De este modo, puede haber interferencias con otros constituyentes reductores, orgánicos o inorgánicos, presentes en el extracto, como azúcares, algunos aminoácidos, ácido ascórbico o determinados metales (Prior et al., 2005).

Los polifenoles totales se determinaron en los extractos fenólicos de uva. Se preparaban soluciones acuosas de cada extracto de 25 mg/mL, que se mantenían durante 30 min en baño de ultrasonidos y se centrifugaban a 2260 g durante 5 min. Posteriormente en un matraz aforado de 100 mL se añadía 1 mL de la muestra, 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 20 mL de Na₂CO₃ al 20 % (p/v) y agua destilada hasta el enrase, transcurridos 30 min la absorbancia se medía a 760 nm. Los resultados se obtuvieron por comparación con una curva preparada con ácido gálico (0-4500 µg/mL) y se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extracto seco.

3.5.2 Determinación de la capacidad antioxidante

Para los ensayos de capacidad antioxidante, se realizó una extracción de 5 mg de cada extracto (L1- L4) con metanol al 75 % manteniendo las muestras durante 30 min en baño de ultrasonidos para posteriormente centrifugar a 6700 g durante 5 min; se realizaron tres ciclos de extracción reuniendo los sobrenadantes obtenidos para ser concentrados seguidamente a presión reducida hasta sequedad y redissolver los residuos obtenidos en 1 mL de metanol 75 %. Los análisis de capacidad antioxidante se realizaron sobre estas muestras empleando dos métodos diferentes: FRAP y ABTS.

- **Método FRAP**

El ensayo FRAP (poder antioxidante de reducción del hierro) se basa en la capacidad que poseen los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ión férrico a ferroso en medio acuoso ácido. Para cuantificar esta actividad reductora se recurre a una reacción colorimétrica tras la adición de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), que a pH ácido se une al ion ferroso formando un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm. El procedimiento utilizado fue el descrito por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. El reactivo FRAP está compuesto por 10 mM TPTZ disuelto en 40 mM HCl, tricloruro de hierro 20 mM ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y tampón acetato (300 mM, pH 3,6), (1:1:10, v/v/v). Para la reacción se mezclan 3 mL del reactivo con 100 μL de muestra y, tras 6 min de incubación a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 593 nm, usando el reactivo FRAP como blanco. La linealidad de la respuesta se comprobó realizando medidas en diferentes diluciones de los extractos en el intervalo de 5 a 0,3 mg extracto/mL. Los resultados se obtuvieron interpolando la absorbancia de las muestras en una curva de calibrado preparada con Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E) 30–1000 μM en metanol 75 %. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron en μmol de equivalentes Trolox (ET) por mg de extracto.

- **Método ABTS**

El ensayo ABTS/persulfato se basa en la capacidad que posee un compuesto para captar el radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$, generado a partir del precursor ABTS (2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)) preparado a una concentración 7 mM y al que se añade 2,45 mM de persulfato potásico como agente oxidante para la generación del radical (Re et al., 1999). Este preparado se deja en oscuridad 16 horas antes de la realización de la medida, tras este tiempo se diluye con el volumen suficiente de PBS a pH 7,4 para dar una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. La reacción transcurre con una disminución progresiva de coloración en la solución que contiene el $\text{ABTS}^{\bullet+}$ conforme éste va siendo capturado por las sustancias antioxidantes presentes en las muestras (Apak et al., 2013). Metodológicamente, se añaden 50 μL de las soluciones a analizar a 2 mL de la solución $\text{ABTS}^{\bullet+}$, se agita en vortex durante 10 s y tras 4 min se

mide la absorbancia a 734 nm. La linealidad de la respuesta se comprueba realizando medidas en diferentes diluciones de los extractos en el intervalo de 5 a 0,3 mg extracto/mL. Los resultados se obtuvieron interpolando la absorbancia de las muestras en una curva de calibrado preparada con Trolox (30–1000 μ M en metanol 75 %). Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron en μ mol de equivalentes Trolox (ET) por mg de extracto.

3.2.3 Análisis de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS

Los análisis se realizaron en un equipo Hewlett-Packard 1100, equipado con una bomba cuaternaria, inyector automático, sistema de termostatación de columnas y detector de diodos (DAD) en circuito integrado, dotado de una célula de flujo para altas presiones con conexión al espectrómetro de masas, acoplado a una estación de control y tratamiento de datos HP ChemStation (rev. A.05.04). Para el análisis por espectrometría de masas (MS) se empleó un espectrómetro API 3200 Qtrap (Applied Biosystems), equipado con una onda de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas triple cuadrupolo que puede actuar además como trampa iónica, asociado al software de tratamiento de datos Analyst 5.1.

- **Análisis de flavanoles, ácidos fenólicos y flavonoles**

Para el análisis de estos grupos de compuestos los extractos de orujo de uva (50 mg) se extrajeron con acetonitrilo al 50 % (1 mL) en un baño de ultrasonidos durante 30 min y se centrifugaron a 6700 g durante 5 min; el sobrenadante se recogía y el precipitado se sometía al mismo proceso otras tres veces. Los cuatro sobrenadantes reunidos se evaporaban a sequedad a presión reducida y el residuo obtenido se redisolvió en 1 mL de acetonitrilo-agua (25:75, v/v) para su inyección en el cromatógrafo.

a) Análisis de flavanoles y derivados de ácidos fenólicos.

La separación se llevó a cabo en una columna Poroshell 120 EC-C18 column (2,7 μ m, 150 mm x 4,6 mm) termostatación a 35 °C. La fase móvil utilizada consistía en (A) ácido fórmico al 0,1 % en agua y (B) acetonitrilo, estableciendo el siguiente gradiente de elución: 0 % a 8 % B durante 5 min, 8 a 10 % B durante 20 min, 10 a 14,5 % B

durante 20 min y 14,5 a 60 % B durante 10 min, a un flujo de 0,5 mL/min. Se llevó a cabo una detección doble en el DAD y por MS. Se utilizó 280 nm como longitud de onda preferente para el registro de los cromatogramas y se obtuvieron los espectros UV-visible de los picos en el intervalo 220 nm a 600 nm. La detección por MS se realizó en modo negativo, registrando los espectros de masas entre m/z 100 y m/z 1400. Se empleó aire *Zero* como gas nebulizador (40 psi) y como gas turbo (400 °C, 30 psi) para la eliminación del eluyente, y nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión (medio). El detector se programaba para realizar dos análisis consecutivos, *full scan* de alta sensibilidad (*Enhanced MS*, EMS) y *Enhanced Product Ion* (EPI), para la fragmentación del ion original. Los parámetros EMS fueron: voltaje del capilar -4500V, potencial de entrada (EP) -7 V, *declustering potential* (DP) -40 V, y energía de colisión (CE) -20 V. Los parámetros EPI fueron: DP -40 V, EP -10 V, CE -25 V y energía de colisión (CES) 0 V.

b) Análisis de flavonoles

La separación se llevó a cabo en una columna Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μ m, 150 mm x 4,6 mm) termostaticada a 35 °C. La fase móvil consistía en (A) ácido fórmico al 0,1 % en agua y (B) acetonitrilo, estableciendo el siguiente gradiente de elución: isocrático a 15 % B durante 5 min, 15 % a 20 % B durante 5 min, 20 % a 35 % B durante 10 min, 35 % a 50 % B durante 10 min y 50 % a 60 % B durante 7 min, a un flujo de 0,5 mL/min. Se llevó a cabo una detección doble en el DAD y por MS. Se utilizó 370 nm como longitud de onda preferente para el registro de los cromatogramas y se obtuvieron los espectros UV-visible de los picos en el intervalo 220 nm a 600 nm. La detección por MS se realizó en modo negativo, registrando los espectros de masas entre m/z 100 y m/z 1400. Se empleó aire *Zero* como gas nebulizador (40 psi) y como gas turbo (400 °C, 30 psi) para la eliminación del eluyente, y nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión (medio). El detector se programaba para realizar dos análisis consecutivos, EMS y EPI. Los parámetros EMS fueron: voltaje del capilar -4500V, EP -6 V, DP -40 V, y CE -10 V. Los parámetros EPI fueron: DP -40 V, EP -10 V, CE -25 V y CES 0 V.

Cuantificación

Los compuestos fenólicos se caracterizaron de acuerdo a su espectro de absorción UV-Vis, espectro de masas y su tiempo de retención comparando con estándares comerciales y cuando no estaban disponibles con nuestra biblioteca de datos. La cuantificación se realizó a partir de las áreas de sus picos cromatográficos registrados a 280 nm (ácidos fenólicos y flavanoles) y 370 nm (flavonoles), por comparación con curvas de calibrado obtenidas con estándares catequina, epicatequina, quercetina, ácido gálico y ácido elágico. Los flavonoles se expresaron como equivalentes de quercetina y las procianidinas como epicatequina. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron en miligramos de compuesto fenólico por gramo de extracto (producto secado por pulverización).

- **Análisis de antocianos**

Para el análisis de los antocianos, los extractos de orujo de uva (50 mg) se extrajeron con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %-acetonitrilo (1:1, v/v) (1 mL) en un baño de ultrasonidos durante 30 min; las soluciones se centrifugaban a 6700 *g* durante 5 min, se recogía y el precipitado se sometía al mismo proceso otras tres veces. Los sobrenadantes reunidos se evaporaban a sequedad a presión reducida y el residuo obtenido se redisolvió en 1 mL de 0,1 % TFA-acetonitrilo (75:25, v/v) para ser analizado por HPLC-DAD-ESI/MS. La separación se llevó a cabo en una columna AQUA (Phenomenex) C18 (5 μ m, 150 mm \times 4,6 mm) termostaticada a 35 °C. La fase móvil consistía en (A) TFA 0,1 % en agua y (B) acetonitrilo, estableciendo el gradiente: isocrático 10 % B durante 5 min, 10 a 15 % B durante 15 min, isocrático 15 % B durante 5 min, 15 % a 18 % B durante 5 min, 18 % a 35 % B durante 20 min y 35 % a 60 % B durante 7 min, a un flujo de 0,5 mL/min. Se llevó a cabo una doble detección en el DAD y por MS. Se utilizó 520 nm como longitud de onda preferente para el registro de los cromatogramas y se obtuvieron los espectros UV-visible de los picos en el intervalo 220 nm a 600 nm. La detección por MS se realizó en modo positivo, registrando los espectros de masas entre *m/z* 100 y *m/z* 900. Se empleó aire *Zero* como gas nebulizador (50 psi) y como gas turbo (600 °C, 40 psi) para la eliminación del eluyente, y nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión (medio). El detector se

programaba para realizar dos análisis consecutivos, EMS y EPI. Los parámetros EMS fueron: voltaje del capilar 5000 V, DP 55 V, EP 4 V y CE 10 V. Los parámetros EPI fueron: DP 55 V, EP 4 V, CE 10 V y CES 0 V.

3.2.4 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 H₂O destilada (volumen de una botella). La mezcla se esteriliza en autoclave durante 60 min, a continuación se atempera en baño de agua a 60 °C durante 40 min. El medio NGM se enriquece con 400 µL CaCl₂ 1 M, 400 µL de colesterol (5 mg/mL etanol), 400 µL MgSO₄ 1 M, 10 mL buffer fosfato 1 M pH 6,0 (108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄ en 1 L de H₂O), 400 µL de ampicilina sódica (50 µg/mL) y 700 µL de nistatina 1 % (1 g/100 mL en etanol: acetato de amonio 1:1), todo ello previamente esterilizado en autoclave. El medio NGM se reparte en placas Petri, con aproximadamente 20 mL, bajo condiciones estériles. 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 sembrarlas, las placas se dejan enfriar a temperatura ambiente, en campana de flujo laminar. Las placas pueden ser almacenadas varios días en refrigeración entre 4 y 8 °C.

3.2.5 Preparación *E. coli* OP50 como fuente de alimento

Las bacterias se cultivaron en medio líquido L. Broth, que contiene: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g NaCl en 1 L de H₂O destilada, ajustando el pH a un valor de 7,0 con NaOH 1 M; el medio de cultivo se esteriliza en autoclave. Las colonias aisladas se almacenaban 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 mantener 20 min en un baño a 60 °C se añaden 200 µL de ampicilina.

El cultivo de *E. coli* OP50 se realizaba en 100 mL del medio L. Broth en un erlenmeyer previamente autoclavado, al que se añadían 100 µL de ampicilina y se inoculaba una colonia aislada de OP50. Todo el proceso era llevado a cabo bajo

condiciones de esterilidad. El cultivo era incubado a 37 °C toda la noche y se almacenaba luego a 4 °C, pudiendo ser usado durante varias semanas.

3.2.6 Sembrado en placas NGM

- *E. coli* OP50: Se siembran 150 µL de bacterias crecidas en el medio de cultivo L Broth en las placas con medio NGM estéril, utilizando una pipeta con puntas autoclavadas y en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. 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, lo que haría más difícil su posterior recogida. Los gusanos tienden a localizarse dentro del césped bacteriano, por lo que se intenta que éste quede centrado en la placa y así evitar la dispersión de los gusanos y facilitar su visualización. Los gusanos se mantienen a 20 °C en placas NGM usando *E. coli* OP50 viva.
- *C. elegans* en placas frescas: La siembra de una nueva placa con gusanos se hace transfiriendo un trozo de agar con gusanos desde una placa almacenada a una placa fresca con ayuda de una espátula esterilizada. Los gusanos del trocito de agar salen y se esparcen por el césped bacteriano de la nueva placa.
- Transferencia de *C. elegans* individualmente: Para transferir gusanos individualmente se utiliza un asa de siembra de alambre de platino de calibre 32. El alambre se introduce en una pipeta Pasteur y su extremo aplanado se redondea con una lima para eliminar los filos del borde, y evitar así dañar a los gusanos y el agar. Antes de transferir los gusanos de una placa a otra, el asa de siembra se flamea para evitar contaminación. El proceso de transferencia se realiza bajo la lupa con una fuente de luz blanca. El gusano que se quiere recoger se observa primero al microscopio, y a continuación lenta y cuidadosamente se coge con el asa. Este proceso se puede facilitar cogiendo con el extremo del asa una mínima cantidad de *E. coli* OP50, lo que ayuda a que el gusano se adhiera más fácilmente. El asa junto con el gusano se apoya cuidadosamente en la nueva placa de agar permitiendo que el nematodo se desprenda. Este proceso puede realizarse con varios gusanos a la vez.

- Transferencia de gran cantidad de *C. elegans*: Para transferir gran cantidad de nematodos, las placas se lavan dos veces con 3 mL de buffer M9 (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 mL 1 M MgSO_4 , H_2O destilada hasta 1 L), la suspensión se centrifuga (90 s, 4500 g). El sobrenadante se elimina y los gusanos son transferidos e incubados en nuevas placas de NGM agar.

3.2.7 Preparación de placas para los ensayos con flavonoides

Para los ensayos de cultivo de los gusanos en presencia de los distintos flavonoides quercetina (Q), epicatequina (EC) o de los extractos ricos en polifenoles (L1, L2, L3 y L4) se preparan placas de agar NGM que contienen dichos flavonoides. Para ello, se partía de una disolución madre de cada flavonoide puro (200 mM) disuelta en DMSO, de la cual se incorporaba un volumen adecuado al agar, previamente calentado en horno microondas y atemperado 20 min a 60 °C en baño, para obtener una concentración final del flavonoide en placa de 200 μM . En el caso de los extractos fenólicos, se preparaban diferentes concentraciones disueltas también en DMSO con el fin de obtener concentraciones en las placas desde 100 a 1000 μg de extracto/mL. Todas las placas contenían una concentración final de 0,1 % (v/v) 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.

Para determinados ensayos con *C. elegans* es esencial partir de una población sincronizada de manera que se trabaje con una única generación de gusanos. Para prevenir la reproducción de la población sincronizada y, por tanto, evitar una mezcla de diferentes generaciones, se añade 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUdR) a las placas a las que serán transferidos los gusanos a partir del 1^{er} día de adulto. FUdR es un compuesto que inhibe la síntesis de ADN y ARN, produciendo la muerte de células mitóticas y la inhibición de la síntesis de proteínas (Hosono, 1978). Dado que las células de nematodos adultos son en su mayoría 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 agua que se añade al medio NGM. La concentración final de

FUdR en las placas es de 150 μ M. A partir del día primer día de adulto los gusanos se pasan cada dos días a placas que contienen el compuesto objeto de estudio y FUdR.

3.2.8 Sincronización de *C. elegans*

La sincronización de *C. elegans* se lleva a cabo con el fin de conseguir que todos los individuos que se van a utilizar para un determinado ensayo se encuentren en el mismo estado larvario, es decir, tengan todos la misma edad. Para ello se dejan crecer durante 3-4 días gusanos en placas NGM con OP50 a 20 °C hasta obtener gran cantidad de huevos y/o hermafroditas con huevos en su interior. El proceso de sincronización se lleva a cabo por tratamiento con una solución de hipoclorito sódico y NaOH, que destruye todas las larvas y los gusanos adultos sin afectar a los huevos.

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 tubos de centrifuga y se centrifuga durante 1 min a 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 μ L a cada tubo la solución de hipoclorito, preparada con 1 mL de lejía comercial y 500 μ L 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, gusanos y *E. coli*. El residuo final del proceso de sincronizado, se resuspende en 2 mL de M9 y se incuba durante 1 día a 20 °C, para permitir el desarrollo de los huevos al estado larvario L1. Las placas se siembran con unos 100-200 μ L de sincronizado (dependiendo de la concentración de huevos del sincronizado) y 150 μ L de *E. coli* OP50 cultivada en medio líquido.

La sincronización también se lleva a cabo mediante otro proceso que consiste en coger un numero conocido de gusanos hermafroditas con huevos en su interior, dejarlos durante 1-2h en las placas del ensayo y tras la puesta de los huevos retirar los gusanos adultos de las placas asegurándose de recoger todos los nematodos que se pusieron previamente.

3.2.9 Ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente

La vida de *C. elegans* es dependiente de la temperatura, existiendo una relación inversa entre la temperatura de cultivo y la vida media del gusano. Con los ensayos de estrés térmico se quería comprobar si los nematodos previamente cultivados en presencia de flavonoides aumentaban su resistencia frente al estrés térmico. Estos ensayos se llevaron a cabo según el método descrito por Saul et al. (2009) con pequeñas modificaciones, como se describe a continuación.

Los huevos sincronizados de N2 o de las cepas mutantes estudiadas (*daf-2(e1370)*, *age-1(hx546)*, *daf-16(mu86)*, *daf-18(e1375)*, *akt-1(mg306)*, *akt-2(tm812);sgk-1(ft15)*, *hsf-1(sy441)*, *skn-1(zu67)*, *hsp-16.2(gk249)*) se sembraban en placas NGM de 90 mm de diámetro que contenían el compuesto a ensayar (200 µM de EC o Q; extractos fenólicos con diferentes concentraciones de 100 a 1000 µg/mL) y se cultivaban a 20 °C. Simultáneamente se realizaban ensayos control en ausencia de los compuestos, pero con la misma concentración de DMSO (0,1 %) en las placas. La influencia del estrés térmico sobre la viabilidad del gusano se evaluaba en diferentes estados de desarrollo, permaneciendo los nematodos en las placas con tratamiento hasta alcanzar el día del ensayo deseado (días 2, 9, 10 o 17).

En todos los casos una vez alcanzado el día de ensayo correspondiente los gusanos se transferían individualmente con el asa de siembra a placas de 35 mm de diámetro (20 gusanos por placa) y se sometían a una temperatura de 35 °C durante 4, 6 u 8 h según los ensayos. Tras el estrés térmico se contaban los nematodos supervivientes, considerando que los gusanos estaban muertos cuando no respondían a ningún estímulo, como ligeros toques con el asa de siembra. Estos ensayos se llevaron a cabo con 100 gusanos por tratamiento y por triplicado.

3.2.10 Ensayos de longevidad

Los ensayos de longevidad se realizaron con la cepa silvestre N2 de *C. elegans* cultivados en presencia de los extractos L3 (100 µg/mL en el medio de cultivo) y L2 (250 µg/mL) y en placas control con el mismo porcentaje de DMSO (0,1 %) que las que contenían los extractos fenólicos. En todos los casos, los gusanos sincronizados en estado larvario L1 se colocaban en placas de agar NGM, de diámetro 90 mm,

sembradas con *E. coli* y se cultivaban a 20 °C hasta alcanzar el estado larvario L4. Una vez alcanzado este estado, los gusanos se transferían con un asa de platino a placas nuevas de 35 mm que contenían FUDR a una concentración de 150 µM para evitar la reproducción y la mezcla de generaciones. Se transferían 20 nematodos por placa. Posteriormente se hacía una transferencia cada 2 días a placas nuevas, también con *E. coli*, FUDR y los diferentes extractos o sin estos últimos (placas control). Los gusanos se contaban cada uno o dos días y, al igual que en los anteriores ensayos, eran considerados muertos si no respondían al toque suave con el asa de platino. Estos ensayos se llevaron a cabo partiendo de aproximadamente 100 gusanos por tratamiento y se realizaron en cada caso por triplicado.

3.2.11 Ensayos de determinación de ROS

El nivel celular de especies reactivas de oxígeno (ROS) se cuantificó en un lector de placas de fluorescencia usando diclorodihidrofluoresceína como reactivo (Wang y Joseph, 1999). Con el objetivo de obtener una población sincronizada de gusanos, los huevos obtenidos como se ha indicado anteriormente se sembraban en placas que contenían los flavonoides o extractos fenólicos y se cultivaban a 20 °C. Simultáneamente se realizaban ensayos control en ausencia de flavonoides, pero con la misma concentración de DMSO en la placa (0,1 %). Los gusanos se mantenían en las placas hasta el día de medida de las ROS, en el cual se transferían individualmente a un pocillo de una placa de 96 pocillos junto con 75 µL de PBS. Posteriormente se incorporaban 25 µL de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) 150 µM en etanol y se medía la fluorescencia inmediatamente después de añadir el reactivo y durante los 30 min siguientes, a intervalos de 10 min, utilizando como λ de excitación y de emisión 485 nm y 535 nm, respectivamente.

El 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 (2',7'-diclorodihidrofluoresceína; DCFH), que en presencia de ROS es oxidado a un compuesto fluorescente (2',7'-diclorofluoresceína; DCF), cuya medida es usada como un índice de los niveles intracelulares de ROS en gusanos individuales (Wang y Joseph, 1999). Con este método se pueden detectar varias ROS a

las que el DCFH-DA es sensible: ONOO^- , H_2O_2 , y OH^\bullet . Otras como superóxido, NO, HOCl o O_2^\bullet no son detectables, ya que no son capaces de oxidar la DCFH (Myhre et al., 2003).

Las determinaciones se llevaron a cabo en los días 2, 4, 7, 9, 13, 15 y 17 de desarrollo de *C. elegans*, tanto tras someter a los gusanos a estrés térmico (2 h a 35 °C) como sin aplicar éste. Por día y tratamiento se realizaban 5 ensayos independientes.

3.2.12 Obtención de homogeneizados de *C. elegans* para determinación de proteínas totales, productos de peroxidación lipídica y proteínas carboniladas

Los huevos se sembraban en placas NGM que contenían EC 200 μM y en placas control sin el flavonoide pero con la misma concentración de DMSO (0,1 %). Los gusanos se cultivaban hasta el día 10 o 17 de adulto, según ensayo, y una vez alcanzada la edad deseada se sometían las placas a una temperatura de 35 °C durante 5 h. Los gusanos de dos placas se recogían en un tubo con buffer fosfato, se lavaban con PBST (PBS + 0,01 Tween 20 %) y PBS y el pellet obtenido se resuspendía en 1 mL de PBS, se transfería a un tubo eppendorf y se almacenaba a -20 °C. Para la posterior realización de las determinaciones, las muestras se dejaban descongelar a temperatura ambiente y se sometían a 3 ciclos de sonicación: un primer ciclo de 60 s y otros dos de 30 s, aumentando la intensidad en cada uno de ellos. Todo el proceso se realizaba en baño de hielo para evitar el calentamiento excesivo de las muestras. El producto final es un homogeneizado sobre el que es posible analizar los productos de peroxidación lipídica, proteínas carboniladas y proteínas totales de *C. elegans*. Todos los homogeneizados se obtuvieron por triplicado.

3.2.13 Determinación de productos de peroxidación lipídica

El método está basado en el análisis por HPLC después de la derivatización de los productos de peroxidación lipídica con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), de acuerdo con el método descrito por Andreoli et al. (2003) con algunas modificaciones. Las proteínas del homogeneizado (350 μL) se eliminaban añadiendo ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (v/v) y se añadían 100 μL de butilhidroxitolueno (BHT) 10 mM disuelto en metanol para la protección de los lípidos; tras mantener 15 min a 4 °C, las muestras se centrifugaban a 10.000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se mezclaba con 100

μL de 10 mM DNPH en HCl 2M y se incubaba 60 min a temperatura ambiente, para después extraer 3 veces con 400 μL de cloroformo cada vez. Se añadían tres partículas desecantes (*molecular sieves*) a la fase orgánica obtenida y se dejaba estar durante 30 min para eliminar posibles restos de fase acuosa y posteriormente se evaporaba a sequedad, resuspendiendo el residuo en 80 μL de ácido acético 0,2 %: acetonitrilo (62:38, v/v) para su análisis por HPLC. La columna utilizada era una Waters Spherisorb S3 ODS-2 C8, 3 μm (4,6 x 150 mm) y la fase móvil una mezcla de (A) ácido acético 0,2 % y (B) acetonitrilo, con el siguiente gradiente de elución: isocrático 38 % B durante 10 min, 38 % a 75 % B 10 min, 75 % a 80 % B en 20 min, con un flujo de 0,6 mL/min. La detección se llevó a cabo por DAD y MS. Como longitudes de onda preferentes para el registro de cromatogramas se emplearon 310 nm y 380 nm. La detección por MS se realizó en modo negativo, registrando los espectros de masas entre m/z 100 y m/z 650. Se empleó aire Zero como gas nebulizador (40 psi) y como gas turbo (400 °C, 30 psi) para la eliminación del eluyente, y nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión (medio). El detector se programó para realizar dos análisis consecutivos, EMS y EPI. Los parámetros EMS fueron: voltaje del capilar -4500 V. DP -20 V, EP -7 V y CE -10 V. Los parámetros EPI fueron: DP -40 V, EP -7 V, CE -20 V and CES 0 V.

Los productos de peroxidación lipídica se cuantificaron por comparación de las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas con curvas de calibrado obtenidas por inyección de diferentes concentraciones de patrones. La cuantificación de malondialdehído se realizó a partir de sus picos registrados a 310 nm, y la de hexenal y 4-HNE a 380 nm, longitudes de onda a las que presentaban su máxima absorción. Las concentraciones de los productos de peroxidación lipídica se expresaron como μg por mg de proteínas totales de gusano, para poder comparar resultados obtenidos en diferentes ensayos, ya que en cada caso se partía de diferentes cantidades de biomasa.

El contenido de proteínas totales se calculó por el método Bradford (Bradford, 1976) ligeramente modificado. Se añadían 25 μL de NaOH 1M a 25 μL de homogeneizado y se calentaba a 80 °C durante 25 min para hidrolizar las proteínas. Después de centrifugar a 10.000 g durante 5 min, 5 μL del sobrenadante se depositaban por triplicado en pocillos de una placa multipocillo junto con 250 μL del reactivo de Bradford y se incubaba 10 min en oscuridad a temperatura ambiente y se

medía la absorbancia a 595 nm en el lector de placas utilizando PBS como blanco. De la misma manera se procesaban soluciones estándar de albúmina de suero bovino (BSA) disueltas en PBS, para preparar la recta de calibrado. La concentración de proteínas en el homogeneizado de gusanos se calcula por interpolación de los valores de absorbancia de las muestras en la recta de calibrado obtenida con BSA.

3.2.14 Determinación de proteínas carboniladas

Estos análisis se llevaron a cabo utilizando un método basado en el descrito por Chaudhuri et al. (2006) para la identificación de proteínas carboniladas en tejido hepático de ratón mediante el uso de fluoresceína tiosemicarbazida (FTC) y cuantificación por densitometría de fluorescencia tras separación por electroforesis (SDS-PAGE), posteriormente adaptado por Mohanty et al. (2010) para el análisis en muestras de plasma. En nuestro caso se realizó una adaptación de este último método para el análisis en los homogeneizados de gusanos. El FTC es un compuesto fluorescente que reacciona específicamente con los grupos carbonilados de proteínas oxidadas y no con lípidos oxidados. La solución madre de FTC 100 mM se prepara en DMSO y se almacena a -20 °C. Para su utilización se diluye en tampón Hepes 0,1 M pH 7 (1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ disuelto en 100 mL de agua y ajustado el pH a 7).

Para la determinación de proteínas carboniladas en *C. elegans* se tomaban 50 μL de homogeneizado de gusano por triplicado, a los que se añadían 50 μL de FTC 0,2 mM. Las muestras se mantenían toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción con FTC tarda en completarse aproximadamente 10 horas. Posteriormente se incorporaban 400 μL de TCA para provocar la precipitación de proteínas, permaneciendo durante 10 min en baño de hielo. Después de una centrifugación a 10.000 g a 4 °C durante 10 min, se eliminaba el exceso de FTC de los pellets por lavado con 1 mL de acetona, agitación en vortex y centrifugación durante 10 min, repitiéndose este proceso 3 veces. Los precipitados se secaban al aire durante una hora y posteriormente se solubilizaban en 50 μL de clorhidrato de guanidina (GuHCl) 6M, para provocar la desnaturalización de las proteínas, incubando durante 10 min. Se diluía 10 veces por adición de 450 μL Hepes buffer 0,1 M y finalmente se añadían 100 μL de cada muestra por triplicado en pocillos de una placa multipocillo de color negro,

para seguidamente medir la fluorescencia en el lector de placas empleando longitudes de onda de emisión y de excitación de 485 nm y 520 nm, respectivamente. La concentración de grupos carbonilos en las muestras se calculaba por interpolación de los datos de fluorescencia con una recta patrón obtenida con diferentes concentraciones de FTC en GuHCl 6M y Hepes buffer. Los resultados se expresaron en nmoles de proteínas carboniladas (expresadas como nmoles de FTC) por mg de proteína de gusano determinada en cada preparación por el método de Bradford.

Para la determinación de proteína total de gusano, se colocaban 125 μ L y 5 μ L de muestras procesadas por el protocolo anteriormente descrito en pocillos de una placa multipocillo transparente, a las que se añadían 125 y 250 μ L de reactivo Bradford, respectivamente, para luego medir la absorbancia a 595 nm en el lector de placas. En la misma placa se realizan dos rectas de calibrado con diferentes niveles de concentración de BSA (0-1 mg/mL y 0-0,1 mg/mL) disuelta 1:10 en GuHCl 6M y tampón Hepes. Para la recta correspondiente a las concentraciones más altas se añadían en la placa 5 μ L de disolución de BSA y 250 μ L de reactivo Bradford, y para la recta más diluida 125 μ L de disolución de BSA y 125 μ L reactivo. La cantidad de proteínas totales en los distintos homogeneizados se calculaba por interpolación en la recta de calibrado.

3.2.15 Cuantificación de ARNm por RT-PCR cuantitativa

Los gusanos se sembraban en placas NGM que contenían EC 200 μ M o Q 200 μ M y en placas control con DMSO (0,1 %) y se cultivaban durante 4 días a lo largo de los cuales se traspasaban los gusanos periódicamente a placas nuevas con flavonoide o DMSO y *E. coli* como alimento. Estos ensayos se realizaron en condiciones normales de crecimiento (20 °C) y previo a la extracción de ARN se sometía a los gusanos a un choque térmico de 5 h a 35 °C. Adicionalmente, se estudió la expresión del gen *skn-1* en larvas sincronizadas L1 cultivadas en condiciones normales en presencia o ausencia de los flavonoides hasta los días 2, 5, 9, 12 y 16 de adulto.

Para extraer el ARN total, los gusanos se recogían de las placas con buffer M9; se realizaban dos lavados con el mismo buffer y el pellet se resuspendía en 300 μ L M9, 3.5 μ L de 2-mercaptoetanol y 350 μ L de buffer de lisis; además, se añadían 10 bolitas

de acero de 10 mm de diámetro. Las muestras se sometían a 7 ciclos de 10 segundos a una velocidad de 5,5 m/s en un homogenizador FastPrep, tras lo cual se colocaban rápidamente en hielo. La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante un Kit comercial Illustra RNAspin mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare). Para cuantificar la cantidad de ARN se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop.

Para sintetizar el ADNc, se realizó una transcripción reversa (RT) con 2 µg del ARN total extraído, utilizando el kit comercial High Capacity cDNA RT Kit Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific.

Para determinar los niveles de expresión de genes se utilizó una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986). La PCR cuantitativa (RT-qPCR) se realizó en un termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystem) utilizando SYBR Green I como fluorocromo. Para la cuantificación relativa del producto se determinó el ciclo umbral o cycle threshold (Ct) durante la fase exponencial del proceso. La cuantificación se llevó a cabo usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con *act-1* como normalizador (Livak et al., 2001). Para el análisis de la expresión de ARNm se realizaron 9 experimentos independientes, determinando la curva de disociación para confirmar una única amplificación.

Los cebadores o “primers” específicos para el ADNc codificante de cada una de las proteínas a estudiar fueron recogidos de la bibliografía (*act-1*, *skn-1*, *daf-16*, *hsp16-2*) o se diseñaron con el programa “OligoAnalyzer 3.1” de Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) y su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los primers utilizados fueron los siguientes:

act-1: CCAGGAATTGCTGATCGTATG (F) y GGAGAGGGAAGCGAGGATAG (R) (Surco-Laos et al 2011)

skn-1: AGTGTCGGCGTTCCAGATTTC (F) y GTCGACGAATCTTGCGAATCA (R) (Martinez-Finley et al., 2014)

daf-16: CCAGACGGAAGGCTTAAACT (F) y ATTCGCATGAAACGAGAATG (R) (Zhang et al., 2015a)

hsp-16.2: CTGCAGAATCTCTCCATCTGAGTC (F) y AGATTCGAAGCAACTGCACC (R) (Zhang et al., 2015a)

hsf-1: GAAATGTTTTGCCGATTTT (F) y CCTTGGGACAGTGGAGTCAT (R) (Kern et al., 2010)

daf-18: F ACATGCTGCGTCAGGATTAT (F) y AAGGAATTGTCCGATGGTACTT (R)

3.2.16 Cuantificación y visualización de fluorescencia

Larvas sincronizadas L1 que expresan como reportero una proteína verde fluorescente (GFP) inducible para los genes *sod-3*, *daf-16*, *hsp-16.2*, *hsp-70* y *gst-4* se sembraron en placas NGM que contenían EC 200 μ M o Q 200 μ M y se cultivaron a 20 °C hasta alcanzar el día deseado para el análisis. Simultáneamente se realizaron ensayos control en ausencia de flavonoides, pero con la misma concentración de DMSO (0,1 %) en las placas.

Los días del ensayo se definieron cuando se observaba una intensidad más alta de fluorescencia después de realizar un seguimiento a lo largo de la vida del gusano de las diferentes cepas tratadas con los flavonoides. En los casos en que no se apreciaba un aumento de la fluorescencia, se analizaron gusanos adultos jóvenes (día 2 de adulto) y adultos mayores (día 9 de adulto). Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones normales de cultivo y tras someter a los gusanos a un estrés térmico (35 °C, 1 h). En las cepas reporteras *hsp-16.2* y *hsp-70*, tras el estrés térmico los gusanos se dejaban recuperar a 20 °C durante 2 y 3 horas, respectivamente, previo a la toma de fotografías para cuantificar su fluorescencia.

La expresión de *gst-4*, *hsp-16.2*, *hsp-70* y *sod-3* se midió cuantificando la fluorescencia del reportero GFP. Para analizar la localización subcelular de DAF-16::GFP, los gusanos se clasificaron como citoplasmático difuso, citoplasmático intermedio/nuclear y translocación nuclear fuerte. Para la cuantificación de la fluorescencia se seleccionaban al azar aproximadamente 35 gusanos de cada tratamiento que se colocaban encima de un portaobjetos con una fina capa de agarosa al 3 % y se anestesiaban con 5 μ L de levamisol, excepto los gusanos DAF-16::GFP que se anestesiaron con 2 % de acida sódica y se cubrieron con un cubreobjetos.

La fluorescencia se midió en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 equipado con un filtro (excitación 480 ± 20 nm; emisión 510 ± 20 nm) y una cámara digital DP72 acoplada al software CellSens para adquisición y análisis de imágenes. La cuantificación de la fluorescencia de los gusanos se realizó mediante el programa image-J. Se llevaron a cabo tres ensayos independientes por cada cepa reportera.

3.2.17 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software para PC SPSS (versión 23.0, SPSS Inc., Chicago). Se utilizó ANOVA para comparaciones múltiples de valores para determinar posibles diferencias significativas entre los grupos tratados y de control en los ensayos de capacidad antioxidante, caracterización de extractos mediante HPLC, ensayos de ROS, lípidos oxidados, proteínas carboniladas, cuantificación de ARNm mediante qPCR y estudios con cepas reporteras. Para los estudios de longevidad, la supervivencia del animal se trazó usando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se analizaron los resultados mediante la prueba de log-rank. Para la supervivencia al estrés térmico, se realizaron tablas de contingencia y se calculó la significación estadística usando el Chi Square Test. En cada análisis, las diferencias significativas se consideraron estadísticamente en el nivel de $p < 0,05$.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 Estudios con extractos de subproductos de vinificación ricos en compuestos fenólicos

4.1.1 Introducción

Las uvas (*Vitis* spp.) son una de las frutas más valoradas en todo el mundo. Existen alrededor de 60 especies que en su mayoría se encuentran en las zonas templadas del hemisferio norte (Yang y Xiao, 2013). Su importancia económica radica en las diferentes posibilidades de su consumo (crudas, pasas, vinagre, vino, zumos, etc.), aunque el 80 % de la cosecha se utiliza para vinificación. Las industrias vinícolas producen millones de toneladas de residuos después de la fermentación. De hecho, se calcula que alrededor del 25 % de las uvas usadas para la producción de vino terminan como desperdicios, lo cual representa un importante problema de gestión tanto medioambiental como económico (Fontana et al., 2013; Yu y Ahmedna, 2013).

Los compuestos fenólicos han sido objeto de atención de numerosos estudios, ya que se han relacionado con potenciales efectos beneficiosos en la prevención de algunas patologías crónicas, como enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, aterosclerosis o algunos tipos de cáncer (Zhu et al., 2015; Yang y Xiao, 2013). En las pieles, semillas y pulpa de las uvas se acumulan compuestos fenólicos de diferentes clases, destacando los flavonoides, entre los que se incluyen monómeros (catequinas), oligómeros y polímeros de flavan-3-oles (proantocianidinas o taninos condensados), antocianos (principalmente malvidina-3-*O*-glucósido) y flavonoles (glicósidos de quercetina, miricetina y kaempferol), pero también existen compuestos no flavonoides, como ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, alcoholes fenólicos, estilbenos y elagitaninos. En el proceso de vinificación solo una parte de los compuestos fenólicos se transfiere al mosto. Como resultado, cantidades importantes de compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides) y otros componentes, como fibra no digerible, lípidos, proteínas y minerales, permanecen en el orujo de uva, formado por los desechos sólidos de semillas, pieles y tallos. Por ello, este subproducto se considera una fuente barata para la extracción de flavonoides y otros compuestos fenólicos con potencial nutracéutico y que podrían usarse en

suplementos dietéticos y para fines cosméticos o farmacéuticos (González-Paramás et al., 2004).

El envejecimiento es un proceso degenerativo que es el resultado de una pérdida gradual de los recursos metabólicos y genéticos necesarios para mantener la integridad y la funcionalidad de todos los componentes celulares (Lapointe y Hekimi, 2010). En los últimos tiempos se ha propuesto que algunas fitomoléculas podrían tener la capacidad de modular la longevidad y limitar los trastornos relacionados con la edad (Asthana et al., 2016). En este sentido, hay evidencias que sugieren que los polifenoles de la dieta pueden contribuir a mitigar el daño celular asociado a la edad relacionado con el estrés oxidativo, la inflamación crónica y la acumulación de toxinas. Por lo tanto, es fundamental llegar a entender el papel que estos compuestos podrían tener en la modulación de enfermedades y trastornos asociadas al envejecimiento (Queen y Tollefsbol, 2010).

Como se recoge en la introducción, *Caenorhabditis elegans* es un nematodo de vida libre que presenta tamaño pequeño, vida corta, alta tasa de reproducción y rutas genéticas bien definidas y conservadas. Gracias a estas características, este gusano se ha utilizado para estudiar el proceso de envejecimiento y cómo se ve afectado por diferentes sustancias, así como para identificar objetivos farmacológicos que podrían promover un envejecimiento saludable en humanos. Se han llevado a cabo varios estudios en *C. elegans* para comprobar los efectos biológicos de compuestos fenólicos o de extractos ricos en polifenoles, encontrando que algunos de estos compuestos son capaces de prolongar la vida media, aumentar la resistencia al estrés y mejorar la inmunidad innata en el nematodo (ver apartado 2.4 de la Introducción). Sin embargo, hasta donde sabemos solo se ha realizado un estudio con extractos de orujo de uva, concretamente obtenidos de la variedad blanca *Zalema*, cultivada en el suroeste de España. En ese trabajo se observó que los gusanos tratados con el extracto de orujo (100 µg/mL), tras someterlos a estrés térmico, experimentaban un aumento de la tasa de supervivencia y una disminución significativa de los niveles de ROS, en comparación los gusanos control (no tratados) (Jara-Palacios et al., 2013).

Como se ha indicado, los subproductos de vinificación podrían ser una fuente interesante de obtención de extractos fenólicos con propiedades beneficiosas. Por

ello, con el objetivo de mejorar el conocimiento sobre la bioactividad y la valorización del orujo de uva, en el presente trabajo se ha estudiado la composición fenólica de cuatro extractos fenólicos de uva tinta utilizada en vinificación (descripción de los extractos en el apartado 3.1.4 de la sección de Materiales y Métodos) y su capacidad antioxidante, y realizado una evaluación de su actividad biológica usando *C. elegans* como organismo modelo.

4.1.2 Caracterización química de los extractos de extractos fenólicos de uva

En la Tabla IV.1.1 se muestran las concentraciones de polifenoles individuales, determinadas por HPLC, de los cuatro extractos fenólicos de uva estudiados, designados como L1-L4. En la Figura IV.1.1 se muestran, a modo de ejemplo, dos cromatogramas representativos, registrados a 280 nm (para ácidos fenólicos y flavanoles) y 370 nm (para flavonoles), correspondientes al extracto L3, y en la Tabla IV.1.2 se recogen los datos de HPLC-DAD-ESI/MS utilizados para la identificación de compuestos. En todos los extractos, los ácidos gálico y elágico seguidos de catequinas y flavonoles representaban las concentraciones más altas de los compuestos fenólicos individuales (Tabla IV.1.1). El extracto L3 fue el único donde se detectaron pigmentos antocianicos, concretamente se identificaron los 3-*O*-glucósidos de delphinidina, cianidina, peonidina y malvidina, carboxipiranomalvidina-3-*O*-glucósido (vitisina A) y cumaroil-carboxipiranomalvidina-3-*O*-glucósido (cumaroil-vitisina A) (Tabla IV.1.3), aunque las concentraciones individuales de estos pigmentos no se pudieron cuantificar debido a sus bajos niveles. Como se esperaba, los cuatro extractos fenólicos de uva (L1-L4) mostraron una composición fenólica característica de materiales derivados de uvas *Vitis vinifera* (Monagas et al., 2006).

Las diferencias cuantitativas en la composición fenólica entre los extractos (Tabla IV.1.1) y el mayor contenido fenólico encontrado en L3, en relación con las otras muestras, deberían explicarse por los diferentes procesos de elaboración de los extractos. El extracto L4 se obtuvo desde el orujo de uva usando agua como disolvente de extracción mientras que para el resto de los extractos se utilizó una mezcla hidroalcohólica, aunque en el caso del L2 el material de partida había sufrido el proceso completo de fermentación. Por otra parte, en los extractos L1 y L2 existía

también una etapa de destilación antes de la preparación de los extractos (Figura III.1). Además, parte de las diferencias en los contenidos fenólicos de los extractos podrían también deberse a diferencias en el proceso de secado por pulverización utilizado en cada caso, que puede hacer que las preparaciones obtenidas contengan concentraciones distintas de los agentes de carga utilizados en el proceso. En todos los extractos se utilizó maltodextrina en el proceso de secado por pulverización, aunque para el L1 y el L2 se usó en combinación con dióxido de silicio. La principal diferencia entre los dos agentes de encapsulación es que el dióxido de silicio es un compuesto insoluble que no se digiere ni se absorbe en el tracto intestinal, mientras que la maltodextrina que deriva del almidón de maíz es fácilmente digerible. Algunos estudios han puesto de manifiesto la importancia de los excipientes de secado para conservar la estabilidad de los polifenoles. Entre los agentes de encapsulación utilizados con mayor frecuencia se encuentra la maltodextrina (Ersus y Yurdagel, 2007), debido a su bajo coste y su efectividad, mientras que la combinación de dióxido de silicio y maltodextrina se ha indicado que podría reducir la degradación de polifenoles (Georgetti et al., 2008).

Tabla IV.1.1. Concentración (mg/g) de los principales compuestos fenólicos individuales en los extractos fenólicos de uva estudiados.

	Extractos			
	L1	L2	L3	L4
Ácidos fenólicos				
Ácido gálico	-	2,86±0,43	12,24±2,61	4,06±0,54
Ácido elágico	5,64±0,65	6,01±1,52	8,57±0,36	4,13±0,19
Flavanoles				
Catequina	0,28±0,07	0,37±0,16	1,72±0,35	0,19±0,01
Epicatequina	1,03±0,25	1,10±0,59	1,57±0,15	1,29±0,27
Procianidinas dímeras			3,35±0,18	
Flavonoles				
Quercetina 3-O-glucurónido	-	0,23±0,00	0,24±0,00	0,23±0,00
Miricetina	0,26±0,01	0,25±0,01	0,37±0,17	0,25±0,00
Quercetina	0,34±0,03	0,30±0,03	0,86±0,01	0,33±0,01
Kaempferol	0,16±0,00	0,16±0,00	0,30±0,02	0,17±0,00

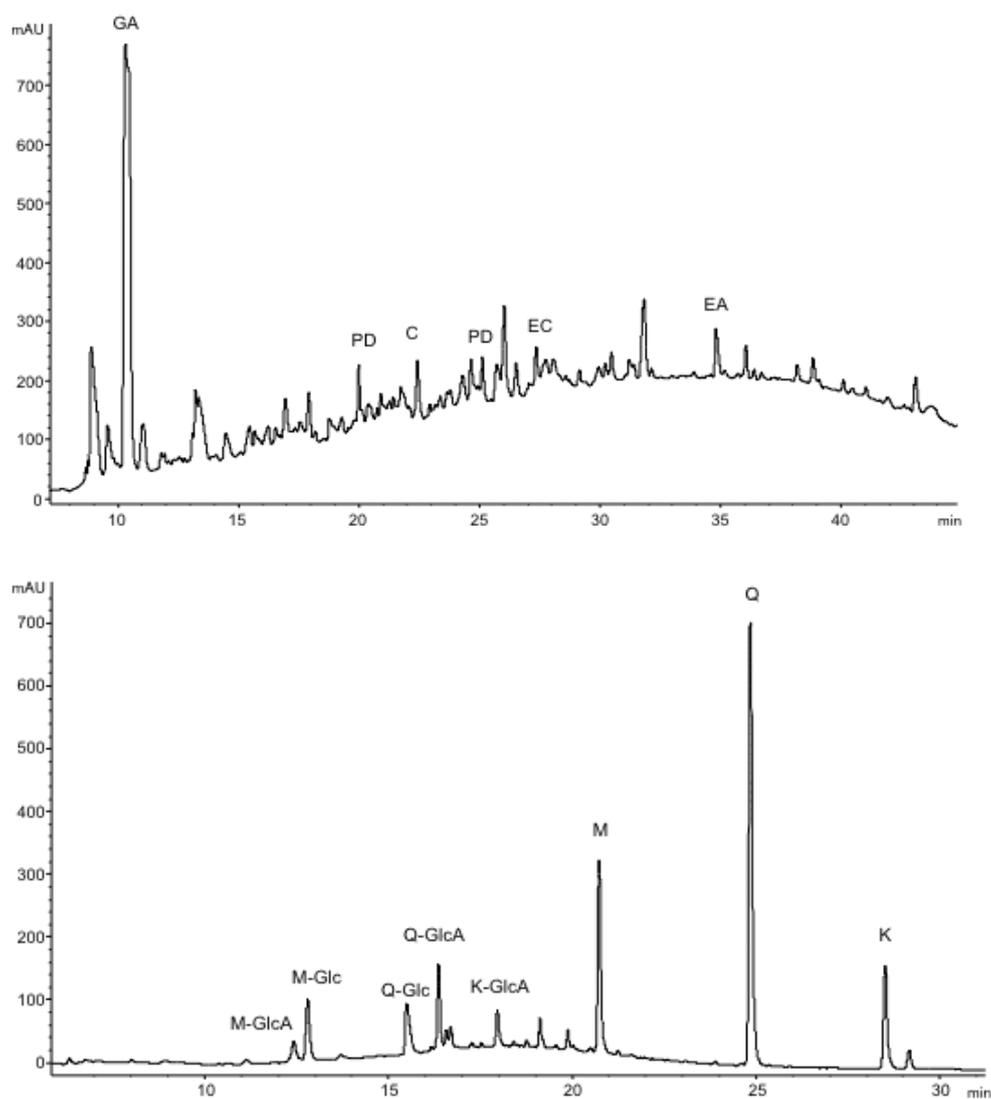


Figura IV.1.1. Cromatogramas de HPLC del extracto L3 registrados a 280 nm (para ácidos fenólicos y flavanoles; parte superior) y 370 nm (para flavonoles; parte inferior). Abreviaturas: GA, ácido gálico; EA, ácido elágico; C, catequina; EC, epicatequina; PD, procianidina dímera; GlcA, 3-*O*-glucurónido; Glc, 3-*O*-glucósido; M, miricetina; Q, quercetina; K, kaempferol.

Tabla IV.1.2. Compuestos fenólicos identificados en los extractos de uva y datos de HPLC-DAD-ESI/MS (tiempo de retención, longitud de onda de absorción máxima, ion pseudomolecular e iones de fragmentos MS²).

Compuesto identificado	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Iones de fragmentos (m/z)
Ácidos fenólicos				
Ácido gálico*	10,7	272	169	125
Ácido elágico*	34,7	294, 358	301	256, 185
Flavonoles				
Miricetina-3-O-glucurónido	12,6	356	493	317
Miricetina-3-O-glucósido	12,9	356	479	317
Quercetina-3-O-glucósido*	16,4	354	463	301
Quercetina-3-O-glucurónido*	16,7	356	477	301
Kaempferol-3-O-glucurónido	18,01	348	461	285
Miricetina*	20,8	372	317	179, 151, 137
Quercetina*	24,8	372	301	179, 151
Kaempferol*	28,5	363	285	151
Flavan-3-oles				
Procianidina dímera 1	20,1	280	577	451, 425, 407, 289, 287
Catequina*	22,1	280	289	245, 203, 137
Procianidina dímera 2	25,3	280	577	451, 425, 407, 289, 287
Epicatequina*	27	280	289	245, 205, 151, 137

* Identificación confirmada por comparación con compuestos estándar.

Tabla IV.1.3. Antocianos detectados en los extractos de uva y datos de HPLC-DAD-ESI/MS (tiempo de retención, longitud de onda de absorción máxima en la región visible, ion molecular e iones de fragmento MS²).

Antocianos	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M] ⁺ (m/z)	Iones de fragmentos (m/z)
Delfinidina-3-O-glucósido*	8,56	524	465	303
Cianidina-3-O-glucósido *	15,5	516	449	287
Peonidina-3-O-glucósido *	19,8	517	463	301
Malvidina-3-O-glucósido *	20,1	527	493	331
Carboxipiranomalvidina-3-O-glucósido (vitisina A)	26,8	510	561	399
Cumaroil-vitisina A	40,8	514	707	399

* Identificación confirmada por comparación con compuestos estándar.

4.1.3 Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos fenólicos de uva

Los compuestos fenólicos totales extraíbles en los extractos estudiados oscilaron entre 26,8 equivalentes de ácido gálico (EAG)/g (L2 y L4) y 71,8 EAG/g (L3), determinados mediante el método Folin-Ciocalteu (Tabla IV.1.4). Al igual que en el estudio de la composición fenólica individual analizada por HPLC el extracto más rico en compuestos fenólicos era el L3.

Tabla IV.1.4. Concentración de polifenoles totales en los diferentes extractos ensayados, determinada con el reactivo de Folin-Ciocalteu y expresada en equivalentes de ácido gálico (EAG).

	Extractos			
	L1	L2	L3	L4
Polifenoles totales (mg EAG/g peso seco)	37,44	26,79	71,80	26,80

La capacidad antioxidante *in vitro* de los cuatro extractos se evaluó mediante los ensayos FRAP y ABTS (Tabla IV.1.5). El ensayo ABTS mide la capacidad que posee un compuesto para captar el radical catión ABTS^{•+} (Re et al., 1999). El ensayo FRAP evalúa la capacidad que poseen los compuestos antioxidantes de reducir Fe³⁺ a Fe²⁺, por lo tanto, determina su capacidad reductora (Benzie y Strain, 1996).

Tabla IV.1.5. Capacidad antioxidante en los extractos fenólicos estudiados. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Los valores de capacidad antioxidante dentro de una columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$). Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresan como valores TEAC, definidos en este caso como μmol de equivalentes de Trolox (ET) por g de muestra.

	ABTS	FRAP
	($\mu\text{mol ET/g}$ de extracto seco)	($\mu\text{mol ET/g}$ de extracto seco)
L1	420 \pm 10 ^b	220 \pm 20 ^b
L2	400 \pm 20 ^b	170 \pm 020 ^b
L3	840 \pm 20 ^a	530 \pm 60 ^a
L4	300 \pm 50 ^b	110 \pm 10 ^b

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos con el ensayo FRAP en los distintos extractos estuvieron comprendidos entre 110 a 530 $\mu\text{mol ET/g}$. El extracto L3 presentaba la mayor capacidad reductora seguido por los extractos L1, L2 y L4. La capacidad de captación del radical de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ osciló entre 300 y 840 $\mu\text{mol ET/g}$, siguiendo el mismo orden de actividad entre las muestras que para los polifenoles totales (L3 > L1 > L2 > L4). En todos los extractos, se encontraron valores TEAC más altos en el ensayo ABTS, que se lleva a cabo a pH 7,4, que en el ensayo FRAP, que tiene lugar a un pH de 3,6. Estos resultados estarían de acuerdo con las observaciones de Muzolf et al. (2008), que indican que la actividad captadora de radicales de los polifenoles aumenta con el pH del medio, debido a un aumento en la capacidad de donación de electrones tras desprotonación. La capacidad antioxidante de los extractos se podría explicar por su composición fenólica. De hecho, se observó una buena correlación entre el contenido fenólico total determinado con el reactivo de Folin-Ciocalteu y los valores de la capacidad antioxidante de los extractos estudiados ($r = 0,98 \pm 0,02$). Dicha correlación parece lógica, ya que el método de Folin-Ciocalteu es en realidad una medida del poder reductor de una muestra más que una determinación específica de polifenoles. Sin embargo, las diferencias entre los resultados de los cuatro extractos no deberían solo atribuirse a su contenido total de polifenoles sino también a su composición fenólica cualitativa, ya que la capacidad de captación de radicales libres y de quelación de metales están influidos por el número de grupos -OH y su posición en los anillos aromáticos (Hogan et al., 2009).

Otros estudios con extractos obtenidos a partir de subproductos de vinificación también encontraron resultados relevantes de capacidad antioxidante (González-Paramás et al., 2004; Rockenbach et al., 2011). Sin embargo, la comparación con los datos de otros autores es difícil debido a los diferentes métodos analíticos, estándares utilizados, modos de expresión (unidades, base de materia seca o húmeda), variedad de uva y metodología de extracción empleados en cada caso. A pesar de estas dificultades, los resultados de la capacidad antioxidante obtenidos en este trabajo serían del mismo orden de magnitud o ligeramente más altos que algunos de los publicados previamente en la literatura. Por ejemplo, en un estudio de la actividad antioxidante de orujo de uvas tintas de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot,

Bordeaux e Isabel, realizado por Rockenbach et al. (2011), se obtuvieron valores TEAC medios que oscilaron entre 193 y 485 $\mu\text{mol ET/g}$ utilizando el método ABTS y 117-249 $\mu\text{mol ET/g}$ mediante el método FRAP.

4.1.4 Efectos de los extractos fenólicos de uva en la resistencia de *C. elegans* al estrés

Tras la obtención de los resultados de capacidad antioxidante *in vitro* se quiso comprobar los efectos de los extractos en un organismo *in vivo*, para lo que se empleó *C. elegans* como organismo modelo. Para ello se evaluó si el tratamiento con los extractos fenólicos de uva influía en la resistencia del nematodo frente al estrés oxidativo inducido térmicamente. El estrés térmico (35 °C, 8 h) se aplicó los días 5 y 12 de adulto tras cultivar los gusanos hasta ese momento en ausencia (controles) y presencia de diferentes concentraciones (desde 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) de los extractos.

Como se muestra en la Figura IV.1.2, tras el estrés térmico, se observó en general un aumento en la tasa de supervivencia en los gusanos tratados en comparación con los gusanos control, aunque la concentración que producía el máximo aumento en la supervivencia variaba dependiendo del extracto.

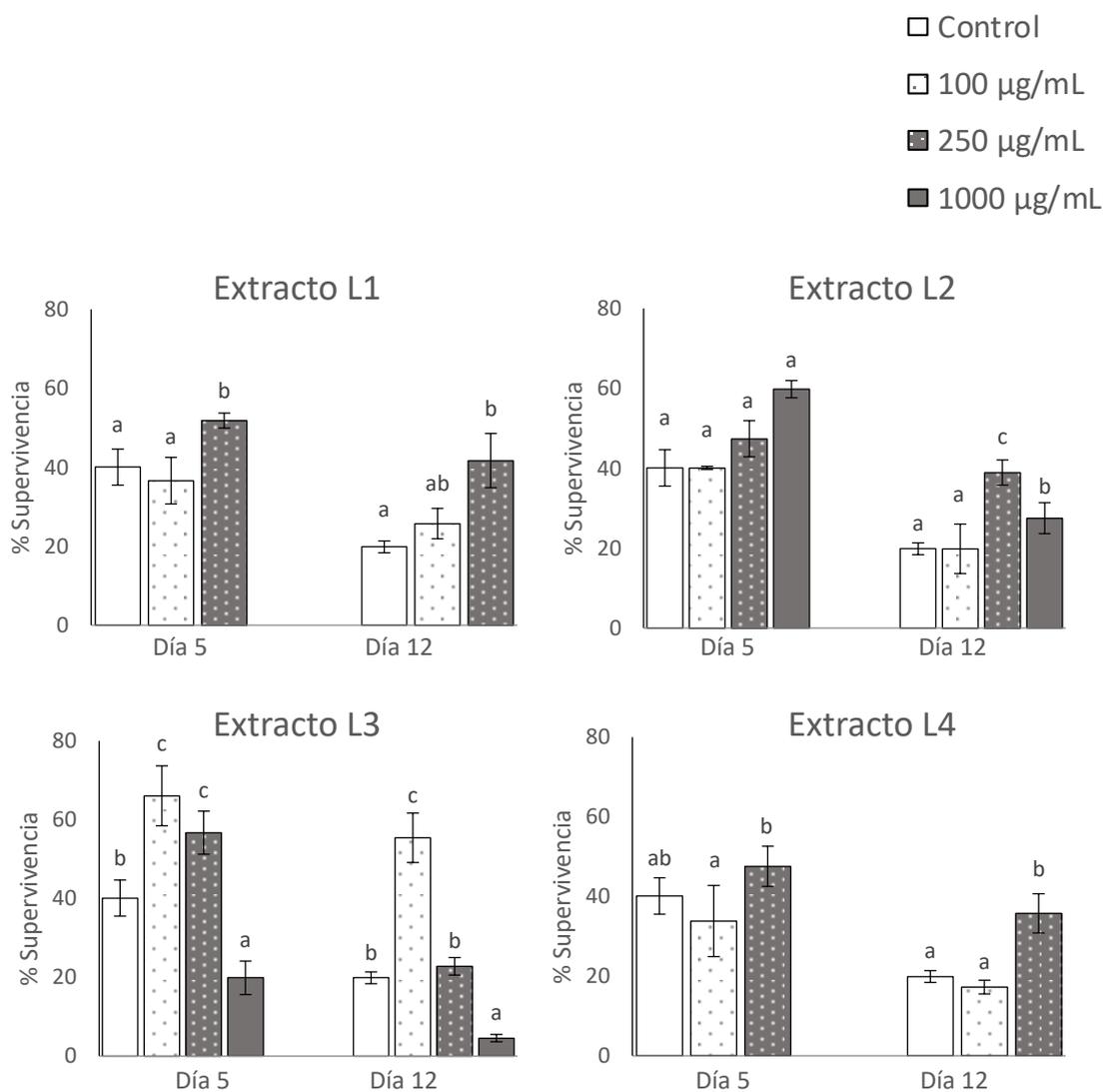


Figura IV.1.2. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 8 h) los días 5 y 12 de adulto tras ser tratados con diferentes concentraciones de los extractos L1, L2, L3 y L4 frente a gusanos sin tratamiento. En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. Las letras indican diferencias significativas entre los diferentes grupos ($p < 0.05$) mediante la Prueba Chi Cuadrado.

Con el extracto L3, la tasa de supervivencia aumentaba significativamente ($p < 0.05$) en gusanos estresados térmicamente que habían sido tratados con 100 µg/mL y 250 µg/mL de extracto, pero disminuyó con la concentración de 1000 µg/mL, en relación con los gusanos no tratados. Sin embargo, las concentraciones más bajas de los extractos L1, L2 y L4 (100 µg/mL) no aumentaban la supervivencia, aunque sí a la concentración de 250 µg/mL, si bien en el caso de L2 y L4 el aumento en la tasa de supervivencia solo era significativo en los gusanos sometidos a estrés térmico a día 12 de adulto. Estos resultados podrían explicarse por la diferente concentración de

compuestos fenólicos existente en los distintos extractos, ya que los distintos extractos tienen contenidos diferentes de polifenoles, por lo que una misma concentración de extracto supone una cantidad diferente de compuestos fenólicos en las placas de cultivo, como se puede comprobar en la Tabla IV.1.6. De este modo, parece que la protección frente al estrés oxidativo se produciría hasta una cierta cantidad de polifenoles en el medio de cultivo que, en el caso de los extractos estudiados, se situaba en torno a 7-9 μg de EAG por placa, niveles a los que se observaba la máxima tasa de supervivencia. Sin embargo, niveles más elevados conducirían a efectos perjudiciales.

Tabla IV.1.6. Cantidades de compuestos fenólicos incorporadas a las placas de cultivo con las diferentes concentraciones de cada extracto, calculadas teniendo en cuenta las concentraciones de polifenoles totales en los mismos determinadas con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Concentración de extracto en la placa	Cantidad de polifenoles por placa			
	L1	L2	L3	L4
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3,74 μg EAG	2,68 μg EAG	7,13 μg EAG	2,68 μg EAG
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9,36 μg EAG	6,70 μg EAG	17,83 μg EAG	6,70 μg EAG
1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	26,79 μg EAG	71,30 μg EAG	-

Resultados similares se encontraron en un estudio llevado a cabo con extractos de orujo de uva *Zalema*, donde también se observaba que la resistencia de *C. elegans* frente al estrés térmico mejoraba cuando los nematodos crecían en presencia de las concentraciones más bajas del extracto analizado en ese caso 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que concentraciones más altas (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) producían una disminución de la supervivencia del gusano (Jara-Palacios et al., 2013), aunque en ese trabajo no se hacía referencia a la cantidad de polifenoles correspondiente a las distintas concentraciones de extracto evaluadas. Otros autores realizaron observaciones similares con extractos ricos en polifenoles obtenidos de diferentes fuentes, como té (Xiong et al., 2014), cacao (Martorell et al., 2011), flavonoides aislados (Surco-Laos et al., 2012; Pietsch et al., 2011; Dueñas et al., 2013) y ácido elágico y ácido tánico (Saul et al., 2011). Estos resultados parecen indicar una respuesta hormética a la concentración de polifenoles,

es decir la existencia de efectos opuestos inducidos por dosis bajas y altas de un mismo agente químico, biológico o físico en un organismo. En este sentido, se ha propuesto que los polifenoles a bajas concentraciones en un sistema biológico podrían comportarse como agentes estresantes ligeros, de modo que, al producir cierto grado de estrés oxidativo, activarían las defensas antioxidantes endógenas conduciendo a una mayor citoprotección (Halliwell, 2008; Tang y Halliwell, 2010). Se sabe que algunas de estas sustancias pueden dar lugar en su proceso metabólico a la formación de quinonas con capacidad pro-oxidante. Como resultado, estos limitados niveles basales de pro-oxidantes generados en la oxidación y metabolismo de los compuestos fenólicos, como los que se alcanzarían con ingestas dietéticas normales, podrían ser beneficiosos al organismo (Halliwell, 2008). Por el contrario, la exposición a concentraciones elevadas de polifenoles provocaría daño al superar la capacidad antioxidante del sistema. En todo caso, para evaluar adecuadamente los efectos observados por el tratamiento con polifenoles, es necesario tener en cuenta no solo la concentración fenólica total, sino también el tipo de compuestos presentes en cada caso. El ácido gálico y el ácido elágico son los compuestos mayoritarios en los extractos (Tabla IV.1.1), aunque con diferente distribución en cada caso (Figura IV.1.3). La influencia de ambos ácidos sobre la resistencia al estrés térmico y oxidativo en *C. elegans* fue previamente estudiada por Saul et al. (2011), quienes encontraron que el ácido elágico no era capaz de mejorar la protección frente al estrés térmico con ninguna de las concentraciones evaluadas, mientras que provocaba efectos adversos a niveles elevados (300 μ M). Sin embargo, el ácido gálico mejoraba la resistencia al estrés térmico tanto a bajas concentraciones (de 100 a 300 μ M, aunque no significativamente) como a altas dentro de las ensayadas. Concretamente los gusanos tratados con 400-800 μ M de ácido gálico mostraban un porcentaje de supervivencia de un 160 % comparado con el 100 % de supervivencia de los gusanos control. Teniendo en cuenta esas observaciones, se puede especular que las diferentes cantidades de estos ácidos en las placas de cultivo, determinadas por la concentración fenólica y la distribución del compuesto en cada extracto, podrían también contribuir a explicar el diferente comportamiento observado en los distintos ensayos de este trabajo.

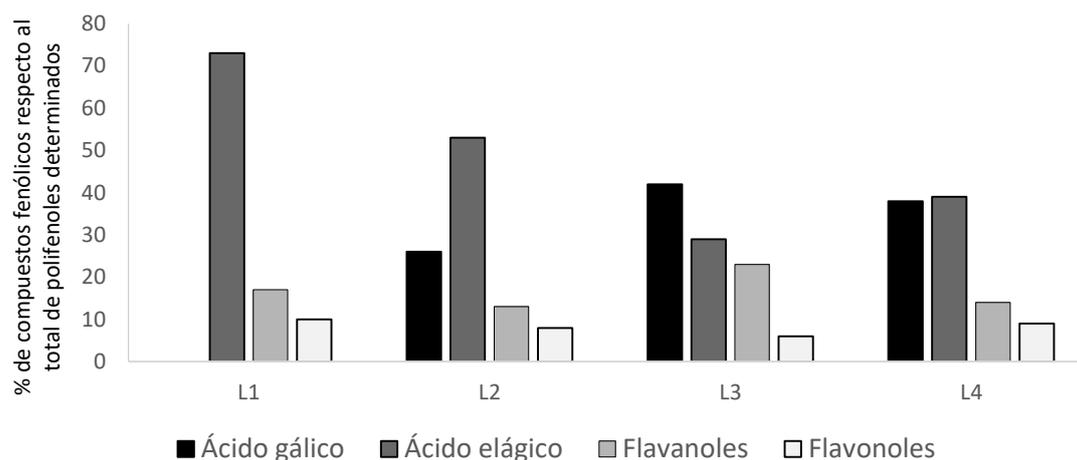


Figura IV.1.3. Porcentajes de distribución de los principales compuestos fenólicos determinados en los extractos fenólicos de uva estudiados.

Otros compuestos presentes en los extractos que también se han relacionado con efectos saludables son los flavan-3-oles (Lewandowska et al., 2013; Davison y Howe, 2015; Okamoto et al., 2016). En las muestras estudiadas, este grupo representaba aproximadamente un 13-22 % de los polifenoles determinados dependiendo del extracto (Figura IV.1.3). Mientras que catequina y epicatequina estaban presentes en todos los extractos, solo se encontraron procianidinas dímeras en L3 (Tabla IV.1.1). Existen varios estudios donde se ha evaluado la influencia de flavan-3-oles en la resistencia al estrés en *C. elegans*, ya sea como compuestos puros o como componentes principales de extractos obtenidos de cacao o té verde. Así, se encontró que las catequinas eran capaces de producir un aumento en la resistencia del gusano frente a estrés térmico y oxidativo (Saul et al., 2009 y 2011; Surco-Laos et al., 2012). Igualmente, gusanos tratados con extractos de té verde mostraban un aumento en la tasa de supervivencia tras estrés oxidativo inducido químicamente con juglona (Abbas y Wink, 2014), y el tratamiento con extractos de cacao conducía a una mayor protección de *C. elegans* frente a estrés oxidativo (Martorell et al., 2011).

Los flavonoles eran menos abundantes en las muestras estudiadas, representando alrededor del 8 % del total de polifenoles (Figura IV.1.3). También existen diferentes trabajos publicados con varios compuestos pertenecientes a este grupo, y particularmente quercetina, flavonol mayoritario en las muestras estudiadas, que se vio que es capaz de inducir un aumento en la tasa de supervivencia de *C.*

elegans sometido a estrés térmico y oxidativo (Pietsch et al., 2011; Surco-Laos et al., 2011).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, cabe considerar que los efectos observados en el presente estudio deben interpretarse no solo en función de los niveles de polifenoles totales a los que son expuestos los gusanos, sino también por la cantidad y distribución de los diferentes compuestos fenólicos presentes en los extractos, así como las posibles sinergias entre ellos. Por otro lado, si comparamos los efectos protectores de los extractos evaluados en los dos días de desarrollo estudiados, es destacable que dichos efectos parecen ser más acusados en los gusanos de edad más avanzada (12 días de adulto) que en los adultos más jóvenes (día 5). Así, por ejemplo, el aumento en la tasa de supervivencia respecto a los individuos control que produjo el extracto L2 con la concentración de 250 µg/mL pasó de un 7 %, cuando el estrés se aplicaba el día 5 de adulto, a un 19 %, cuando el estrés se aplicaba a día 12. Igualmente, el extracto L3 a una concentración de 100 µg/mL indujo un aumento en la tasa de supervivencia del 26 % el día 5 y del 36 % el día 12. Observaciones similares fueron realizadas anteriormente por nuestro grupo en ensayos con catequinas aisladas, donde también se encontraba un aumento de la resistencia frente a estrés oxidativo inducido térmicamente y con juglona más acentuado en gusanos de edad más avanzada (Surco-Laos et al., 2012).

4.1.5 Efectos de los extractos fenólicos de uva en longevidad de *C. elegans*

Los estudios de longevidad se llevaron a cabo solamente con los extractos L2 y L3, ya que presentaban respectivamente la concentración más baja y más alta de polifenoles totales calculados según el índice de Folin-Ciocalteu. Concretamente, los ensayos se realizaron a una concentración de 100 µg/mL con el extracto L3 (7,13 µg EAG/placa) y de 250 µg/mL para L2 (6,70 µg EAG/placa) en el medio de cultivo, ya que esas cantidades de polifenoles eran las que mostraban mayor efecto protector con relación a estrés térmico, como se ha discutido anteriormente.

La Figura IV.1.4 muestra las curvas de supervivencia de los gusanos cultivados a 20 °C en presencia de los extractos L2 y L3 y de los gusanos control (sin tratamiento). En la Tabla IV.1.7 se recogen los datos de la vida media calculados según el análisis

estadístico de Kaplan-Meier, así como el valor de vida máxima calculada como el promedio de duración de vida del 10 % de la población más longeva. Como se puede comprobar, el tratamiento con el extracto L2 aumentó significativamente ($p < 0,01$) la vida media y máxima de los gusanos (15,6 días y 19,5 días respectivamente) respecto a los individuos control (14,3 días y 17,7 días). Sin embargo, en el tratamiento con L3 solo se observaba un aumento significativo ($p < 0,05$) en la duración máxima de vida (19,1 días), pero no en la vida media de los gusanos (14,2 días), a pesar de ser el extracto que más influencia había mostrado en los estudios previos de resistencia al estrés inducido térmicamente. Estos resultados parecen sugerir que el extracto L2 tiene mayor efecto en los gusanos cultivados en condiciones normales, mientras que el L3 sería más efectivo en condiciones de estrés, lo cual esté posiblemente relacionado con la composición fenólica de cada uno de ellos.

Tabla IV.1.7. Influencia de los extractos L3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y L2 (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la duración de vida de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento a 20 °C. Resultados expresados como media \pm desviación estándar ($n=3$).

Tratamiento	Vida media (días)	p vs Control (log-rank)	Vida máxima 10 % (días)*	p vs Control Anova
Control	14,3 \pm 0,30		17,7 \pm 1,26	
L3 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	14,2 \pm 0,35	0,96	19,1 \pm 1,52	0,047
L2 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 \pm 0,18	0,00	19,5 \pm 1,41	0,007

* Duración máxima de vida calculada como la media de la duración de vida del 10 % de individuos más longevos de cada población

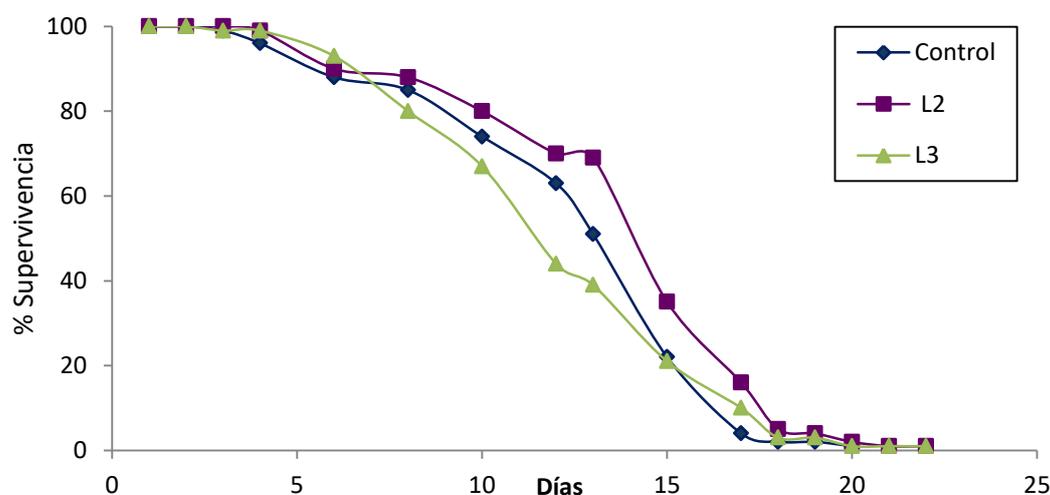


Figura IV.1.4. Curvas de supervivencia de *C. elegans* cultivados en presencia y ausencia (control) de los extractos L2 (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y L3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

No se ha encontrado información en la literatura sobre la influencia de extractos de polifenoles de uva en la longevidad de *C. elegans*. Como se indicó anteriormente, Saul et al. (2011) estudiaron los efectos en la resistencia a estrés, longevidad y capacidad antioxidante en *C. elegans* de diferentes compuestos fenólicos individuales (ácido tánico, ácido gálico, ácido elágico y catequina), algunos de los cuales estaban presentes en nuestros extractos. Ese estudio mostraba que, a pesar de que todos esos compuestos podían prolongar la vida media de los nematodos, el modo de acción de cada uno era diferente. Así, el ácido tánico y el ácido elágico aumentaban significativamente la vida media a dosis bajas, pero actuaban de manera hormética, mostrando efectos perjudiciales cuando los ensayos eran llevados a cabo con las concentraciones más altas del rango evaluado (50 a 400 μM en el medio de cultivo). Sin embargo, el ácido gálico y la catequina conducían a un aumento en la longevidad en un amplio intervalo de concentraciones (100 a 800 μM), sin que se observaran efectos tóxicos a ninguna concentración. Era destacable que el compuesto que más aumentaba la longevidad fuera el ácido tánico, uno de los que ejercía una respuesta hormética en la supervivencia del gusano bajo condiciones de estrés. Por otra parte, en su estudio Saul et al. (2011) no observaron correlación entre la capacidad antioxidante (mejora de la resistencia a estrés térmico y oxidativo) de los compuestos evaluados y el aumento de longevidad.

Los extractos L2 y L3 de nuestro estudio presentaban ácidos fenólicos como compuestos mayoritarios, representando respectivamente el 78 % y el 71 % de todos los compuestos determinados, seguidos de flavan-3-oles (13 % y 23 %) y flavonoles (8 % y 6 %) (Tabla IV.1.1 y Figura IV.1.3). Sin embargo, mientras que el ácido elágico era mayoritario en L2 (53 % del total de polifenoles analizados), el ácido gálico lo era en el extracto L3 (42 % del total de polifenoles). De este modo, de acuerdo a las observaciones de Saul et al. (2011), los efectos beneficiosos sobre la longevidad de *C. elegans* observados con el extracto L2 (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) podrían estar relacionados con su riqueza en ácidos fenólicos, especialmente del ácido elágico, mientras que la mayor resistencia frente el estrés térmico inducido por L3 podría deberse a su mayor contenido de ácido gálico y flavan-3-oles (catequinas y procianidinas).

Los estudios con catequinas han aportado diferentes resultados sobre la influencia de estos compuestos en la longevidad de *C. elegans*. Mientras que algunos autores (Saul et al., 2009; Bartholome et al., 2010; Saul et al., 2011) encuentran un aumento en la vida media de los gusanos tratados con catequina o epicatequina (concentraciones en el intervalo de 100 a 800 μM en el medio de cultivo según el estudio), otros no observan efectos significativos sobre longevidad en el gusano (Sunagawa et al., 2011; Surco-Laos et al., 2012). En todo caso, a pesar de no haber influencia en la vida media en los gusanos tratados con epicatequina (200 μM), Surco-Laos et al. (2012) sí encontraron un aumento en la duración máxima de vida determinada como la media de vida del 10 % de la población más longeva, lo que está en consonancia con los resultados obtenidos para el extracto L3. Respecto a los flavonoles, grupo minoritario de compuestos fenólicos en nuestras muestras, diversos estudios recogidos en la bibliografía coinciden en señalar que el tratamiento con quercetina, isoramnetina, miricetina o kaempferol conduce a un aumento en la vida media de los nematodos (Pietsch et al., 2011; Surco-Laos et al., 2011; Grünz et al., 2012). Además, en el caso de quercetina se ha descrito una respuesta hormética (Dueñas et al., 2013), lo que también podría respaldar, al menos en parte, las observaciones realizadas en este trabajo.

4.1.6 Comentarios finales

Los extractos secos de polifenoles de uva empleados en este trabajo fueron obtenidos a partir de subproductos de vinificación por una combinación de procesos de extracción y secado con vistas a mejorar sus características de solubilización y estabilidad. Todos los extractos se caracterizaron por contener compuestos fenólicos pertenecientes a los grupos de ácidos fenólicos, flavan-3-oles y flavonoles, aunque con diferente distribución y contenido de polifenoles totales en cada caso.

Todos los extractos ensayados mostraron capacidad para aumentar la resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente en *C. elegans*, aunque de manera diferente en función de su contenido fenólico, detectándose una respuesta de tipo hormético, ya que bajas concentraciones relativas producían efectos beneficiosos mientras que niveles más altos resultaban perjudiciales. Los mayores efectos

protectores se observaron para concentraciones de extractos en los medios de cultivo que aportaban entre 7 y 9 μg de polifenoles totales (expresados como equivalentes de ácido gálico). Otro aspecto interesante observado era que los extractos producían una mejora en la resistencia a estrés más acentuada en gusanos de mayor edad (día 12) que en adultos jóvenes (día 5). Por otro lado, la mejora inducida en la resistencia al estrés no parecía estar estrictamente relacionada con la capacidad de los extractos para aumentar la vida media del gusano, ya que ésta no aumentaba por el tratamiento con el extracto más activo (L3) en estrés térmico, aunque éste sí fue capaz de aumentar la duración máxima de vida, lo que también podría sugerir una mayor protección en individuos de mayor edad.

Los efectos observados en los estudios realizados no deben interpretarse solamente como derivados de las concentraciones fenólicas ensayadas, sino también en función de la composición de los extractos, ya que existen diferencias en la distribución de los distintos compuestos fenólicos presentes en cada caso.

4.2 Estudios con epicatequina

4.2.1 Introducción

Los flavan-3-oles, como epicatequina y catequina y sus oligómeros las procianidas, son un grupo de flavonoides que representa una clase principal de metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos están comúnmente presentes en la mayoría de las plantas superiores, y su alto contenido en algunas plantas ampliamente consumidas, como *Vitis vinifera* (uvas y vino de uva), *Camellia sinensis* (té), *Theobroma cacao* (cacao) y en la mayor parte de los vegetales, hacen que sean muy abundantes en la dieta humana.

El consumo de estos compuestos se ha relacionado con una reducción en la incidencia de algunas enfermedades crónicas como las cardiovasculares, diabetes, algunos tipos de cáncer, y enfermedades neurodegenerativas (Scalbert et al., 2005; Schroeter et al., 2006). Sin embargo, la contribución real de estos compuestos en el mantenimiento de la salud y los mecanismos a través de los cuales los distintos flavonoides ejercen su actividad biológica siguen sin esclarecerse.

Clásicamente, sus efectos biológicos se han explicado por sus propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres, conclusiones obtenidas en su mayoría a través de ensayos *in vitro*. Sin embargo, actualmente no está claro si otros mecanismos de acción contribuyen y si éstos son aún más importantes que su capacidad de eliminación directa de radicales libres (Koch et al., 2014). Entre los mecanismos de acción propuestos, se ha visto que los flavan-3-oles pueden afectar a diferentes rutas de señalización celular, modular las características de la membrana celular y las funciones de los receptores, alterar el entorno celular redox, influir en la expresión génica, en la actividad proteica y en el metabolismo (Middleton et al., 2000; Schroeter et al., 2006).

El envejecimiento es un proceso degenerativo que está recibiendo una mayor atención en los últimos años. Las últimas teorías sugieren que se trata de un proceso multicausal que a menudo se asocia con un aumento del estrés oxidativo que conduce a daño celular, así como a mutaciones genéticas debido a factores ambientales, genéticos y de desarrollo (Kenyon, 2005 y 2010; Lapointe y Hekimi, 2010).

El estrés oxidativo se ha descrito como un desequilibrio entre la producción de cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su capacidad de eliminación por los sistemas antioxidantes de protección endógena, lo que lleva a una acumulación de daño oxidativo en una variedad de biomoléculas, como enzimas, proteínas, ADN y lípidos (Ames et al., 1993). Por otro lado, se ha descubierto que fisiológicamente las ROS son necesarias para la transducción de señales, la regulación genética y la regulación redox, lo que implica que su eliminación completa sería perjudicial (Sohal y Orr, 2012).

Como se ha indicado en la introducción, *C. elegans* es un modelo excelente para estudiar los mecanismos del envejecimiento debido a su corta vida media, su tiempo de generación rápido, la existencia de una amplia variedad de herramientas genéticas y moleculares y porque sus rutas genéticas están bien definidas (Guarente y Kenyon, 2000; Tissenbaum, 2015). Las rutas celulares y moleculares de *C. elegans* están ampliamente conservadas en relación con los mamíferos, incluidos los humanos. La comparación del genoma entre humanos y *C. elegans* confirmó que muchos de los genes humanos y las vías que participan en el desarrollo de enfermedades están presentes en el gusano (Silverman et al., 2009). El empleo de *C. elegans* en este trabajo permite estudiar los efectos de los flavonoides en un organismo multicelular considerando la complejidad de los mecanismos de acción que tienen lugar en un organismo vivo. Por lo tanto, como ya otros autores han apuntado (Koch et al., 2014), el uso de *C. elegans* ofrece posibilidades prometedoras para estudiar la influencia de compuestos secundarios de plantas, como los flavonoides, en el proceso de envejecimiento y la salud humana.

Con el fin de tratar de elucidar los mecanismos de acción a través de los cuales los flavonoides ejercen sus efectos, en esta parte de la tesis nos hemos centrado en el estudio de la influencia de la epicatequina (EC), principal flavan-3-ol monómero de la dieta, en la ruta de señalización de la insulina/IGF-I, ya que es una ruta altamente conservada que regula el envejecimiento, el metabolismo y la resistencia al estrés. Además, los componentes de esta ruta son candidatos que podrían proporcionar un importante punto de partida para entender las causas del envejecimiento a nivel molecular (Kenyon, 2005; Schuster et al., 2010). Asimismo, estudios previos han

demostrado que diferentes compuestos fenólicos como acacetina (Asthana et al., 2016), quercetina (Pietsch et al., 2009), epigallocatequina-3-*O*-galato (EGCG) (Zhang et al., 2009), o miricetina (Büchter et al., 2013) parecen influir en esta ruta.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, el objetivo de este capítulo ha sido por un lado evaluar el estatus oxidativo en *C. elegans* a través del estudio de diferentes biomarcadores (producción de ROS, lípidos peroxidados y proteínas carboniladas) que podrían ser modificados tras el tratamiento con EC y, por otro lado, estudiar la influencia de la ruta de la insulina (IIS) en la resistencia frente al estrés oxidativo tras el tratamiento con EC a través de un análisis genético empleando los mutantes principales de dicha ruta (*daf-2*, *age-1*, *daf-16*, *akt-1*, *akt-2;sgk-1*, *hsf-1*, *skn-1* y *daf-18*). Además, se ha estudiado la expresión de algunos genes relacionados con resistencia al estrés y longevidad, como *daf-16*, *skn-1*, *hsf-1*, *hsp-16.2*, *hsp-70*, *sod-3* y *gst-4* mediante RT-qPCR y/o por cuantificación de la intensidad de fluorescencia de GFP en condiciones normales y condiciones de estrés.

4.2.2 Efectos biológicos de epicatequina

4.2.2.1 Estrés térmico

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 diferentes catequinas (catequina, epicatequina, 3'-*O*-metilepicatequina y 4'-*O*-metilepicatequina) a una concentración de 200 μ M, mejoraba la tolerancia al estrés térmico (35 °C, 8 h) y al estrés químicamente inducido mediante juglona, en etapas tempranas del desarrollo (primer y sexto día de adulto), con efectos protectores relativamente mayores en los gusanos de más edad (sexto día) que en los jóvenes. En el caso del tratamiento con EC (200 μ M), el primer día de adulto, el aumento observado en el porcentaje de supervivencia pasó de un 78,6 % en gusanos control a un 97,6 % en los que habían sido cultivados en presencia de EC, siendo el tratamiento con EC el que ejercía un mayor efecto protector de todas las catequinas estudiadas. En el 6º día de adulto, la EC produjo un incremento de la supervivencia desde un 56,2 % en los gusanos no tratados a un 89,2 % en los gusanos tratados. Sin embargo, a día 6 el mayor efecto protector era observado con los derivados metilados de epicatequina, con porcentajes de supervivencia de un 99 %.

Resultados similares fueron obtenidos por Saul et al. (2009) en estudios realizados en gusanos tratados con catequina 200 μM y sometidos a estrés térmico en el 6^o día de adulto, encontrando que el tratamiento con este flavanol mejoraba la tolerancia de *C. elegans* al estrés.

En el presente trabajo se planteó completar el estudio de termotolerancia realizado por Surco-Laos et al. (2012) aplicando el estrés térmico (8 h, 35 °C) en etapas más avanzadas de la vida del gusano (días 10 y 17 de adulto), con el objeto de establecer si un mayor tiempo de exposición a EC (200 μM) mejoraba la resistencia de los gusanos al estrés y si el efecto era mayor al tratarse de gusanos de mayor edad cuyas defensas naturales previsiblemente estarán más afectadas.

Al igual que en los estudios anteriores, se encontró que el tratamiento con EC aumentaba significativamente la supervivencia de los nematodos sometidos a estrés térmico con respecto a los controles no tratados con EC. Como puede observarse en la Figura IV.2.1, en los ensayos en los que el estrés se aplicaba el día 10 de adulto los porcentajes de supervivencia aumentaban significativamente, pasando de un 30 % de supervivencia en los gusanos control al 48 % en los que habían sido cultivados en presencia de EC (Figura IV.2.1A). De la misma manera, cuando el estrés era aplicado a día 17 de adulto, el tratamiento con EC aumentaba las tasas de supervivencia desde un porcentaje de 40 % en gusanos control a un 55 % en gusanos tratados con EC (Figura IV.2.1B). En ambos casos los datos eran el resultado de 3 ensayos independientes realizados con una población de 100 gusanos por tratamiento.

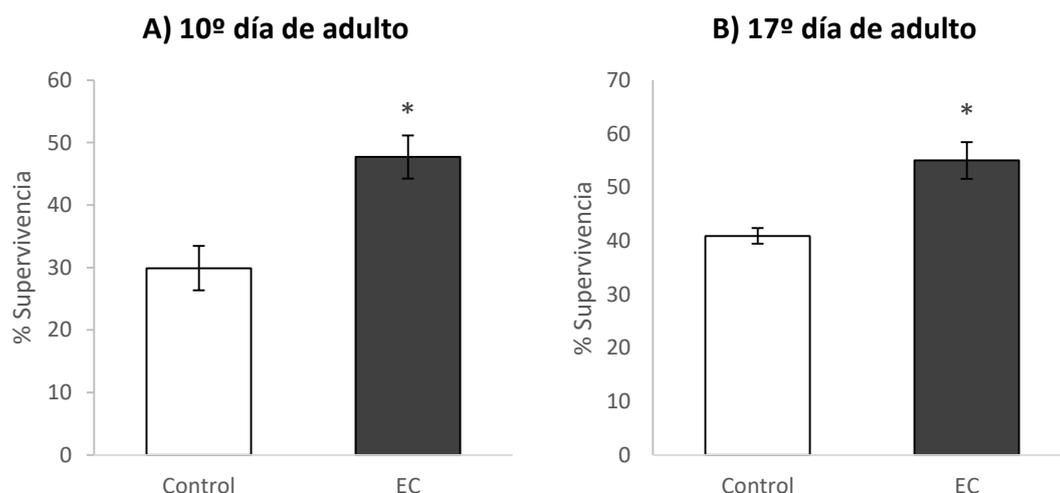


Figura IV.2.1. Porcentaje de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 8 h) los días 10 y 17 de adulto tras ser tratados con EC frente a gusanos sin tratamiento (control). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SD. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos con relación al aumento en las tasas de supervivencia no parecen apuntar que los efectos protectores de EC sean mayores en gusanos de más edad que en adultos jóvenes, comparando con los resultados obtenidos en el estudio anterior (Surco-Laos et al., 2012). Sin embargo, un aspecto a tener en cuenta en los ensayos ahora realizados es que en etapas más avanzadas (días 10 y 17 de adulto) la población de gusanos ya se encuentra seleccionada por efecto de la edad, estando formada posiblemente por los individuos con fenotipo más resistente, una circunstancia que conferiría especial relevancia a los significativos aumentos encontrados en el porcentaje de supervivencia inducida por EC.

En el mencionado estudio de nuestro grupo de investigación (Surco-Laos et al., 2012) también fue estudiado el efecto de las catequinas sobre longevidad. Los resultados mostraron que, aunque EC (200 μ M) no producía un aumento de la vida media de los gusanos, sí producía un aumento significativo de la vida máxima, determinada como la vida media del 10 % de la población más longeva de cada población (Figura IV.2.2). En esos ensayos, al evaluar la trayectoria de todos los gusanos ($n \approx 210$) a lo largo de la vida hasta la muerte de toda la población, se observaba que aproximadamente a partir del día 13 la supervivencia era siempre superior en los gusanos tratados con EC respecto al control. Esto podría sugerir que la

exposición continuada al flavonoide podría conferir una mejor adaptación de su organismo, favoreciendo una mayor duración de vida, como se pone de manifiesto al evaluar la vida máxima de la población estudiada.

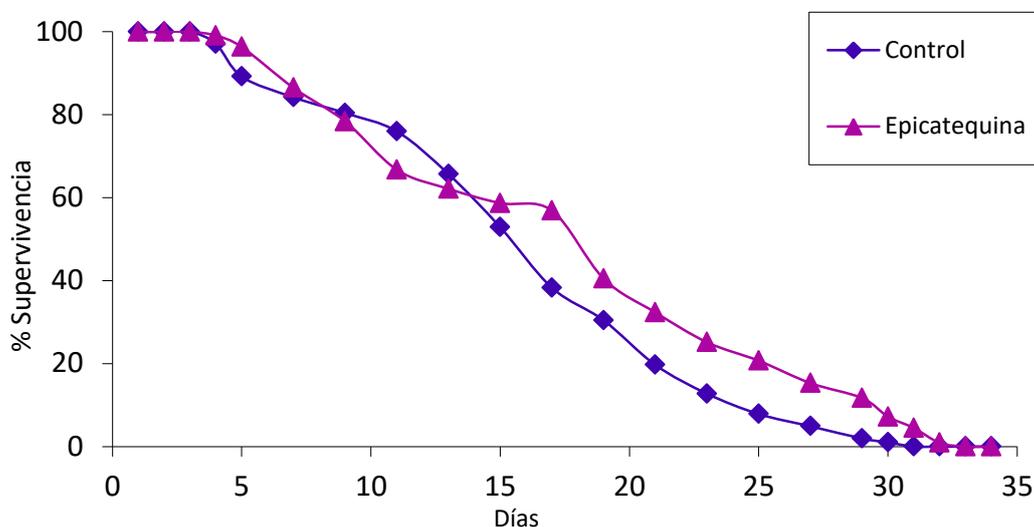


Figura IV.2.2. Curva de supervivencia de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* tratados EC. Adaptado de Surco-Laos et al. (2012).

Resultados similares fueron descritos por Zhang et al. (2009) con relación al efecto de epigallocatequina-3-*O*-galato (EGCG), principal catequina del té, sobre *C. elegans*, ya que este compuesto aumentaba significativamente la supervivencia del gusano bajo condiciones de estrés térmico u oxidativo, pero no extendía su vida media bajo condiciones de cultivo normales.

4.2.2.2 Niveles intracelulares de ROS

Los organismos aerobios producen radicales libres endógenos debido al metabolismo del oxígeno molecular. Dentro de ellos, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son pequeñas moléculas que presentan uno o más electrones desapareados en su orbital más externo y contienen al menos un átomo de oxígeno, lo que las hace altamente reactivas. En los sistemas biológicos la mayoría de las ROS celulares se forman como un subproducto en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, como por ejemplo la formación del anión superóxido por la cesión de electrones al oxígeno molecular. Pero también son formados por algunas enzimas, como por ejemplo el superóxido liberado por oxidasas como la xantina oxidasa o

NADPH oxidasa (Van Raamsdonk y Hekimi, 2010). Aunque hay moléculas altamente reactivas como las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y las especies reactivas de cloro (RCS), los radicales libres más conocidos son los metabolitos de oxígeno. Dentro de éstos se encuentran el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$), el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), el peroxinitrito (ONOO^-) y el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) (Pavelescu, 2015).

Las ROS son bien conocidas por jugar un doble papel como especies perjudiciales y beneficiosas. La sobreproducción de ROS produce estrés oxidativo, un proceso perjudicial que puede causar daño en las estructuras celulares y modificar los lípidos de las membranas, las proteínas y el ADN, y cuya acumulación se ha relacionado con muchas enfermedades. Por el contrario, la generación de ROS puede ser beneficiosa a concentraciones bajas o moderadas, estando relacionadas con numerosas funciones fisiológicas en respuestas celulares, como por ejemplo por su implicación en vías de señalización celular, en la defensa contra agentes infecciosos o en la inducción de la respuesta mitogénica (Valko et al., 2007).

La determinación de ROS puede ser llevada a cabo por diferentes métodos experimentales con diferente especificidad y sensibilidad. Sin embargo, el uso de muchos de estos métodos ha sido criticado debido a su baja especificidad, al no permitir la localización subcelular y a la existencia de artefactos (Dikalov y Harrison, 2014). Además, las actuales herramientas para medir ROS *in vivo* no permiten la discriminación entre las respuestas de señalización y daño o investigar cómo bajos niveles de ROS median respuestas, probablemente transitorias e implicadas en procesos reversibles de oxidación (Miranda-Vizuete y Veal, 2017).

Actualmente, los métodos más utilizados están basados en la interacción de las ROS con compuestos químicos para dar lugar a fluorescencia o quimioluminiscencia. Para este trabajo se ha utilizado la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Este compuesto es un éster permeable que atraviesa las membranas celulares y es hidrolizado enzimáticamente por esterasas intracelulares que eliminan los grupos acetatos dando lugar a un compuesto no fluorescente, el DCFH (Wang y Joseph, 1999). En presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) el DCFH es oxidado

a un compuesto fluorescente (DCF). Por lo tanto, el DCF intracelular puede ser usado como un índice de los niveles intracelulares de ROS en gusanos individuales. Myhre et al. (2003) indicaron que con este método en sistemas biológicos se pueden detectar varios ROS a los que el DCFH-DA es sensible: ONOO^- , OH^\bullet , H_2O_2 en presencia de peroxidasas (ya que el H_2O_2 solo no oxidaría al DCFH a DCF). Sin embargo, otros compuestos como superóxido, NO, HOCl o O_2^\bullet no son detectables, ya que el DCFH-DA no es oxidado por ellos.

En la actualidad este método sigue siendo comúnmente utilizado por la comunidad científica para la determinación de ROS (Jara-Palacios et al., 2013, Paiva et al., 2015; Sobeh et al., 2018), aunque tampoco está exento de opiniones contrarias a su uso. De hecho, existe una amplia bibliografía sobre su aplicación (Myhre et al., 2003; Chen et al., 2010; Labuschagne y Brenkman, 2013; Dikalov y Harrison, 2014; Pavelescu, 2015). Labuschagne y Brenkman (2013) señalan que la amplificación de artefactos con este método se limita bastante al trabajar con animales vivos en lugar de con lisados. Aunque actualmente sigue existiendo controversia sobre su uso, sobre todo por su especificidad, muchos autores están de acuerdo en que DCFH-DA es una sonda útil para el estudio del estado oxidativo de la célula en sistemas celulares y sistemas biológicos, apuntando que aunque podría usarse como una sonda para algunos tipos específicos de la producción de ROS, parece ser un marcador más adecuado para evaluar la producción total de ROS (Chen et al., 2010; Labuschagne y Brenkman, 2013; Pavelescu, 2015).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio (González-Manzano et al., 2012) se encontró que la exposición de *C. elegans* a estrés térmico (2 h, 35 °C), aplicado en el día 6º de adulto, producía una elevación en los niveles de ROS que no era observada cuando los gusanos habían sido cultivados en presencia de EC (200 μM). El tratamiento con EC no producía, sin embargo, cambios significativos en los niveles de ROS cuando los gusanos no eran sometidos a estrés. Esos resultados apuntaban a que la EC contrarrestaba el aumento de ROS inducido por el estrés, contribuyendo a mantener éstos en niveles que podían considerarse “fisiológicos”.

En el presente trabajo se procedió a realizar nuevos ensayos similares, donde se medían los niveles de ROS cada 2-3 días a lo largo de la vida en una misma población

de *C. elegans*, cultivada en ausencia o presencia de EC (200 μ M) y no sometida o sometida a estrés térmico (2 h, 35 $^{\circ}$ C) previo a la determinación de ROS (Figuras IV.2.3 y IV.2.4). El objetivo era determinar la influencia que podía tener sobre los niveles de ROS un mayor tiempo de exposición a EC.

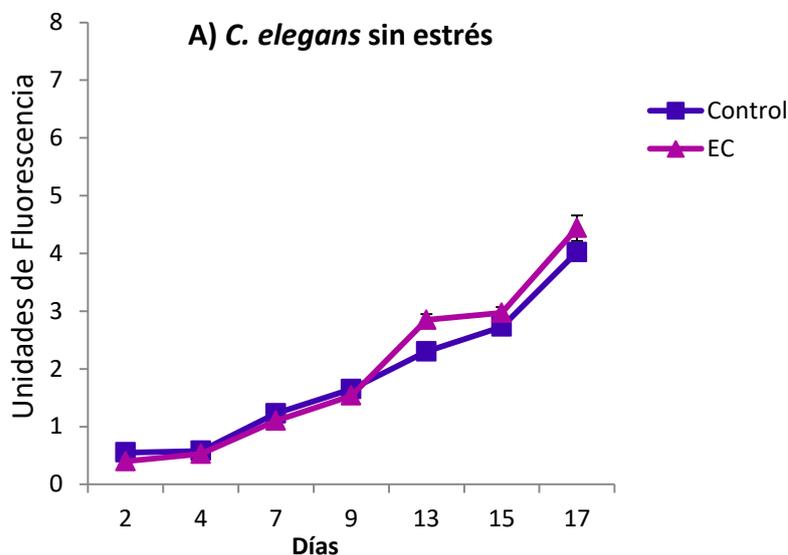


Figura IV.2.3. Niveles de ROS intracelulares en una población de *C. elegans* cultivados en presencia o ausencia de EC (200 μ M) y no sometidos a estrés térmico. En cada caso, se realizaron cinco experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

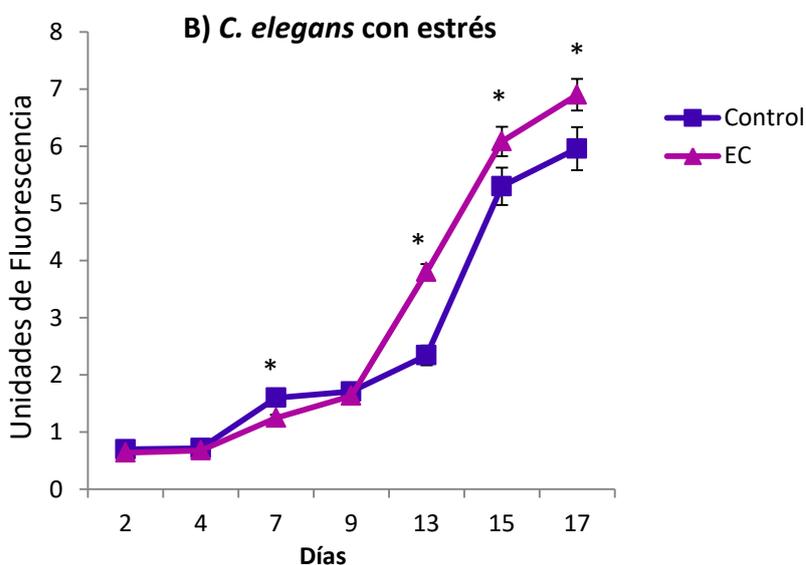


Figura IV.2.4. Niveles de ROS intracelulares en una población de *C. elegans* cultivados en presencia o ausencia de EC (200 μ M) y sometidos a estrés térmico (2h, 35 $^{\circ}$ C) previo a la determinación de ROS. En cada caso, se realizaron cinco experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

Los resultados mostraron, como podría esperarse, un aumento en los niveles de ROS a lo largo de la vida del gusano y una mayor concentración de éstos en gusanos sometidos a estrés. Con relación al efecto de la EC se pudo observar que en los individuos más jóvenes los niveles de ROS permanecían en valores similares o ligeramente por debajo de los obtenidos en sus respectivos controles. Ambas observaciones estarían de acuerdo con lo encontrado en los ensayos previos donde las ROS se determinaban en el 6º día de adulto (González-Manzano et al., 2012). Sin embargo, a partir de aproximadamente el día 9 de adulto esta tendencia se invertía, manteniéndose los valores de ROS más elevados en los gusanos cultivados en presencia de EC que en sus controles correspondientes. Esta tendencia se observó tanto en gusanos sometidos a estrés como en los no estresados, aunque el aumento solo fue significativo en los sometidos a estrés.

Los efectos de los niveles de ROS sobre un organismo están aún bajo discusión. De acuerdo a la teoría de los radicales libres del envejecimiento, el daño macromolecular sería resultado de la producción de especies tóxicas reactivas de oxígeno durante la respiración celular (Harman, 1972). Sin embargo, aunque está claro que el daño oxidativo se incrementa durante el envejecimiento, estudios recientes tanto en invertebrados (gusanos y moscas) como en mamíferos (ratones) apuntan a que el estrés oxidativo podría no ser la causa de envejecimiento, o al menos no serlo de acuerdo a la concepción clásica (Schulz et al., 2007; Lapointe y Hekimi, 2010; Yang y Hekimi, 2010; Gladyshev, 2014; Sanz, 2016). De hecho, un número cada vez mayor de estudios parecen contradecir la teoría de radicales libres, incluidos algunos llevados a cabo en *C. elegans*, que observan aumentos en la duración de vida en gusanos que presentaban mayores concentraciones de ROS. Lee et al. (2010) mostraron que la inhibición de la respiración mitocondrial promovía la longevidad por activación de HIF-1, un factor de transcripción inducible en hipoxia en *C. elegans*. La hipótesis que propusieron es que la inhibición de la respiración produciría un aumento leve de ROS, que sería el responsable de la activación de HIF-1 y consecuentemente de la activación de la expresión génica y promoción de la longevidad. En ese estudio, los autores también comprobaron que niveles bajos de paraquat, un generador químico de ROS, aumentaban significativamente la longevidad en *C. elegans*, mientras que

concentraciones más elevadas la disminuía de manera dosis dependiente. Resultados similares fueron obtenidos por Heidler et al. (2010) utilizando juglona, otro generador químico de ROS. En este caso, bajo un estrés oxidativo moderado, observaban un aumento de la longevidad que estaba asociado a un aumento en la expresión de proteínas de choque térmico pequeñas HSP-16.2, la mejora en los niveles de glutatión y la translocación nuclear de DAF-16. Demostraron que el aumento de ROS producía alteraciones de la expresión génica de *daf-16* y *sir-2.1* que conducían a una mayor longevidad de *C. elegans* de manera dependiente a la concentración del estresante, siempre que las concentraciones de juglona no fueran demasiado altas, ya que en ese caso se producía la muerte prematura debido a una saturación de la capacidad protectora del animal.

Los resultados de estudios realizados por Yang y Hekimi (2010) en mutantes *isp-1* y *nuo-6* de *C. elegans*, que muestran una mayor duración de vida, tampoco eran coherentes con la teoría clásica del envejecimiento. Estos mutantes tienen alteradas proteínas mitocondriales que codifican subunidades de los complejos I (*nuo-6*) y III (*isp-1*) de la cadena de transporte de electrones y esto se traduce en una disminución del transporte de electrones que provoca un aumento de radical anión superóxido. Los autores comprobaron que ese aumento de los niveles de superóxido es necesario y suficiente para aumentar la longevidad y que dicho efecto era eliminado con antioxidantes como la vitamina C y, al contrario, fenocopiado por un leve tratamiento con paraquat. Yang y Hekimi (2010) proponen un modelo en el que el daño mitocondrial (no solo y no principalmente daño oxidativo) desencadena un aumento en el nivel de superóxido, el cual actúa como señalizador induciendo mecanismos de reparación y protección general, lo que ralentizaría el proceso de envejecimiento.

Van Raamsdonk y Hekimi (2012) propusieron que la duración de la vida de *C. elegans* era el resultado de un equilibrio entre la señalización mediada por ROS pro-supervivencia y la toxicidad de ROS. Según esos autores, el superóxido no es simplemente un subproducto tóxico del metabolismo, sino que está involucrado en un tipo de señalización mediada por ROS que puede dar como resultado una mayor longevidad.

Recientemente, Meng et al. (2017) estudiaron las diferentes respuestas al estrés oxidativo en individuos jóvenes y viejos usando *C. elegans* y fibroblastos humanos. Estos autores, propusieron un nuevo concepto llamado "Redox-Stress Response Capacity (RRC)", según el cual las células u organismos son capaces de generar respuestas redox dinámicas para activar la señalización celular y mantener la homeostasis celular. Esta respuesta sería mayor en los individuos jóvenes generando más ROS y activando vías de señalización, con una mejor capacidad para degradar las proteínas dañadas mediante la regulación de las chaperonas. Por lo tanto, la diferente producción de ROS dependiendo de la etapa de la vida del gusano observada tras el tratamiento con EC podría contribuir a explicar los diferentes efectos del flavan-3-ol en *C. elegans*.

Teniendo en cuenta el número creciente de ensayos que discrepan de la teoría clásica del envejecimiento, diversos autores (Lapointe y Hekimi, 2010; Gems et al., 2013; Dancy et al., 2014; Gladyshev, 2014, entre otros) han revisado algunos de sus puntos principales y la relación con los nuevos resultados. Según la idea central de la teoría del envejecimiento, la producción mitocondrial de ROS es causa del mismo, de modo que si se consigue reducir los niveles de ROS, por ejemplo, mediante antioxidantes dietéticos o por sobreexpresión de la actividad antioxidante endógena, se debería esperar un aumento de la duración de vida. Esta premisa no se ve satisfecha en muchos estudios experimentales, donde la exposición a antioxidantes no modifica la duración normal de vida o conduce incluso a efectos perjudiciales. Igualmente, en algunos estudios, el aumento en los niveles de ROS por inactivación génica de la actividad antioxidante no se ve acompañado de efectos perjudiciales o de una reducción en la duración de vida, sino incluso en ocasiones de un aumento en la misma. Por otra parte, cuando se analiza el estrés oxidativo en especies o mutantes longevos sería de esperar un descenso en la producción de ROS y menos daño oxidativo, aunque hay estudios donde se observa una producción normal o mayor de ROS y un normal o mayor daño oxidativo. Sin embargo, otros puntos asociados a la idea central sí se han comprobado, como que el daño oxidativo mitocondrial se acumula crónicamente con la edad, la función mitocondrial disminuye con la edad, y la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo global de proteínas, DNA y lípidos

umentan con la edad, así como que el daño oxidativo participa en el deterioro funcional asociado al envejecimiento (revisado por Lapointe y Hekimi, 2010).

Si se comparan los resultados obtenidos en este estudio con relación a la evolución de los niveles de ROS a lo largo de la vida del gusano (Figuras IV.2.3 y IV.2.4) y la curva de longevidad (Figura IV.2.2), se puede ver un aumento en la tasa de supervivencia de los gusanos tratados con EC con respecto al control a partir de aproximadamente el día 13, precisamente cuando los niveles de ROS en ambas poblaciones se han igualado para luego permanecer ligeramente más elevados en los individuos tratados con EC que en el control. Estos resultados reforzarían la idea emergente de que cierta elevación en los niveles de ROS podría ser beneficiosa. De este modo, en coherencia con lo propuesto por otros autores (Heidler et al., 2010; Lapointe y Hekimi, 2010; Ristow y Schmeisser, 2014), nuestros resultados sugieren que un aumento moderado de ROS puede tener efectos beneficiosos, posiblemente al inducir la expresión de rutas celulares protectoras, activando rutas metabólicas alternativas, reparación de mecanismos y cambios en la respiración.

4.2.2.3. Daño oxidativo: carbonilación de proteínas y productos de peroxidación de lípidos

De acuerdo con lo previamente discutido, la producción de concentraciones moderadas de ROS podría contribuir a mantener el balance oxidación/reducción en los sistemas biológicos, además de actuar como moléculas de señalización con diferentes funciones fisiológicas. Sin embargo, altas concentraciones de ROS se relacionan con la interacción y modificación de biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN y los consecuentes daños asociados (Valko et al., 2007).

El radical hidroxilo puede reaccionar con todos los componentes de la molécula de ADN, incluyendo sus bases púricas y pirimidínicas y el esqueleto de desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1998). Se han identificado más de 20 tipos de lesiones en las bases de ADN, aunque la más estudiada es la formación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG) siendo ampliamente utilizada como un biomarcador de estrés oxidativo. El daño oxidativo del ADN ha sido relacionado con mutagénesis, envejecimiento y algunas enfermedades, como trastornos neurológicos o metabólicos

y enfermedades autoinmunes, entre otras, aunque el vínculo más fuerte de las modificaciones permanentes del material genético por daño oxidativo e inestabilidad genómica es con carcinogénesis (Valko et al., 2007).

Las proteínas carboniladas son también comúnmente utilizadas como un biomarcador de la oxidación de proteínas mediada por ROS en células y tejidos. Ciertas proteínas son más susceptibles a oxidarse que otras, dependiendo de la cantidad de restos aminoácido sensibles a la oxidación, sitios de unión a metales, conformación molecular y localización de la proteína en la célula. El mecanismo a través del cual las proteínas se convierten en carboniladas como resultado de su oxidación está bastante conservado en diferentes especies. La carbonilación de proteínas es un marcador bioquímico para proteínas dañadas irreversiblemente cuyo destino es ser inactivadas por degradación proteasomal. Sin embargo, la capacidad de las células para procesar proteínas dañadas por el proteasoma es limitada y las proteínas carboniladas no degradadas pueden formar agregados potencialmente tóxicos. Así, elevados niveles de proteínas carboniladas suelen estar ligados a una pérdida de la viabilidad de las células y se han relacionado con algunas enfermedades, como Alzheimer, Parkinson, diabetes o trastornos cardiovasculares (Chaudhuri et al., 2006; Avery, 2014).

De igual manera, algunas ROS tienen potencial para causar deterioro oxidativo de lípidos mediante el ataque de radicales libres a lípidos de membrana o lípidos libres. En último término la peroxidación lipídica puede producir la pérdida de integridad de la membrana y posible muerte celular. Algunos productos secundarios habituales de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados son malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HNE), dienos conjugados, isoprostanos, hexanal o etano. Algunos de estos compuestos han sido propuestos como biomarcadores útiles, ya que son medibles en fluidos biológicos, pese a que son necesarios procesos complejos para prepararlos para su análisis. Los productos de la peroxidación lipídica se han relacionado en numerosas ocasiones con procesos patológicos como cáncer, aterosclerosis e inflamación (Lowe, 2014).

Para evaluar si el tratamiento con EC tenía influencia sobre el nivel de daño oxidativo en *C. elegans* se determinaron los contenidos de proteínas carboniladas y de productos de peroxidación lipídica en gusanos N2 cultivados en placas NGM en

presencia y ausencia de EC (200 μ M) y sometidos a estrés térmico durante 5 horas en los 10 y 17 días de edad adulta.

Para la **determinación de proteínas carboniladas** se adaptó un método basado en el descrito por Chaudhuri et al. (2006) de reacción de los grupos carbonilos con fluoresceína tiosemicarbazida (FTC) y posterior medida de la fluorescencia empleando como longitudes de onda de emisión y de excitación 485 nm y 520 nm, respectivamente. El protocolo del método optimizado se recoge en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados se han expresado como nmoles de proteínas carboniladas (expresadas como nmoles de FTC) por mg de proteína de gusano. Los resultados se recogen en la Figura IV.2.5.

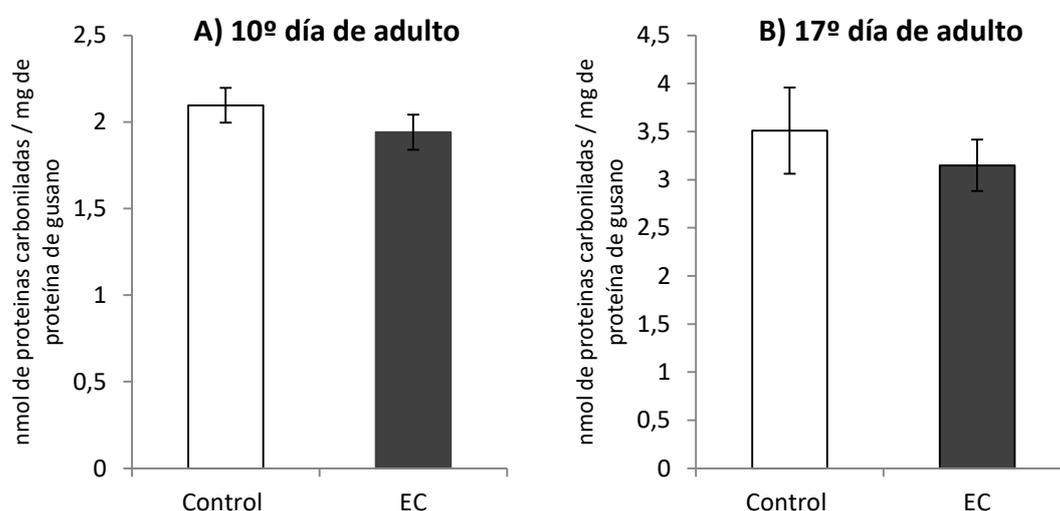


Figura IV.2.5. Concentración de proteínas carboniladas en *C. elegans* cultivados en presencia y ausencia de EC (200 μ M) sometidos a estrés térmico (5 h, 35 $^{\circ}$ C) en los días 10 (A) y 17 de adulto (B). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

Como se puede ver en la Figura IV.2.5, A y B, se observó una ligera disminución en los niveles de proteínas carboniladas en los gusanos tratados con EC y sometidos a estrés térmico a día 10 y 17. Aunque las diferencias no fueron significativas (* $p > 0,05$), los niveles de proteínas carboniladas nunca fueron mayores en los gusanos cultivados en presencia de EC que en sus respectivos controles, lo que indica que, cuando menos, el tratamiento con EC no conlleva un daño oxidativo significativo en las proteínas, a

pesar de que la concentración de ROS era mayor en los gusanos tratados con EC a partir del día 10 (Figuras IV.2.3 y IV.2.4).

Para el análisis de los **productos de peroxidación lipídica** en *C. elegans*, se había adaptado previamente en nuestro grupo de investigación un método para su determinación mediante HPLC tras derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina, DNPH (Sánchez-Blanco et al., 2016), basado en el descrito por Andreoli et al. (2003) para el análisis de aldehídos volátiles en aliento. Como marcadores de peroxidación lipídica se emplearon MDA, 4-HNE y cis-hexenal. Los productos derivatizados con DNPH eran identificados de acuerdo a sus espectros UV-vis (establecidos con el detector de diodos) y de masas (Tabla IV.2.1 y Figura IV.2.6). La cuantificación se realizaba a partir de las áreas de los picos cromatográficos registrados por detección fotométrica a longitudes de onda específicas (310 nm y 380 nm), por comparación con rectas de calibrado obtenidas con patrones de los distintos marcadores considerados. En las Figuras IV.2.7 y IV.2.8 se muestran cromatogramas de un homogenizado de gusanos registrados a las dos longitudes de onda, donde se pueden observar picos correspondientes a los derivados derivatizados de los distintos marcadores de oxidación lipídica. Los resultados se expresan como μg de producto por mg de proteínas de gusano.

Tabla IV.2.1. Características cromatográficas y espectrales de los productos de peroxidación lipídica analizados.

Pico	Producto	Rt (min)	λ max (nm)	Ion pseudomolecular del producto derivatizado $[\text{M-H}]^-$ (m/z)
1	Malondialdehído	16.2	306	233
2	4-Hidroxinonenal	23.5	380	335
3	Hexenal	26.8	380	277

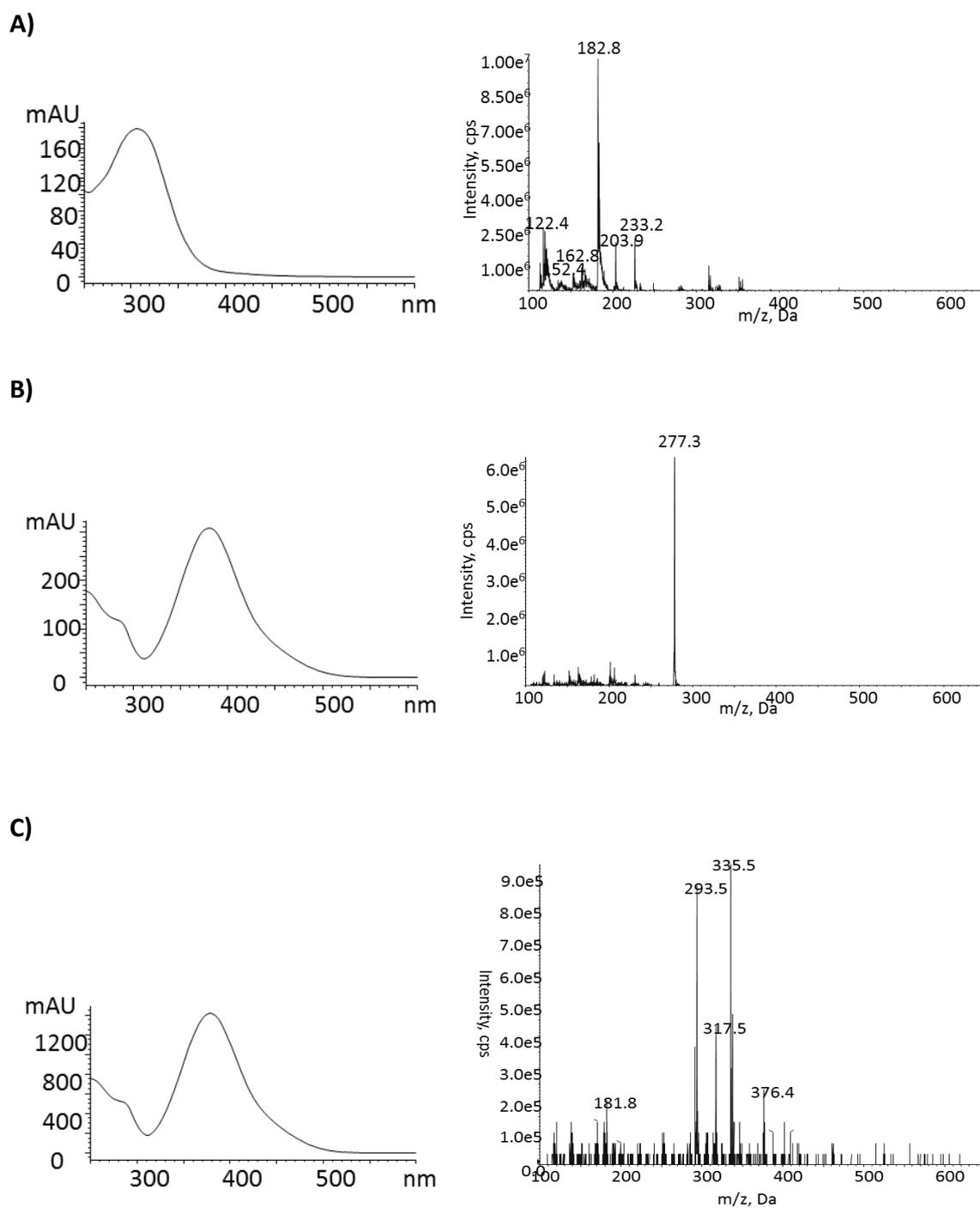


Figura IV.2.6. Espectros UV-vis (izquierda) y de masas (derecha) de (A) malondialdehído, (B) hexenal y (C) 4-hidroxinonenal.

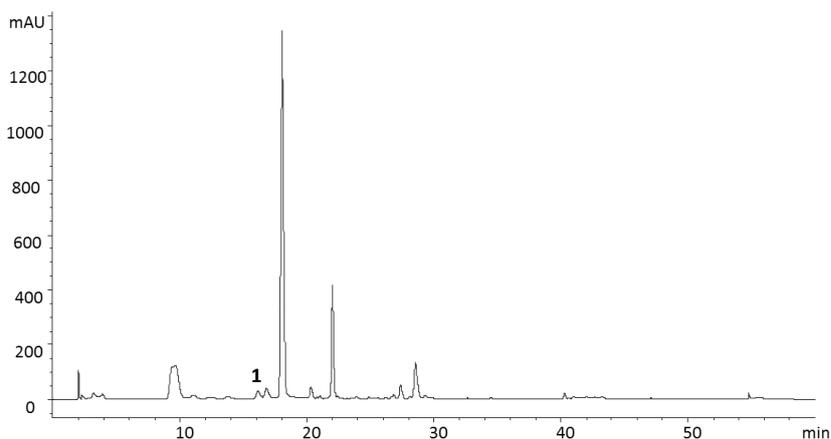


Figura IV.2.7. Cromatograma de productos de peroxidación lipídica registrado a 310 nm. El pico 1 corresponde a malondialdehído.

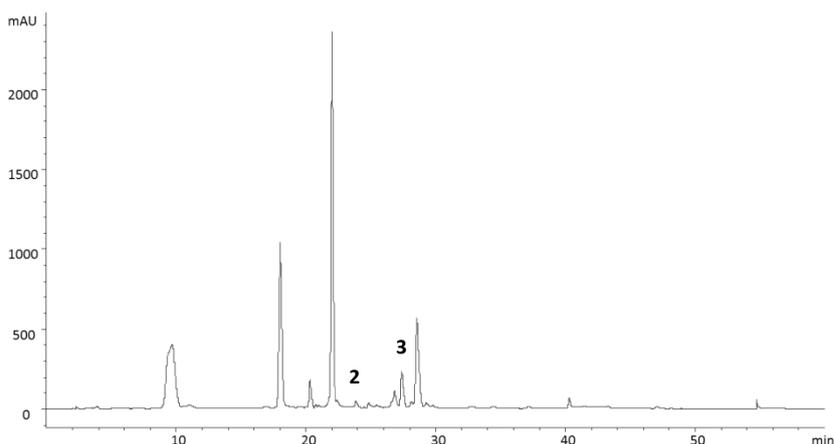


Figura IV.2.8. Cromatograma de productos de peroxidación lipídica registrado a 380 nm. Los picos 2 y 3 corresponden a 4-hidroxinonenal y hexenal respectivamente.

Los resultados obtenidos se recogen en las Figuras IV.2.9, A y B, donde, como se puede comprobar, los gusanos tratados con EC mostraban niveles más bajos de los productos de oxidación lipídica respecto a los gusanos control en ambos días de ensayo, aunque el descenso solo fue significativo en el caso del MDA. Es de destacar que, al igual que las proteínas carboniladas, el aumento de los niveles de ROS en gusanos tratados con EC (Figuras IV.2.3 y IV.2.4) no supone un aumento de los productos de peroxidación lipídica, según los marcadores analizados.

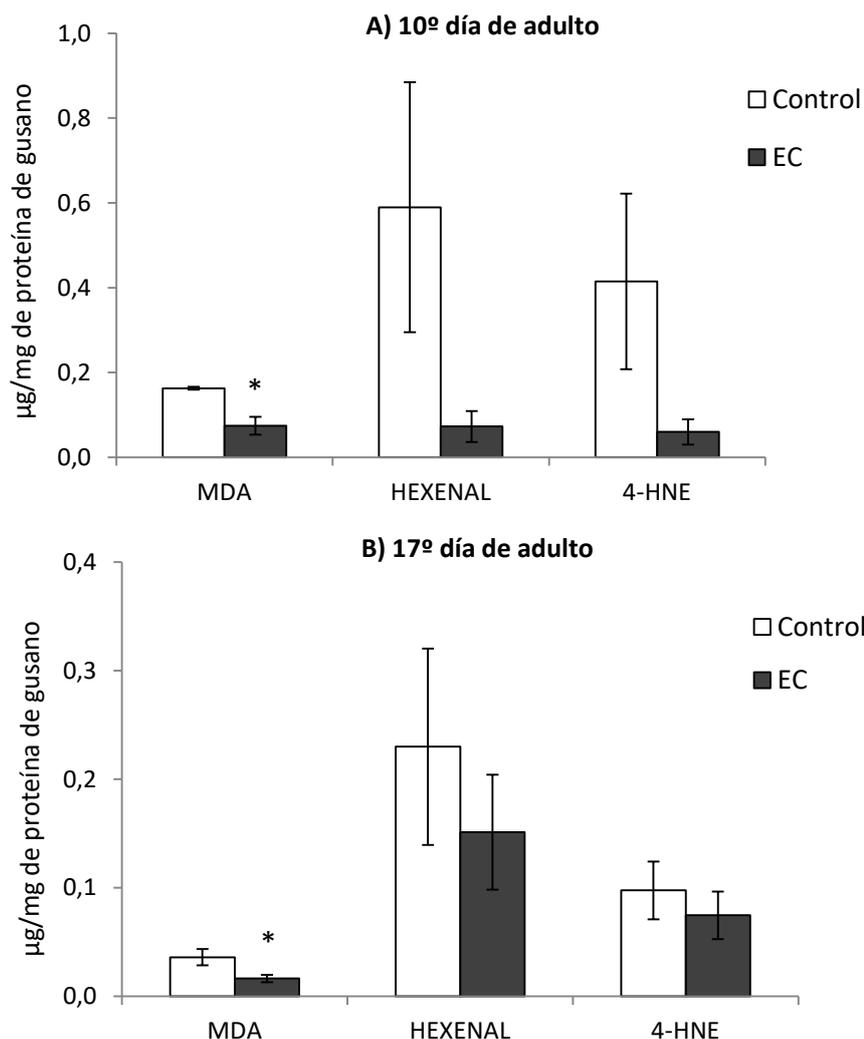


Figura IV.2.9. Niveles de productos de peroxidación lipídica en *C. elegans* cultivados en presencia y ausencia de EC (200 μ M) sometidos a estrés térmico (5 h, 35 °C) en los días 10 (A) y 17 de adulto (B). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

Los productos terminales de oxidación lipídica se han relacionado con la producción de daño oxidativo en células. En particular, se ha visto que el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) es un potencial agente alquilante de proteínas, capaz de inducir la producción de peróxido intracelular y producir la depleción del glutatión intracelular (GSH), conduciendo al estrés oxidativo de las células (Uchida et al., 1999). El 4-HNE es asimismo un activador específico de quinasas de la superfamilia MAP (mitogen-activated proteins), como las JNK (Jun N-terminal kinases) y p38 MAP kinases, que inducen eventos de fosforilación que conducen a la activación de factores de transcripción, como c-Jun, implicados en rutas de señalización asociadas a procesos de

crecimiento celular, excitación neuronal y estrés celular. Se ha observado que la expresión de c-Jun asociada a 4-HNE conduce a la activación de AP-1 (Activator Protein-1) y consecuente aumento en la actividad ligante a ADN, lo que podría estar relacionado con el potencial mutagénico y genotóxico de este aldehído (Uchida et al., 1999). De este modo, la reducción de los niveles de los productos de la peroxidación lipídica asociada al tratamiento con EC podría contribuir a explicar los efectos observados en *C. elegans* con relación a mayor resistencia a estrés oxidativo y aumento de la duración máxima de vida.

A la vista de los resultados obtenidos, tanto en los ensayos de peroxidación lipídica como en los de proteínas carboniladas, parece concluirse que la exposición crónica a EC supone una protección frente a daño oxidativo, que sería todavía evidente en etapas avanzadas de la vida de *C. elegans*, como sugieren las observaciones realizadas en los ensayos de longevidad. De este modo, se podría suponer que el aumento moderado en los niveles de ROS provocado por el tratamiento con EC en *C. elegans* conduce a una respuesta compensatoria, induciendo mecanismos de protección, que darían como resultado una mayor resistencia al estrés oxidativo.

Resultados similares fueron observados en diversos estudios dónde se analizaban los efectos beneficiosos de MCLK1 (una enzima mitocondrial necesaria para la biosíntesis de ubiquinona) sobre el estrés oxidativo mitocondrial. La inactivación parcial por mutación de *clk-1* en *C. elegans* y la parcial inactivación de Mclk1 en ratones, pese a la presencia de un alto estrés oxidativo, conducían a la prolongación de la vida media y máxima de estos organismos, y mostraban una atenuación significativa de los biomarcadores de envejecimiento (proteínas oxidadas, productos de peroxidación lipídica y daño oxidativo en el ADN) (Wong et al., 1995; Liu et al., 2005; Lapointe et al., 2009). Posteriormente Lapointe y Hekimi (2010) explicaron estos resultados paradójicos por un posible proceso de hormesis. En toxicología la hormesis se define como un proceso en el que la exposición a dosis bajas de un agente químico o ambiental que a dosis más altas es perjudicial conduce a efecto adaptativo beneficioso sobre la célula o el organismo. Este concepto cada vez se aplica más en las investigaciones sobre envejecimiento, y relaciona una exposición a dosis bajas de agentes de otra manera perjudiciales, como la irradiación, el estrés térmico o la

generación de ROS, con una variedad de efectos anti-envejecimiento y longevidad (Gems et al., 2008). Incluso ha sido propuesto el término “mitohormesis” para describir los efectos de un alto pero subletal nivel de ROS mitocondrial que podría inducir efectos celulares beneficiosos, citoprotección transitoria o aumento de la longevidad del organismo (Schulz et al., 2007; Ristow y Schmeisser, 2014). Xiong et al. (2018) explicaron sus resultados en gusanos tratados con EGCG por un posible efecto de mitohormesis. Estos autores vieron que EGCG proporcionaba un aumento de la vida media mediante una respuesta dependiente de la dosis en forma de U invertida, que fue asociado a un incremento transitorio de las ROS que producían una activación de la respuesta antioxidante y otros mecanismos de protección, en parte gracias a la modulación de la señalización AAK-2/AMPK, SIR-2.1/SIRT1 y DAF-16/FOXO.

Sin embargo, en la actualidad, el papel de las ROS en el proceso de envejecimiento sigue siendo un tema controvertido, y sigue sin esclarecerse si su elevación es una causa o una consecuencia del mismo (Sanz, 2016). Lo que parece claro es que las ROS pueden funcionar como moléculas de señalización promotores de diferentes mecanismos que inducirían una respuesta adaptativa y que en última instancia promocionarían la salud, extenderían la esperanza de vida y aumentarían las tasas de supervivencia y resistencia al estrés (Schulz et al., 2007; Ristow y Schmeisser, 2014). Hekimi et al. (2016) consideran que el incremento de las ROS produce una mayor longevidad debido a cambios globales, incluidos cambios en patrones transcripcionales que conducen a la homeostasis. Entre otros mecanismos, las ROS actuarían en diferentes vías de señalización como las rutas especialmente involucradas en responder a estrés celular, reparación de daño e incluso rutas como la señalización apoptótica intrínseca, la cual contribuye a la homeostasis del organismo al eliminar células defectuosas o no deseadas.

4.2.3 Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos biológicos de epicatequina

4.2.3.1 Influencia de epicatequina en genes relacionados con resistencia al estrés y de la ruta de la insulina. Ensayos con mutantes y cuantificación de la expresión de ARNm mediante RT-qPCR

Actualmente la idea de que los flavonoides no actúan en el organismo solo como antioxidantes convencionales, sino que también pueden modular múltiples rutas celulares está ganando fuerza (Mansuri et al., 2014). La ruta de la insulina contribuye a la longevidad y a la respuesta al estrés oxidativo o por choque térmico y comprende componentes altamente conservados desde los nematodos a los mamíferos, incluidos los humanos (Murphy et al., 2003). Varios autores han observado que varias clases de flavonoides parecen influir en esta ruta de señalización (Abbas y Wink, 2010; Martorell et al., 2011; Bonomo et al., 2014). Sin embargo, aunque hay muchos trabajos sobre los efectos beneficiosos de diferentes flavan-3-oles y de extractos ricos en flavan-3-oles en diferentes organismos, incluidos los humanos, los mecanismos moleculares implicados en tales efectos no están suficientemente esclarecidos. Con el objeto de contribuir a la comprensión de esos mecanismos, en este trabajo, se ha evaluado la capacidad de la EC para modular la resistencia a estrés térmico en mutantes con pérdida de función en diferentes genes de la ruta de la insulina y en genes relevantes en la resistencia al estrés. La premisa para la realización de los ensayos fue que el tratamiento con EC no podría aumentar la supervivencia de nematodos mutantes que carecieran de los genes específicos que fueran necesarios para la protección frente al daño oxidativo inducido mediante estrés térmico. Todos los ensayos con mutantes se han llevado a cabo al mismo tiempo en gusanos mutantes tratados con 200 μ M de EC y sin tratamiento (solo con 0,1 % de DMSO en el medio de cultivo; mutantes control) y adicionalmente en gusanos silvestres N2 sin tratamiento (solo con 0,1 % de DMSO; control N2). Con el fin de simplificar las gráficas de los mutantes, no se recogen los datos del control N2, aunque fueron de utilidad como control metodológico del experimento. Para comprobar si los resultados podían ser diferentes según la etapa de desarrollo, la resistencia al estrés se evaluó en gusanos mutantes adultos jóvenes en edad reproductiva (día 2) y adultos más envejecidos, en edad post-reproductiva (día 9).

Paralelamente, también se estudió el efecto de la EC sobre la expresión de algunos de estos genes mediante RT-qPCR en gusanos N2 tratados con EC en condiciones normales de crecimiento y tras someterlos a estrés térmico (5 h, 35 °C).

Como se ha comentado brevemente en la introducción de esta tesis, la activación y consecuente fosforilación de DAF-2, un receptor tirosina quinasa homólogo del receptor de insulina/IGF-1 en *C. elegans*, conduce a la activación AGE-1, lo que conlleva el aumento en la concentración de PIP3. Las señales proporcionadas por PIP3 activan la cascada de señalización a través de diferentes quinasas, formadas por PDK-1, AKT-1, AKT-2 y SGK-1. Dicho proceso culmina con la fosforilación y, por tanto, la inactivación del factor de transcripción DAF-16/FOXO, que queda secuestrado en el citoplasma (Figura II.16) (Altintas et al., 2016).

Para conocer la posible implicación de esta ruta en el mecanismo de acción de EC en *C. elegans*, en este trabajo se estudió la influencia de los componentes principales que promueven la ruta IIS (coloreados en rojo en la Figura II.16) en la resistencia al estrés térmico tras el tratamiento con EC. Concretamente se estudió la resistencia a estrés inducido térmicamente en diferentes cepas mutantes con pérdida de función: *age-1(hx546)*, *akt-1(mg306)*, *daf-2(e1370)* y el doble mutante *akt-2(tm812);sgk-1(ft15)*. Los resultados mostraron que el tratamiento con el flavonoide no producía una mejora significativa en la resistencia al estrés en ninguna de estas cepas mutantes (Figura IV.2.10). Se obtuvieron resultados similares tanto en los adultos jóvenes (día 2) como en los gusanos mayores (día 9) (Figura IV.2.10, A.1-A.2, B.1-B.2, C.1-C.2, D.1-D.2). Estos resultados sugieren que estos genes podrían ser necesarios para explicar los mecanismos implicados en los efectos de EC en la mejora de la resistencia al estrés térmico/oxidativo en *C. elegans*, así como que la resistencia al estrés mediado por EC implica la vía IIS. Sin embargo, también es necesario tener en cuenta que estos mutantes son de por sí más longevos y más resistentes al estrés que los gusanos de tipo silvestre, lo que podría enmascarar un posible aumento en la supervivencia de los animales estresados producido por EC.

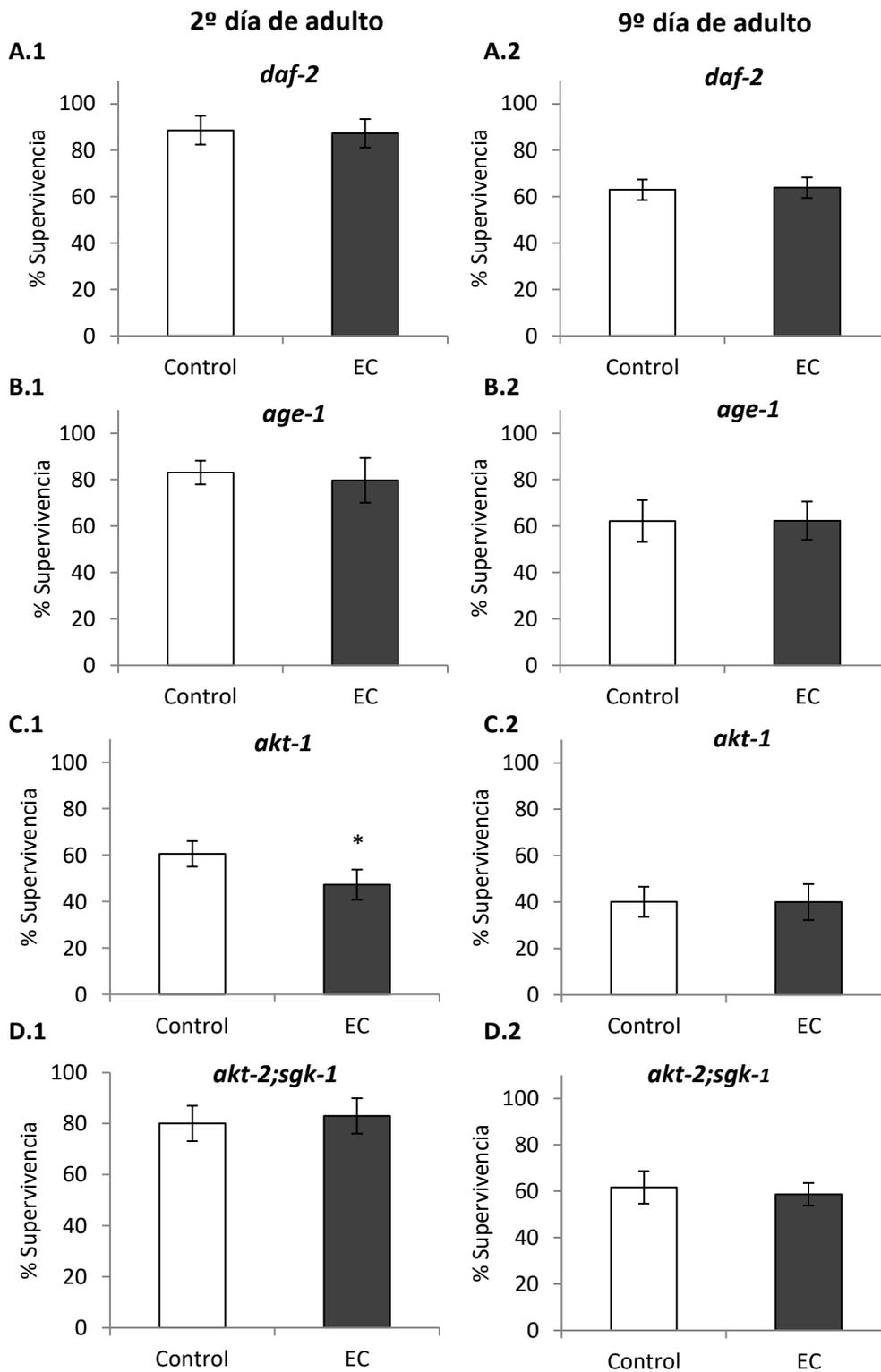


Figura IV.2.10. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 8 h) los días 2 y 9 de adulto en diferentes cepas mutantes de vida larga de la ruta de la insulina: *daf-2(e1370)*, *age-1(hx546)*, *akt-1(mg306)* y *akt-2(tm812);sgk-1(ft15)*, cultivadas en ausencia (controles) y en presencia de EC (200 μM). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media ± SD. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0.05$).

DAF-16, HSF-1 y SKN-1 son factores de transcripción clave regulados por la ruta IIS que contribuyen a la longevidad y regulan la resistencia a diferentes tipos de estrés (Altintas et al., 2016). DAF-18 regula negativamente la ruta de la insulina ya que se encarga de desfosforilar e inhibir a AGE-1 y, por lo tanto, previene la fosforilación de DAF-16 mediante la regulación de las quinasas de la IIS (Ogg y Ruvkun, 1998). Por ello, la regulación adecuada de IIS es crucial para la protección de *C. elegans* frente a cualquier estresor interno o externo (Altintas et al., 2016). En este trabajo también fue estudiada la influencia de EC en los componentes de la ruta que antagonizan o son antagonizados por la IIS (coloreados en verde en la Figura II.16). Concretamente se evaluó la resistencia al estrés oxidativo en los mutantes con pérdida de función *daf-16(mu8)*, *hsf-1(sy441)*, *skn-(zu67)* y *daf-18(e1375)*. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con EC no aumentaba la supervivencia de estos mutantes (Figura IV.2.11), lo que sugiere que estos genes también son necesarios para la mejora de resistencia al estrés térmico mediada por EC en *C. elegans*. En este caso, los resultados fueron nuevamente similares en gusanos jóvenes (día 2) y mayores (día 9) (Figura IV.2.11, A.1-A.2, B.1-B.2, C.1-C.2, D.1-D.2), no observando ningún cambio significativo en el patrón de la influencia de EC en los mutantes seleccionados entre las dos etapas de desarrollo del gusano.

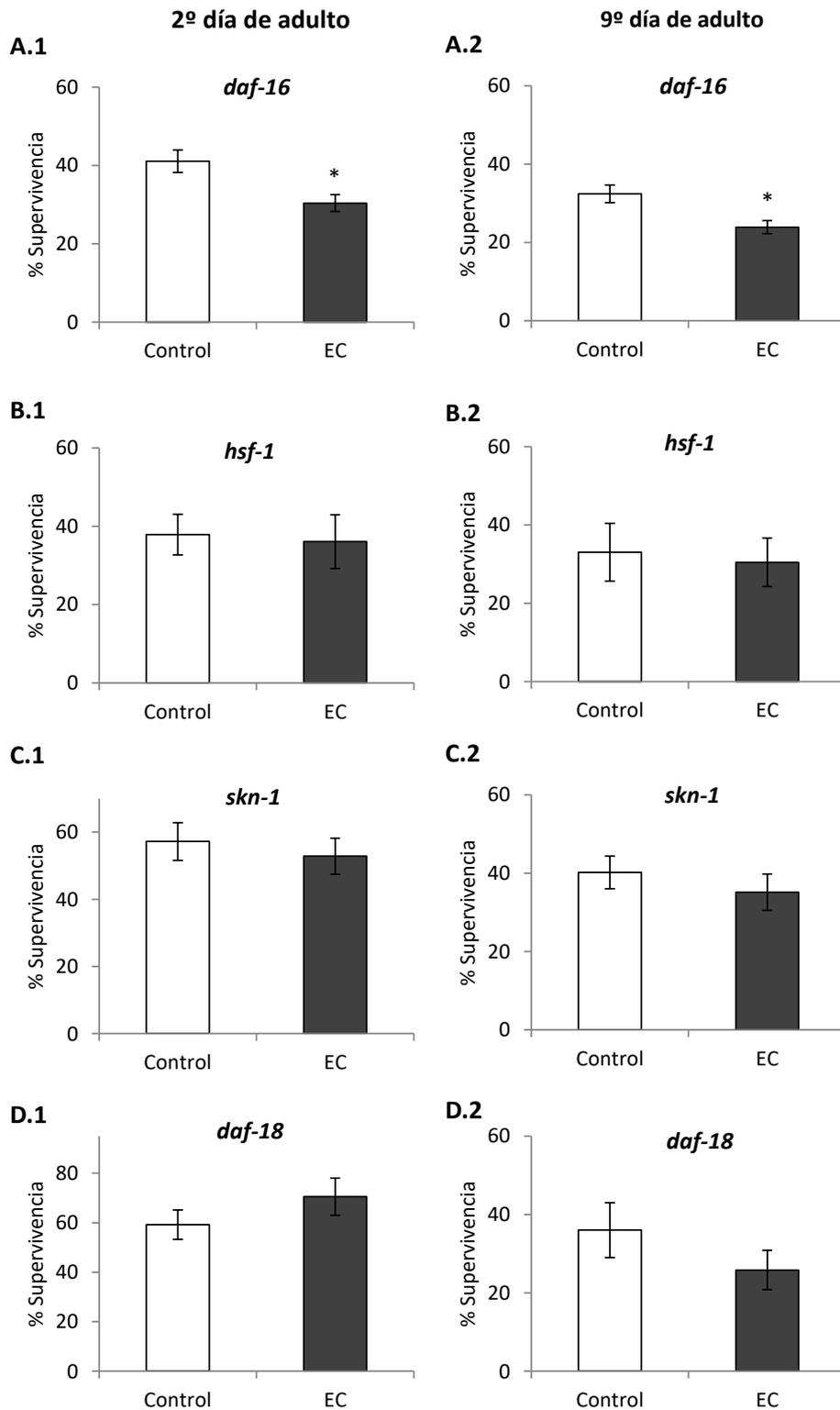


Figura IV.2.11. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 6 h) los días 2 y 9 de adulto en diferentes cepas mutantes: *daf-16(mu86)*, *hsf-1(sy441)*, *skn-1(zu67)* y *daf-18(e1375)*, cultivadas en ausencia (controles) y en presencia de EC (200 µM). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SD. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0.05$).

En un estudio donde se realizaban aproximaciones similares a las nuestras Saul et al. (2009) encontraron, al contrario que en nuestras observaciones, que el tratamiento con 200 μ M de catequina prolongaba significativamente la vida media en mutantes de *age-1* y *daf-16*, lo que indicaría que AGE-1 y DAF-16 no serían necesarios para producir el efecto extensor de la vida de este flavan-3-ol. Sin embargo, no observaron un aumento de la vida media en mutantes *akt-2*, lo que sugiere que AKT-2 está al menos parcialmente implicado en el aumento de longevidad mediado por catequina. Estos autores concluyeron que la ruta IIS no es necesaria para ejercer el efecto de extensión de la vida producido por el tratamiento con catequina, y que los resultados obtenidos para AKT-2 podrían explicarse debido a una posible función de AKT-2 independiente de IIS. Por el contrario, Cai et al. (2011) observaron que el efecto de extensión de vida inducido por el flavonol icariside II dependía de la vía IIS, ya que los mutantes con pérdida de función *daf-16* y *daf-2* no mostraban ninguna extensión de vida después del tratamiento con el compuesto.

daf-16 codifica un factor de transcripción que es el único homólogo FOXO en *C. elegans*. DAF-16 influye en la tasa de envejecimiento en respuesta a la señalización de la ruta IIS, regulando positivamente una amplia variedad de genes involucrados en la respuesta a estrés celular, longevidad, respuesta antimicrobiana y metabolismo (Murphy et al., 2003).

Como se discutió anteriormente, el tratamiento con EC no produjo una mejora en la resistencia al estrés térmico en gusanos mutantes *daf-16(mu86)*, ni a día 2 ni a día 9 de adulto (Figura IV.2.11, A.1 y A.2), señalando que DAF-16 estaba involucrado en la actividad de EC. Con el fin de corroborar esta suposición, se estudió el efecto de EC sobre la expresión de *daf-16* mediante RT-qPCR en la cepa N2 de *C. elegans* cultivada en condiciones normales de crecimiento y luego sometida o no a estrés térmico. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de ARNm de *daf-16* en gusanos cultivados en presencia de 200 μ M de EC, tanto en los nematodos sometidos a estrés térmico como en los que no lo fueron, aunque este aumento solo fue significativo en gusanos no sometidos a estrés (Figura IV.2.12, A y B). Estos resultados apoyaron el posible papel clave de *daf-16* en los efectos producidos por EC en los gusanos.

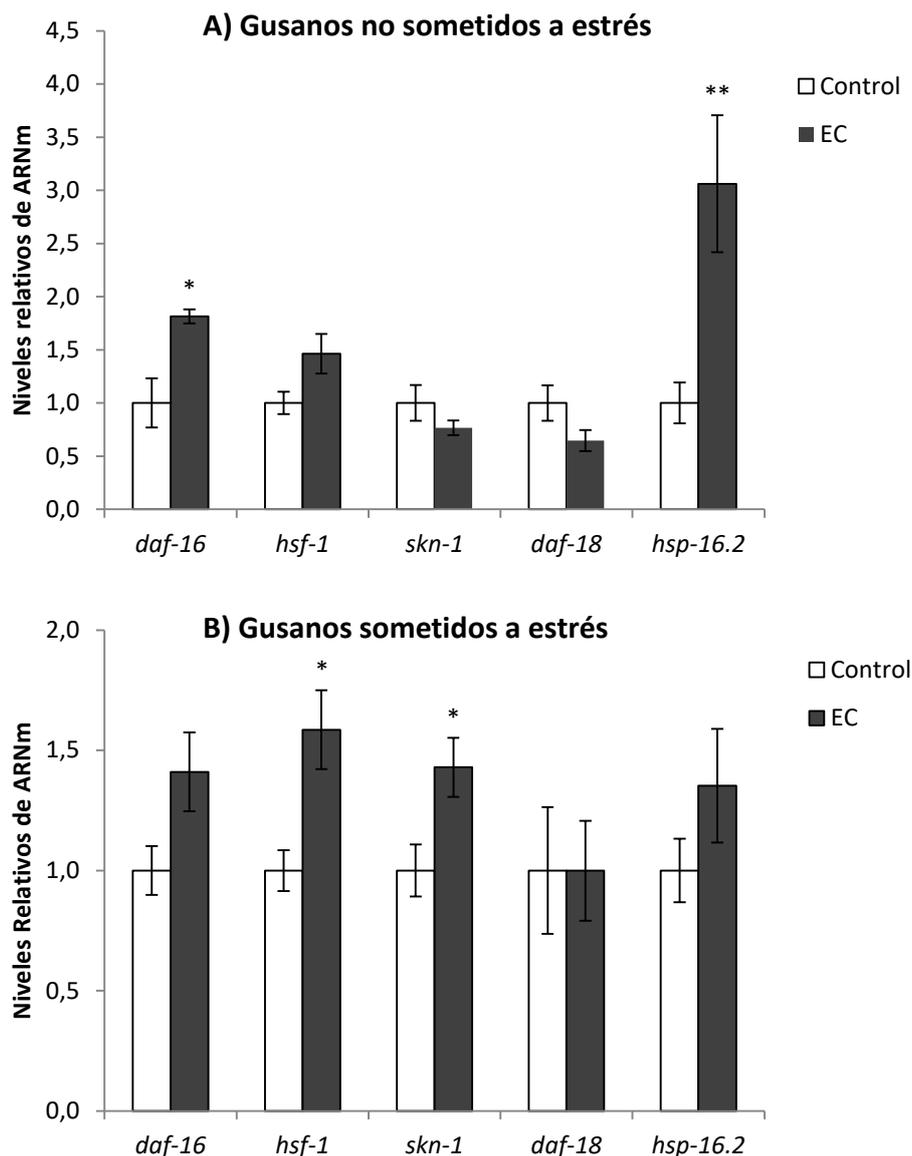


Figura IV.2.12. Efecto de EC sobre la expresión de los genes *daf-16*, *hsf-1*, *skn-1*, *daf-18* y *hsp-16.2* en *C. elegans* N2 cultivados en ausencia (controles) y presencia de EC (200 μ M), en gusanos no sometidos (A) y tras ser sometidos a estrés térmico (35 $^{\circ}$ C, 5 h) (B). El nivel de expresión fue determinado por RT-qPCR, empleando *act-1* como control interno. En cada caso, se realizaron nueve experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

HSF-1 codifica al factor de transcripción de choque térmico de *C. elegans* y funciona como un regulador transcripcional de la expresión de genes inducidos por estrés, cuya actividad es necesaria para regular la respuesta al choque térmico y la proteotoxicidad, además, también influye en el envejecimiento, la inmunidad innata y el desarrollo larvario (Hsu et al., 2003). Al igual que *daf-16*, la expresión de *hsf-1* se

cuantificó mediante RT-qPCR en gusanos N2 en condiciones normales de crecimiento y luego sometidos o no a estrés térmico. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de este factor de transcripción en ambos casos, aunque el aumento era solo significativo cuando se aplicaba estrés térmico (Figura IV.2.12 A y B). Estos resultados, junto con el hecho de que EC no aumentaba la resistencia al estrés térmico de mutantes *hsf-1* (Figura IV.2.11, B.1 y B.2), podrían indicar que *hsf-1* también está involucrado en los efectos de EC.

Las chaperonas moleculares, a las que pertenece la proteína de choque térmico-16.2 (HSP-16.2), son dianas transcripcionales de HSF-1 (Morley y Morimoto, 2004), por lo que también se procedió a cuantificar la expresión de *hsp-16.2* mediante RT-qPCR en condiciones similares a las descritas anteriormente (Figura IV.2.12 A y B). Adicionalmente se evaluó la resistencia a estrés oxidativo inducido térmicamente en la cepa mutante *hsp-16.2(gk249)* tras el tratamiento con el flavonoide (Figura IV.2.13).

Aunque no se puede apreciar en la figura, ya que los resultados de ARNm están normalizados a su respectivo control, se observó un aumento de la expresión de *hsp-16.2* de más de 1000 veces comparando los gusanos sometidos a estrés y los no estresados. Esta observación puede indicar que el fuerte estrés térmico al que fueron sometidos estos gusanos es suficiente para provocar un aumento muy considerable de la expresión de *hsp-16.2* y dificulta la observación de posibles diferencias inducidas por el tratamiento con EC. Aun así, los resultados mostraron un aumento de la expresión de *hsp-16.2* en todos los gusanos tratados con el flavonoide aunque el aumento solo era significativo en los no sometidos a estrés. Además, los efectos beneficiosos de EC en la cepa silvestre dejaron de ser observados en los gusanos mutantes *hsp-16.2*, corroborando la implicación de dicho gen en el mecanismo de acción implicado en los efectos del flavonoide.

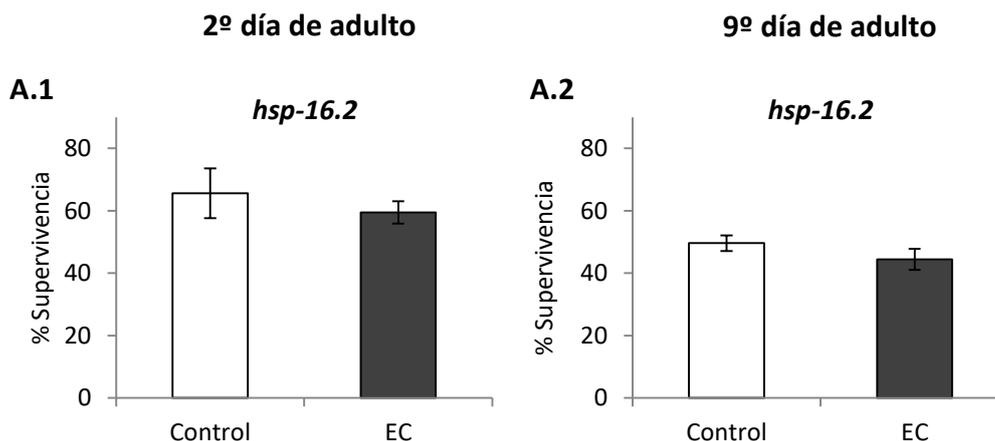


Figura IV.2.13. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 4 h) los días 2 y 9 de adulto en la cepa mutante *hsp-16.2(gk249)*, cultivados en ausencia (controles) y en presencia de EC (200 μ M). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SD. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0.05$).

Se llevaron a cabo estudios similares con SKN-1, homólogo del factor de transcripción Nrf-2, que promueve la resistencia a estrés oxidativo y la longevidad mediante la movilización de la respuesta conservada de destoxificación de fase II (o respuesta al estrés oxidativo de fase II). Además, actualmente se considera que SKN-1 también mantiene la homeostasis de diversos procesos (Blackwell et al., 2015), como la homeostasis proteica a través de la regulación del proteasoma (Tullet et al., 2008 y 2017; Kahn et al., 2008). En este caso, los experimentos mediante RT-qPCR demostraron que el tratamiento con EC incrementaba significativamente la expresión de *skn-1* bajo condiciones de estrés, pero no cuando no era sometido a estrés (Figura IV.2.12, A y B).

En el caso del ensayo de la expresión de *skn-1* en los gusanos no sometidos a estrés, los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre la expresión del ARNm entre los gusanos tratados con EC y los gusanos control. Sin embargo, entre las 9 repeticiones realizadas se encontraron algunas diferencias en el patrón de expresión entre los gusanos tratados y los no tratados con EC, por lo que se planteó la posibilidad de si podría existir un comportamiento diferente en la expresión de *skn-1* según la etapa de desarrollo del nematodo. Por ello, se procedió a analizar las diferencias en la expresión de *skn-1* los días 2, 5, 9, 12 y 16, tanto en gusanos tratados

con EC como en cultivados en ausencia del flavan-3-ol (individuos control). Los resultados encontrados (Figura IV.2.14) fueron los mismos que los obtenidos previamente, concluyendo que la expresión de *skn-1* no se veía afectada por el tratamiento con EC en condiciones normales de crecimiento y en ausencia de estrés. Sin embargo, el aumento significativo en la expresión de *skn-1* en los gusanos sometidos a estrés, junto con los ensayos de resistencia a estrés térmico realizados en mutantes, donde no se observaba un aumento significativo en la supervivencia de los mutantes *skn-1(zu67)* tratados con EC comparados con los gusanos control (Figura IV.2.11, C1 y C2), apuntaban a la participación de SKN-1 en los efectos protectores de EC.

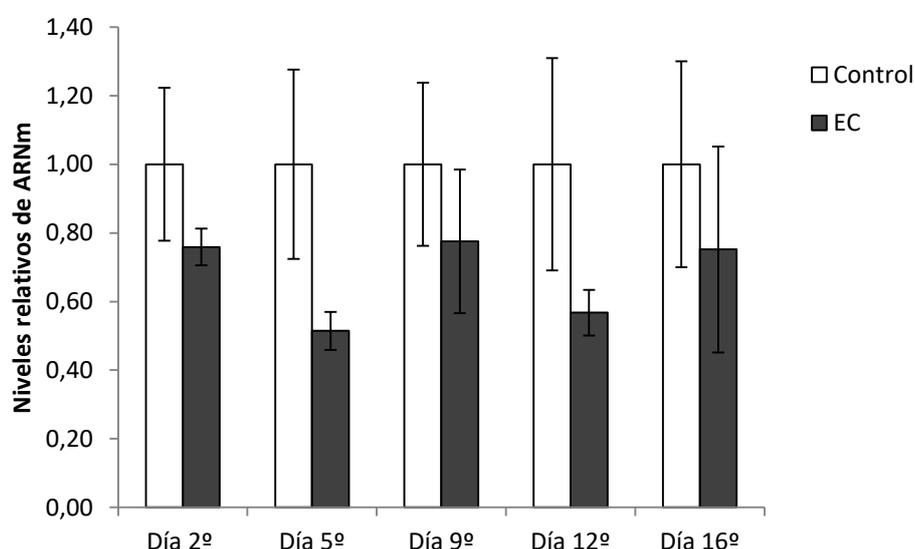


Figura IV.2.14. Efecto de EC sobre la expresión del gen *skn-1* en *C. elegans* N2 cultivados en ausencia (controles) y presencia de EC (200 μ M) y no sometidos a estrés. El nivel de expresión se determinó por RT-qPCR, empleando *act-1* como control interno. En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

Por último, se estudió la implicación del gen *daf-18*, que codifica una fosfatasa lipídica homóloga al supresor humano tumoral PTEN que contrarresta la actividad de AGE-1, de manera que regula negativamente la ruta IIS mediada por DAF-2 y AGE-1 y, por lo tanto, también desempeña un papel en metabolismo, desarrollo y longevidad (Ogg y Ruvkun, 1998). Además, la inhibición de DAF-2 por un incremento de la actividad DAF-18/PTEN produce translocación desde el citoplasma al núcleo y activación de factores de transcripción que contribuyen a la longevidad, la tolerancia al

estrés, la respuesta a bacterias patógenas y la supresión del plegamiento incorrecto de proteínas (Antebi, 2007). La expresión de *daf-18* fue también cuantificada en gusanos cultivados en presencia de EC tras ser o no sometidos a estrés térmico. En este caso no se encontró un aumento en los niveles de expresión del gen tras el tratamiento con EC en ninguno de los dos supuestos (Figura IV.2.12, A y B), a pesar de que en los estudios con mutantes no se había observado un aumento significativo de la resistencia a estrés térmico en los mutantes *daf-18* tratados con EC (Figura IV.2.11, D.1 y D.2), por lo que quizás la anulación de la mejora en la resistencia a estrés encontrada en los mutantes podría ser más un reflejo de la importancia de la implicación de la ruta de la insulina que la inducción de un aumento en la expresión de dicho gen, tal y como reflejan los resultados obtenidos por RT-qPCR.

En conjunto, estos resultados indican que la mejora en la resistencia al estrés producida por el tratamiento con EC implica la vía IIS, regulando la expresión de los genes *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *sgk-1*, *daf-2*, *skn-1*, *daf-18*, *daf-16*, *hsf-1* y *hsp-16.2* de manera independiente de la edad del gusano.

Un estudio en *C. elegans* tratado con preparaciones de cacao enriquecidas en flavonoides específicamente catequina, epicatequina y procianidinas mostró la producción de una mayor resistencia al estrés oxidativo y una mayor esperanza de vida (Martorell et al., 2011). Estos efectos eran explicados por los autores por una implicación de la ruta de señalización de insulina/IGF-1 y de las proteínas sirtuinas, concretamente SIR-2.1. En aproximaciones similares trabajando con ácido clorogénico, Zheng et al. (2017) encontraron que el tratamiento con este polifenol producía diferentes efectos relacionados con el envejecimiento, como un aumento en la longevidad y en la resistencia a estrés oxidativo y retraso de la disminución en el movimiento relacionada con la edad. Para estudiar los mecanismos moleculares implicados en estos efectos, estos autores recurrieron también a cepas mutantes y a la cuantificación de la expresión de genes, concluyendo que el tratamiento con ácido clorogénico activaba los factores de transcripción DAF-16, HSF-1, SKN-1 y HIF-1, aunque no SIR-2.1. Por el contrario, Saul et al. (2008) encontraron que el factor de transcripción DAF-16 no era esencial en los efectos de longevidad y en la resistencia al estrés observado tras tratamiento de *C. elegans* con quercetina. Posteriormente, el

mismo grupo de investigación demostró que el aumento de la longevidad asociado al tratamiento con quercetina no dependía de la restricción calórica ni de la sirtuina *sir-2.1*, sino que el mecanismo de acción estaba modulado por cuatro genes clave: *age-1*, *daf-2*, *unc-43* y *sek-1* (Pietsch et al., 2009). Estas observaciones sugieren que diferentes polifenoles podrían ejercer distintos mecanismos de acción en los efectos beneficiosos observados sobre longevidad y resistencia al estrés.

4.2.3.2 Cuantificación de la expresión génica mediante el uso de reporteros fluorescentes en estirpes transgénicas de *C. elegans*

Con el fin de complementar el estudio sobre los mecanismos moleculares implicados en la modulación de estrés y la longevidad por parte de los flavonoides, se estudió el efecto del tratamiento con EC en la expresión de genes específicos de respuesta al estrés celular *sod-3* (superóxido dismutasa), *gst-4* (glutación-S-transferasa), *hsp-16.2* y *hsp-70* (proteínas de choque térmico).

SOD-3 es una enzima antioxidante que protege del estrés oxidativo al catalizar la eliminación de superóxido. Se cree que el gen *sod-3* es una diana directa de DAF-16 ya que el promotor de *sod-3* contiene elementos de unión consenso DAF-16/FOXO (DAF-16 binding elements, DBEs) (Furuyama et al., 2000; Zhang et al., 2013). La enzima GST-4, por su parte, está involucrada en la respuesta de destoxificación de fase II, desempeñando un papel importante en la resistencia al estrés oxidativo, y su expresión está mediada por SKN-1 (Kahn et al., 2008). Las proteínas de choque térmico (HSP) se inducen en respuesta a estrés térmico y otros tipos de estreses ambientales. La expresión de los genes *hsp* está regulada principalmente por el factor de transcripción de choque térmico (HSF-1) que también está influenciado por la vía IIS en *C. elegans* (Koch et al., 2014). Hsu et al. (2003) proponen un mecanismo de acción en el que HSF-1 junto con DAF-16 activarían la expresión de diferentes genes, ya que HSF-1 y DAF-16 se unirían directamente a secuencias reguladoras de genes diana comunes, entre ellos las sHSP (proteínas de choque térmico pequeñas) y posiblemente en otros genes.

Con el fin de evaluar la expresión de *gst-4*, *sod-3*, *hsp-16.2* y *hsp-70*, se utilizaron gusanos de cepas transgénicas que expresan GFP bajo el control de los promotores de

gst-4, *sod-3*, *hsp-16.2* y *hsp-70*, que fueron cultivados en presencia o ausencia de 200 μ M de EC. Además, se utilizó una cepa transgénica que expresa una proteína de fusión DAF-16::GFP para examinar si el tratamiento con EC activaba la translocación nuclear de DAF-16 en condiciones normales y de estrés.

Las medidas de la fluorescencia se llevaron a cabo en gusanos cultivados en condiciones normales y posteriormente sometidos o no a un estrés térmico (35 °C, 1 h). Como se ha indicado en la sección de Materiales y Métodos, en cada caso los días del ensayo se definían cuando se observaba una intensidad más alta de fluorescencia después de realizar un seguimiento a lo largo de toda la vida del gusano en las diferentes cepas tratadas con el flavonoide. De esta manera, los reporteros de *gst-4* fueron evaluados a día 3 y los de *hsp-70* a día 5. En los casos en que no se apreciaba aumento de la fluorescencia a lo largo de la vida del gusano, se analizaron gusanos adultos jóvenes (día 2 de adulto) y adultos mayores (día 9 de adulto), así, las cepas reporteras de *hsp-16.2*, *sod-3* y DAF-16::GFP fueron analizadas los días 2 y 9 de adulto. En el caso de los reporteros de *hsp-16.2* y *hsp-70*, después de ser sometidos a estrés, los gusanos se dejaron recuperar a 20 °C durante 2 y 3 horas, respectivamente, antes de proceder a la toma de fotografías para cuantificar su fluorescencia. Sin embargo, tras los estudios previos con las cepas reporteras también se encontró que en algunas de ellas (*sod-3* y *gst-4*) no se observaba aumento de la fluorescencia en los gusanos control tras el choque térmico por lo que estas cepas reporteras solo fueron analizadas en gusanos no sometidos a estrés.

Los resultados mostraron que el tratamiento con EC (200 μ M) mejoraba significativamente el nivel de expresión de *gst-4*, *hsp-16.2* y *hsp-70*, mientras que no existían diferencias en la expresión de *sod-3* (Figura IV.2.15). Para simplificar la figura, en las cepas reporteras *gst-4* y *sod-3* se muestra la expresión de GFP en gusanos no sometidos a estrés, mientras que para *hsp-16.2* y *hsp-70* se recoge tras ser sometidos a choque térmico después del tiempo de recuperación. En estas dos últimas cepas reporteras, la fluorescencia difícilmente se detectaba antes de someter los nematodos a estrés térmico y no se observaron diferencias entre el control y los gusanos tratados con EC en condiciones normales de cultivo.

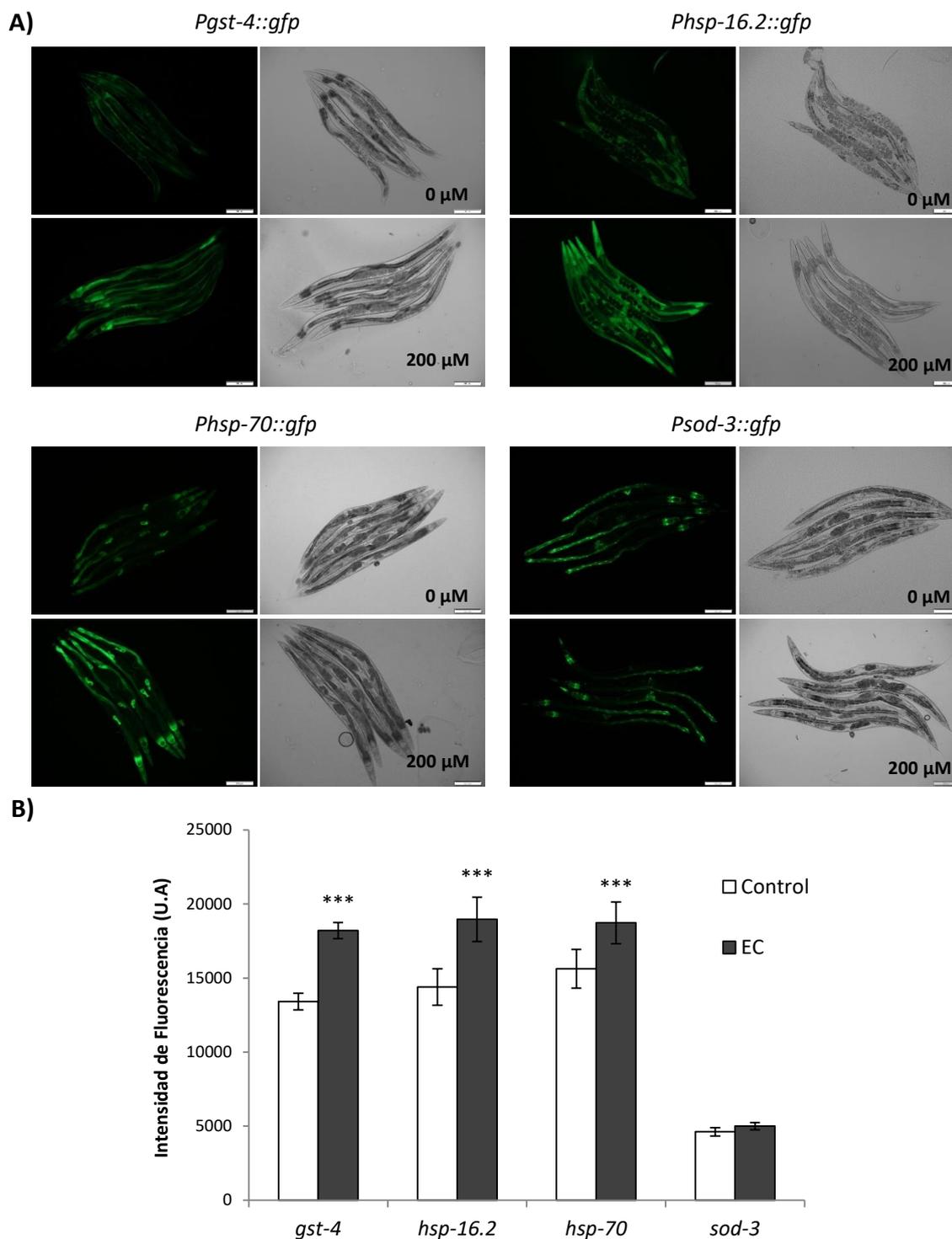


Figura IV.2.15. Efecto de EC sobre la expresión de *gst-4*, *hsp-16.2*, *hsp-70* y *sod-3* en *C. elegans*. (A) Imágenes de fluorescencia representativas de las cepas control y tratadas. (B) Intensidad de fluorescencia relativa en gusanos transgénicos. La fluorescencia se cuantificó utilizando el software Image J. Aproximadamente se examinaron 30 gusanos seleccionados aleatoriamente de cada experimento. Los experimentos se realizaron de forma independiente 3 veces. Los resultados representan la media \pm SEM. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) mediante ANOVA de un factor.

Con respecto a DAF-16, el tratamiento con EC no produjo una mayor translocación al núcleo de DAF-16::GFP con relación al control, ni en condiciones nativas ni tras someter los gusanos a estrés térmico (Figura IV.2.16). De todos modos, un breve estrés térmico (35 °C, 1h) en la cepa reportera DAF-16::GFP ya es suficiente para provocar la translocación de DAF-16 al núcleo, lo que dificulta la observación de posibles diferencias inducidas por el tratamiento con EC.

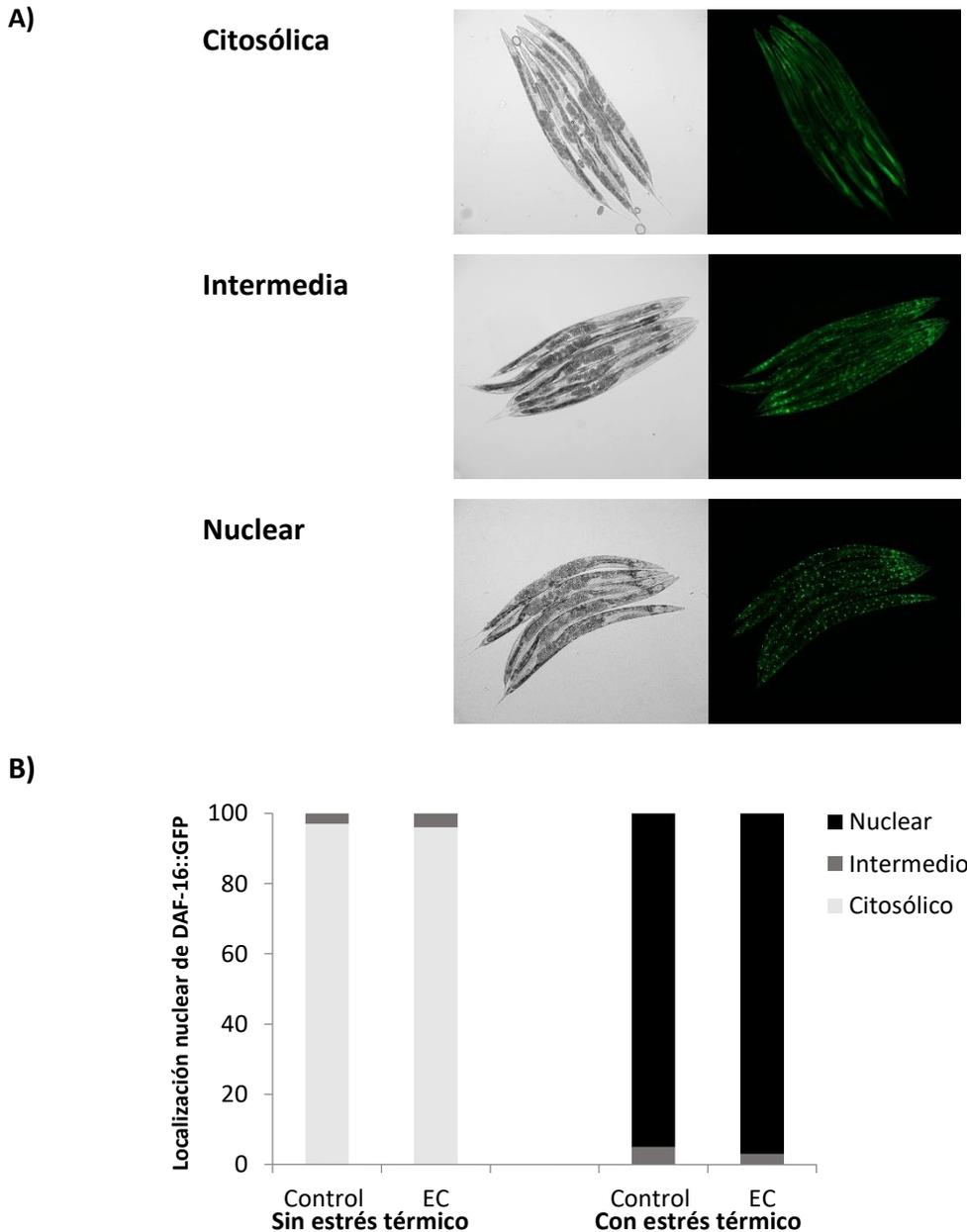


Figura IV.2.16. Efecto del tratamiento con EC en la localización nuclear de DAF-16::GFP en gusanos sometidos y no sometidos a estrés térmico (35 °C, 1 h). Los gusanos transgénicos que expresan la proteína de fusión DAF-16::GFP se cultivaron en ausencia (controles) y presencia de EC (200 µM) y se evaluaron el día 2 de adulto. La distribución subcelular de DAF-16::GFP fue clasificada como citosólica, intermedia y nuclear.

Como se discutió previamente, el tratamiento con EC no producía un aumento de la resistencia al estrés oxidativo en los nematodos mutantes *daf-16(mu86)*, aunque sí aumentaba la expresión de ARNm de *daf-16* en gusanos de tipo silvestre, sugiriendo que los efectos protectores de EC frente al estrés térmico eran dependientes de DAF-16. Por otro lado, el tratamiento con EC no incrementó la expresión *Psod-3::gfp*, una de sus dianas moleculares, resultado coherente con el obtenido en un estudio previo de nuestro grupo (González-Manzano et al., 2012), donde no se encontró aumento en la actividad de SOD tras el tratamiento de los gusanos con EC.

Bonomo et al. (2014) obtuvieron resultados similares en gusanos tratados con un extracto rico en polifenoles de Açai (*Euterpe oleracea*), ya que no observaron un aumento de la resistencia a estrés oxidativo en gusanos mutantes *daf-16(mu86)*, así como tampoco un aumento de la localización nuclear de DAF-16 tras el estrés respecto al control, ni en la expresión de *sod-3* en ausencia de estrés. Según esos autores, esto podría explicarse porque el extracto de polifenoles conduciría a un aumento en la actividad transcripcional de la proteína DAF-16 pero no en su concentración, de modo que la activación de DAF-16 en el núcleo conduciría a la regulación de genes específicos distintos de *sod-3*. De hecho, también observaron que el extracto aumentaba la expresión de los genes *ctl-1* (que codifica a una catalasa) y *gst-7* de manera dependiente de DAF-16. Similarmente, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con EC produce un efecto más importante en otros genes diana de DAF-16, como *hsp-16.2* y *hsp-70* que codifican proteínas de choque térmico. Se debe señalar que hay múltiples rutas y proteínas que influyen en la actividad transcripcional de DAF-16 (Oh et al., 2005; Lehtinen et al., 2006; Uno y Nishida, 2016) y que, por tanto, también pueden contribuir a la selección de genes activados por DAF-16 que median la longevidad y la resistencia a diferentes tipos de estrés.

La expresión de GFP en algunas de las cepas reporteras *Phsp-16.2::gfp*, *Psod-3::gfp* y *Pdaf-16::daf-16::gfp* también fue estudiada en gusanos más viejos (noveno día de edad adulta), para establecer si el modo de acción de EC podía ser diferente dependiendo de la edad del gusano. Los resultados obtenidos fueron similares a los resultados de los gusanos más jóvenes, sin diferencias en la translocación nuclear de DAF-16 (Figura IV.2.17) y en la expresión de *sod-3* entre el control y los gusanos

tratados con EC (Figura IV.2.18). Sin embargo, el aumento en la expresión de *hsp-16.2* producido por el tratamiento con EC en condiciones de estrés fue más acentuado en los gusanos más viejos (Figura IV.2.18) que en los evaluados en el 2º día de adulto (Figura IV.2.15). Concretamente, comparando el incremento producido en la expresión de *hsp-16.2* por el tratamiento con EC respecto al control, se observa un porcentaje de aumento respecto al control de un 31,73 % a día 2, mientras que es de un 45,81 % a día 9. Esta observación es relevante, porque los gusanos envejecidos presentan menores niveles de HSP lo que disminuye la protección frente a las proteínas mal plegadas, por lo que los gusanos se vuelven más sensibles al estrés, lo que produce finalmente una mayor mortalidad (Abbas y Wink et al., 2010).

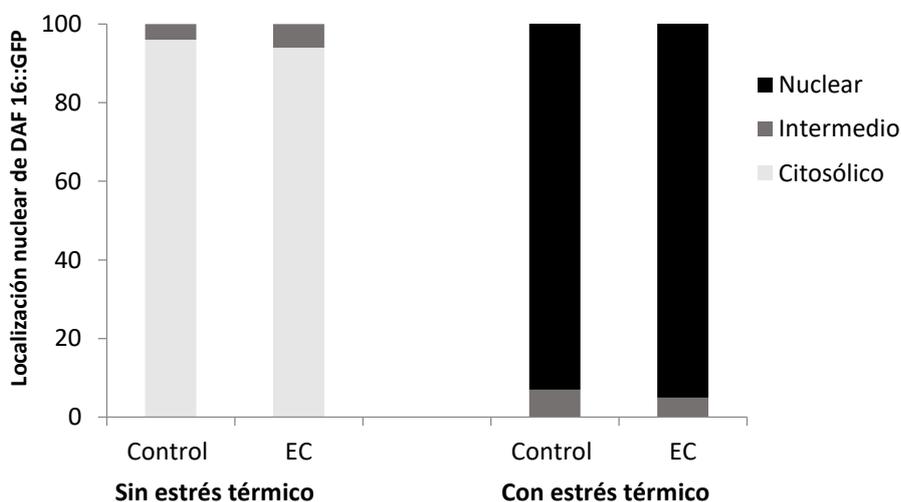


Figura IV.2.17. Efecto del tratamiento con EC en la localización nuclear de DAF-16::GFP gusanos sometidos y no sometidos a estrés térmico (35 °C, 1 h). Los gusanos transgénicos que expresan la proteína de fusión DAF-16::GFP se cultivaron en ausencia (controles) y presencia de EC (200 µM) y se evaluaron el día 9 de adulto. La distribución subcelular de DAF-16::GFP fue clasificada como citosólica, intermedia y nuclear.

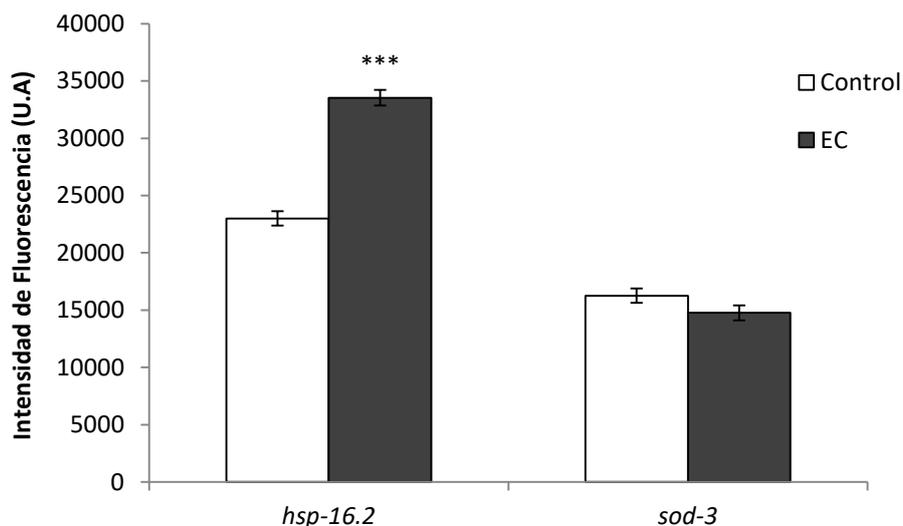


Figura IV.2.18. Efecto de EC sobre la expresión de *sod-3* y *hsp-16.2* en *C. elegans* en gusanos de avanzada edad (día 9 de adulto). Los gusanos transgénicos se cultivaron en ausencia (controles) y presencia de EC (200 μ M). La fluorescencia se cuantificó utilizando el software Image J. Aproximadamente se examinaron 30 gusanos seleccionados aleatoriamente de cada experimento. Los experimentos se realizaron de forma independiente 3 veces. Los resultados representan la media \pm SEM. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) mediante ANOVA de un factor.

Con todo, los resultados de este trabajo muestran un aumento significativo de la expresión de *gst-4*, la pérdida de resistencia a estrés térmico en el mutante *skn-1(zu67)* y el aumento de la expresión de *skn-1* en gusanos tratados con EC, lo que parece indicar que EC podría estar modulando la ruta SKN-1/ Nrf2. El factor de transcripción SKN-1, ortólogo de la proteína Nrf de mamíferos, induce la expresión de enzimas detoxificantes de fase II y proteínas antioxidantes, como SOD, GST, GPx o NAD(P)H-quinona oxidoreductasa (NQO-1) y glutatión (Tullet et al., 2008; Koch et al., 2014). El control de su expresión se produce gracias a que todos los genes que codifican estas enzimas de fase II y componentes antioxidantes presentan en su región promotora una región específica de unión denominada “elementos de respuesta antioxidante” (ARE). Varios genes que contienen ARE se han propuesto como dianas moleculares de SKN-1, entre ellos *gst-4* que actúa conjugando la forma reducida de glutatión (GSH) a una variedad de sustratos tóxicos, incluidos lípidos y proteínas dañados, disminuyendo así su actividad y haciéndolos más solubles en agua favoreciendo su eliminación (Kahn et al., 2008; Van Raamsdonk y Hekimi, 2010).

El aumento de la actividad de SKN-1 podría explicar la disminución de los productos de peroxidación lipídica y proteínas carboniladas en gusanos tratados con EC respecto a no tratados. En un estudio previo, nuestro grupo de investigación también demostró que el tratamiento con EC producía un aumento significativo en los niveles de GSH en *C. elegans* con respecto a los gusanos no tratados (González-Manzano et al., 2012). Resultados similares fueron encontrados en ensayos llevados a cabo en astrocitos (Bahia et al., 2008) y células HepG2 (Granado-Serrano et al., 2010), donde el tratamiento con EC produjo la activación de Nrf2 y aumentó los niveles de GSH.

Además, también es conocido que la ruta Nrf2-ARE se activa por especies reactivas de oxígeno (Chen et al., 2014; Miranda-Vizueté y Veal, 2017), por lo tanto, el aumento moderado de los niveles de ROS observados en los gusanos tratados con EC (Figuras IV.2.3 y IV.2.4) podría conducir a la activación de esta ruta, induciendo finalmente la protección antioxidante endógena y confiriendo una gran protección contra el daño oxidativo.

Recientemente se ha propuesto que los efectos de SKN-1 sobre la resistencia al estrés oxidativo y la longevidad pueden estar disociados (es decir, que SKN-1 promueve la longevidad por un mecanismo diferente a la protección frente al daño oxidativo). Además, también se ha establecido que la expresión de *skn-1* puede ser activada por el factor de transcripción DAF-16/FOXO. Concretamente, SKN-1 sería necesario en la resistencia al estrés oxidativo, pero no para aumentar la longevidad como resultado de la sobreexpresión de *daf-16*. Además, la sobreexpresión de *daf-16* rescata la corta vida de los mutantes *skn-1* pero no su hipersensibilidad al estrés oxidativo (Tullet et al., 2008 y 2017). Esta doble función podría explicar los efectos de la EC observados en este trabajo en *C. elegans*, donde los gusanos tratados con este flavanoide mostraban mayor resistencia al estrés térmico, pero no un aumento en su vida media, indicando quizá que la mayor expresión de *daf-16* pueda conducir a una activación de *skn-1* y de sus genes diana.

Por otra parte, los altos niveles de HSP promueven la longevidad y están relacionados con la capacidad de soportar el estrés térmico (Rea et al., 2005; Zhang et al., 2009). Hsu et al. (2003) sugirieron que HSF-1 y DAF-16 activan juntos la expresión

de genes específicos, incluidos los genes que codifican HSP, que a su vez promueven la longevidad. Las HSP actúan como chaperonas y proteasas moleculares previniendo la acumulación de proteínas agregadas en respuesta al estrés térmico y otros tipos de estrés. Esta actividad puede evitar que las proteínas oxidadas o dañadas se agreguen antes de que puedan replegarse o degradarse (Hsu et al., 2003). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que EC regula positivamente la expresión de *hsp-16.2* y *hsp-70* en *C. elegans*, lo que podría explicar el aumento significativo en la vida máxima y de la supervivencia de *C. elegans* frente a estrés térmico inducido por el tratamiento con el flavonoide. Otros autores también han relacionado el aumento de la longevidad y de la resistencia al estrés térmico en *C. elegans* provocadas por el tratamiento con diferentes polifenoles con la capacidad de regular positivamente *hsp* y otros genes asociados a la resistencia al estrés (Zhang et al., 2009; Upadhyay et al., 2013; Asthana et al., 2016).

4.2.4 Comentarios finales

A la vista de los resultados obtenidos, parece que el tratamiento de *C. elegans* con EC conduce a un efecto protector frente al daño oxidativo, como se reflejaba en una mayor supervivencia del gusano en condiciones de estrés y un descenso de los biomarcadores de productos de peroxidación lipídica y la carbonilación de proteínas. Los mecanismos moleculares por los que los diferentes flavonoides ejercen sus efectos beneficiosos siguen sin esclarecerse, sin embargo, los resultados aquí obtenidos parecen apuntar que el tratamiento con EC produce una elevación moderada de los niveles de ROS que podría conducir a una respuesta compensatoria aumentando los mecanismos de protección endógenos, como por ejemplo la ruta SKN-1/Nrf-2, que darían como resultado una mayor resistencia al estrés oxidativo y un aumento de la vida máxima.

Además, los ensayos de resistencia a estrés oxidativo inducido térmicamente con varios mutantes relevantes de la ruta IIS mostraron que el fenotipo termorresistente que les proporcionaba el tratamiento con EC no se encontraba en los mutantes *daf-2*, *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *sgk-1*, *daf-16*, *daf-18*, *skn-1* y *hsf-1*, por lo que los efectos beneficiosos observados tras el tratamiento con EC parecen estar mediados por la

regulación de la ruta de señalización de la insulina/IGF-1, donde DAF-16 actúa como un regulador central y que junto con los factores de transcripción HSF-1 y SKN-1 regularían la expresión de una amplia variedad de genes con diversas funciones que actúan en la respuesta al estrés y en la modulación de la duración de la vida. En concreto, el tratamiento con EC produjo un aumento de la regulación de enzimas de detoxificación de fase II (GST-4) y de la expresión de chaperonas (HSP-16.2 y HSP-70) que mejorarían la capacidad para degradar las proteínas dañadas.

Por último, basándonos en los datos de este estudio, el mecanismo de acción implicado en el tratamiento con EC no parece verse modificado por la edad del gusano, si bien es cierto que a la vista de los efectos beneficiosos en gusanos envejecidos puede concluirse que la exposición crónica a EC confiere protección frente a daño oxidativo, todavía observable en gusanos de mayor edad. Sí es relevante el acentuado aumento observado en la expresión de HSP-16.2 en gusanos envejecidos respecto a los más jóvenes, ya que las HSP disminuyen en condiciones fisiológicas a causa del envejecimiento, lo que hace que los gusanos sean más sensibles al estrés y experimenten una mayor mortalidad con la edad.

4.3 Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos biológicos de quercetina

4.3.1 Introducción

Quercetina (Q) es el flavonol más abundante de la dieta humana ya que se encuentra en una amplia variedad de plantas cultivadas y alimentos derivados, como nueces, uvas, cebollas, brócoli, manzanas y té negro. En verduras se encuentran por debajo de 10 mg/kg, pero alcanza hasta 40 mg/kg en judías y manzanas y hasta 100 mg/kg en cebollas (Boots et al., 2008). El consumo de Q en la dieta se ha asociado con la protección frente diversas enfermedades, incluidas patologías cardiovasculares, cáncer y trastornos neurodegenerativos, y se le atribuyen características beneficiosas, como actividad antioxidante, efectos antiinflamatorios y protección frente al envejecimiento (Kaliora y Dedoussis, 2007; Boots et al., 2008; Darband et al., 2018). Dichas acciones han sido explicadas, al menos en parte, por sus efectos antioxidantes y por sus propiedades de captación de radicales libres (Cos et al., 1998; Middleton et al., 2000), aunque los mecanismos precisos a través de los cuales la quercetina y otros flavonoides ejercen su actividad biológica todavía están bajo discusión. Por ello, es importante entender los mecanismos moleculares por los que Q puede ejercer sus efectos, con el fin de desarrollar estrategias para modular los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento y degeneraciones que conducen a enfermedades crónicas.

Aunque en los últimos años han aumentado los estudios de Q en modelos *in vivo*, la mayoría del conocimiento de flavonoides ha sido originado en estudios *in vitro*, mientras que los datos en los que se tiene en cuenta la interacción compleja de diversos procesos como la absorción, metabolismo e interacción en órganos y tejidos son más limitados (Williamson y Manach, 2005). La implicación de algunas rutas clave, con relevancia en mamíferos, se ha explorado empleando el organismo modelo *C. elegans*, ya que aunque nematodos y humanos están separados por casi mil millones de años de evolución, se ha identificado que entre el 60-80 % de genes en *C. elegans* son homólogos de genes humanos, y muchos procesos biológicos, entre los que se incluyen apoptosis, señalización celular, ciclo celular, polaridad celular, metabolismo o envejecimiento, están conservados entre *C. elegans* y mamíferos

(Kyriakakis et al., 2015). Realmente *C. elegans* ofrece prometedoras posibilidades para estudiar los efectos y mecanismos de acción de compuestos secundarios de alimentos y plantas, como los flavonoides, debido a su sencillez de manejo, conservación de vías metabólicas y la posibilidad de manipular las rutas de señalización celular por métodos biotecnológicos.

En estudios previos de nuestro grupo de investigación (Surco-Laos et al., 2011) se investigaron los efectos de Q y sus metabolitos metilados isoramnetina (3'-O-metilquercetina) y tamarixetina (4'-O-metilquercetina) sobre las características fenotípicas, resistencia al estrés oxidativo y térmico y longevidad en *C. elegans*, crecidos en presencia de concentraciones de 200 μ M de los flavonoles en el medio de cultivo. Los tres compuestos estudiados aumentaban significativamente la resistencia al estrés térmico (35 °C, 8h), ejercido en los días 1 y 6 de adulto, aunque con distinto resultado según el flavonol considerado. Así, Q era el compuesto que mostraba mayor efecto protector en el primer día adulto (aumento en la tasa de supervivencia de un 17 % respecto al control), mientras que tamarixetina lo era en el 6° día (aumento del 39 %). En todo caso, para todos los flavonoles estudiados el efecto protector siempre era mayor en los gusanos sometidos a estrés en el 6° día de adulto que en los sometidos el primer día; en definitiva, en los expuestos durante más tiempo a los compuestos. En ensayos de estrés oxidativo inducido químicamente con juglona (150 μ M, 24h), un prooxidante capaz de convertir el oxígeno al anión radical superóxido, era Q el flavonol que producía mayor protección en los dos estados de desarrollo, elevando la tasa de supervivencia en un 12 % y un 15 % con relación al control, el primer y 6° día de adulto, respectivamente (Surco-Laos et al., 2011). Con el objeto de confirmar si los flavonoles ensayados modificaban el estatus oxidativo de *C. elegans*, se realizaron también análisis empleando el test OxyBlot, que evalúa la oxidación de proteínas mediante inmunodetección de los grupos carbonilos. Los resultados mostraron una disminución de la oxidación de proteínas en los animales tratados con los flavonoles respecto a los no tratados, especialmente marcada en el caso del tratamiento con Q. En cuanto a características fenotípicas, Q era el único flavonol que inducía algunos cambios, aumentando significativamente la longitud del gusano un 11 % y la capacidad reproductiva un 9 %. Por último, en estudios de longevidad todos los tratamientos

aumentaban significativamente ($p < 0,05$) la vida media y máxima (calculada como la duración de vida del 10 % de la población más longeva) de los gusanos (Figura IV.3.1). En este caso el flavonol que aportaba una mayor extensión media y máxima de la vida era isoramnetina, con aproximadamente un 16 % de extensión de la vida media respecto al control, mientras que Q alargaba la vida media alrededor de un 11 % (Surco-Laos et al., 2011).

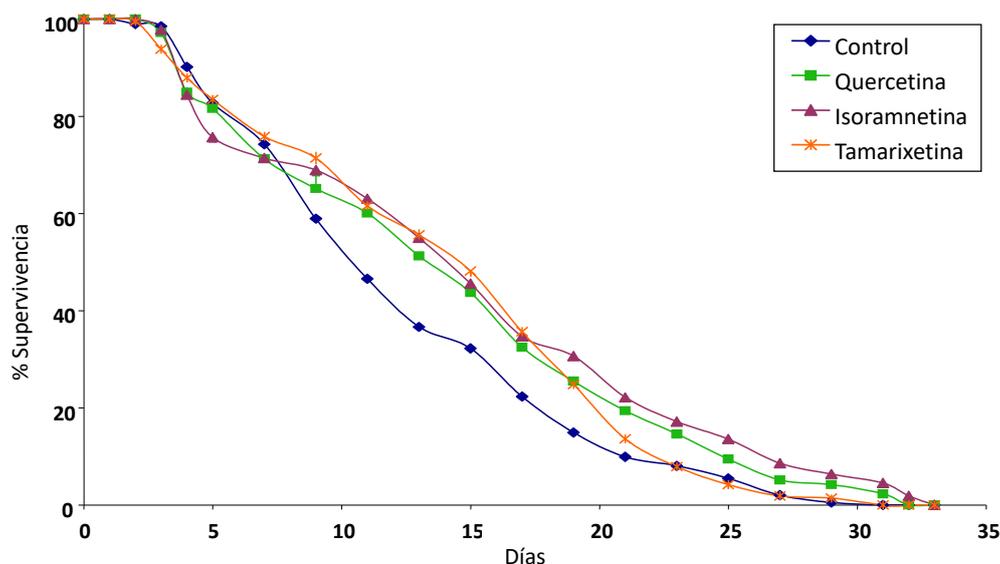


Figura IV.3.1. Curvas de supervivencia de *C. elegans* cultivados en presencia y ausencia (control) de flavonoles. Fuente: Adaptada de Surco-Laos et al. (2011).

Estos estudios demostraban que la Q posee una actividad biológica relevante en un sistema *in vivo*, que redundaba en una mayor protección frente a procesos oxidativos y mejora su tasa de supervivencia, tanto en condiciones normales de desarrollo como de estrés. Resultados similares con relación a los efectos de Q fueron también obtenidos por otros autores (Kampkötter et al., 2008; Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009; Xue et al., 2011; Grünz et al., 2012; Dueñas et al., 2013). En todos los casos se encontraba un aumento de la vida media del gusano cultivado en presencia de concentraciones de Q entre 70 y 200 μM . Sin embargo, Pietsch et al. (2011) no observaban efectos en la extensión de la vida para concentraciones fuera de ese intervalo, tanto inferiores (50 μM) como superiores (250 μM). El tratamiento con Q también conducía a una mejora en la resistencia al estrés térmico y oxidativo inducido por juglona o paraquat, así como a una reducción de los niveles intracelulares de ROS, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés térmico (Kampkötter et

al., 2007b; Pietsch et al., 2009 y 2011; Grünz et al., 2012). No obstante, los mecanismos moleculares a través de los que producen estos efectos siguen sin esclarecerse y, de hecho, las conclusiones al respecto obtenidas por distintos autores (Kampkötter et al., 2007b y 2008; Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009; Xue et al., 2011; Grünz et al., 2012) son diferentes e incluso, en ocasiones, aparentemente contradictorias, como luego se comentará en la discusión.

Con el fin de contribuir a esclarecer los mecanismos de acción implicados en los efectos de los flavonoles, en esta tesis se ha estudiado su influencia sobre la ruta de la insulina (IIS), ya que controla muchos procesos biológicos importantes, entre los que se incluyen desarrollo, reproducción, metabolismo, mantenimiento somático y resistencia a estrés (Lapierre et al., 2012). Concretamente se ha evaluado la influencia sobre la resistencia al estrés inducido térmicamente empleando los mutantes principales de la ruta de la insulina (*daf-2*, *age-1*, *daf-16*, *akt-1*, *akt-2*; *sgk-1*, *hsf-1*, *skn-1* y *daf-18*). Además, se ha estudiado la expresión de algunos genes relacionados con resistencia al estrés, como *daf-16*, *skn-1*, *hsf-1*, *hsp-16.2*, *hsp-70*, *sod-3* y *gst-4*, mediante RT-qPCR o empleando reporteros fluorescentes en estirpes transgénicas de *C. elegans*.

4.3.2. Influencia de quercetina en genes relacionados con resistencia al estrés y de la ruta de la insulina. Ensayos con mutantes y cuantificación de la expresión de ARNm mediante RT-qPCR

En *C. elegans* la repuesta a estrés oxidativo está regulada a través de varias rutas, entre las que se incluyen las de la insulina/IGF-1 (IIS), JNK (quinasas c-Jun N-terminal), y la ruta de señalización p38 MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) (Oh et al., 2005; Troemel et al., 2006; Altintas et al., 2016). Por otra parte, algunos autores han observado que los flavonoides pueden ejercer acciones moduladoras en sistemas celulares actuando directamente sobre varias rutas de señalización y modular la expresión de distintos genes a través de la activación de varios factores de transcripción (Mansuri et al., 2014). Teniendo en cuenta estos antecedentes y las observaciones previas realizadas por nuestro grupo acerca de los efectos de Q sobre longevidad y protección frente al daño oxidativo en *C. elegans* (Surco-Laos et al.,

2011), en esta tesis doctoral se ha procedido a evaluar la posible implicación en estos procesos de genes seleccionados relacionados con respuesta a estrés o envejecimiento, principalmente de la ruta de señalización de la insulina/IGF-1 (IIS). Inicialmente se plantearon ensayos en cepas mutantes con pérdida de función de diversos genes relevantes de la ruta IIS, con el objeto de determinar si la quercetina podía aumentar en los mismos la resistencia a estrés oxidativo. Los ensayos se realizaron aplicando un choque térmico (35 °C, 4-8 h) en dos momentos diferentes de la vida del nematodo, concretamente en los días 2 y 9 de adulto, para establecer si podían existir diferentes modos de actuación según el estado desarrollo del gusano. Todos los ensayos se llevaron a cabo simultáneamente en gusanos mutantes cultivados en presencia de Q (200 µM en 0,1 % de DMSO) y no tratados (0,1 % de DMSO, control), así como en la cepa silvestre N2 sin tratamiento (0,1 % de DMSO, control N2). Para simplificar la observación de los resultados, los datos del control N2 no se recogen en las gráficas, pero fueron de utilidad como control metodológico del experimento. Además, se cuantificó la expresión de algunos de estos genes mediante RT-qPCR en gusanos de la cepa silvestre tratados con Q, en condiciones normales de crecimiento y tras someterlos a estrés térmico (5 h, 35 °C).

Inicialmente, se investigó el efecto de Q en los componentes activadores de la ruta IIS (marcados en rojo en la Figura II.16). Concretamente, se evaluó el efecto sobre la resistencia al estrés térmico en los mutantes con pérdida de función *age-1(hx546)*, *akt-1(mg306)*, *daf-2(e1370)* y el doble mutante *akt-2(tm812);sgk-1(ft15)*, todos ellos de vida larga y que presentan mayor resistencia al estrés que la cepa silvestre. Los resultados obtenidos mostraron que en todos estos mutantes no se producía un aumento en la resistencia al estrés tras tratamiento con quercetina (Figura IV.3.2). Además, al igual que a día 2, tampoco se observó una mejora de la resistencia en los mutantes tratados con Q cuando el estrés térmico era aplicado en el día 9 (comparar A.1-A.2, B.1-B.2, C.1-C.2, D.1-D.2 en Figura IV.3.2). Estos resultados sugieren que *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *sgk-1* y *daf-2* son necesarios para mediar la resistencia a estrés inducida por Q en *C. elegans*. Al igual que ocurría con los resultados encontrados en gusanos tratados con EC, la pregunta era si el hecho de trabajar con mutantes longevos y con mecanismos de estrés robustos podría estar enmascarando el posible efecto de Q, ya

que estos mutantes presentan de por sí longevidad y resistencia al estrés superiores a las de la población silvestre. Sin embargo, en la bibliografía se encuentran estudios donde diferentes compuestos siguen produciendo un aumento en la resistencia al estrés o la duración de vida en gusanos longevos mutantes de la ruta IIS. Por ejemplo, Yu et al. (2014) observaron que el tratamiento con 20 μ M de curcumina producía un aumento significativo en la supervivencia de mutantes *daf-2* en ensayos de resistencia a estrés oxidativo inducido con juglona. Igualmente, Pietsch et al. (2011) encontraron que el tratamiento con 300 μ M de ácido cafeico inducía un aumento significativo de la longevidad en los mutantes *age-1* y *daf-2*.

Los efectos del tratamiento con Q también fueron estudiados en algunos de estos mutantes por Pietsch et al. (2009). Coincidiendo con nuestros resultados, esos autores observaron que el tratamiento con Q 200 μ M requería de *daf-2* y *age-1* para mediar la longevidad y la resistencia al estrés, ya que no encontraban una mejora en la supervivencia frente a estrés térmico ni un aumento en la vida media de esos mutantes al ser tratados con el flavonol. Además, estudiaron el efecto de Q en el mutante *akt-2*, encontrando que Q producía un aumento en la vida media de dicho mutante. Este resultado parecía difícilmente explicable, ya que *akt-2* se encuentra regulado por DAF-2 y AGE-1 en la ruta IIS. Sin embargo, los autores proponían como posible explicación que SGK-1 es un factor de control crítico en la respuesta al estrés y en longevidad controlado por la ruta IIS más que por el complejo AKT/PKB y que, mientras SGK-1 es mediador en la respuesta al estrés, AKT/PKB sería más importante para la formación de larvas *dauer*. Como se ha comentado anteriormente y se puede ver en la Figura IV.3.2, en el presente estudio se ha encontrado que trabajando con el doble mutante *akt-2;sgk-1* no se producía un aumento de supervivencia en gusanos estresados térmicamente tratados con el flavonol, lo que apoyaría la propuesta de Pietsch et al. (2009). Además, en nuestro estudio también se trabajó con mutantes *akt-1*, gen que codifica un ortólogo de la quinasa serina/treonina AKT/PKB e interactúa con la ruta IIS, para el que tampoco se encontró aumento en la supervivencia de dichos mutantes tras ser tratados con Q. Estos resultados indicaban que esta quinasa también es necesaria para el aumento inducido por el tratamiento con Q en la resistencia a estrés oxidativo en *C. elegans*.

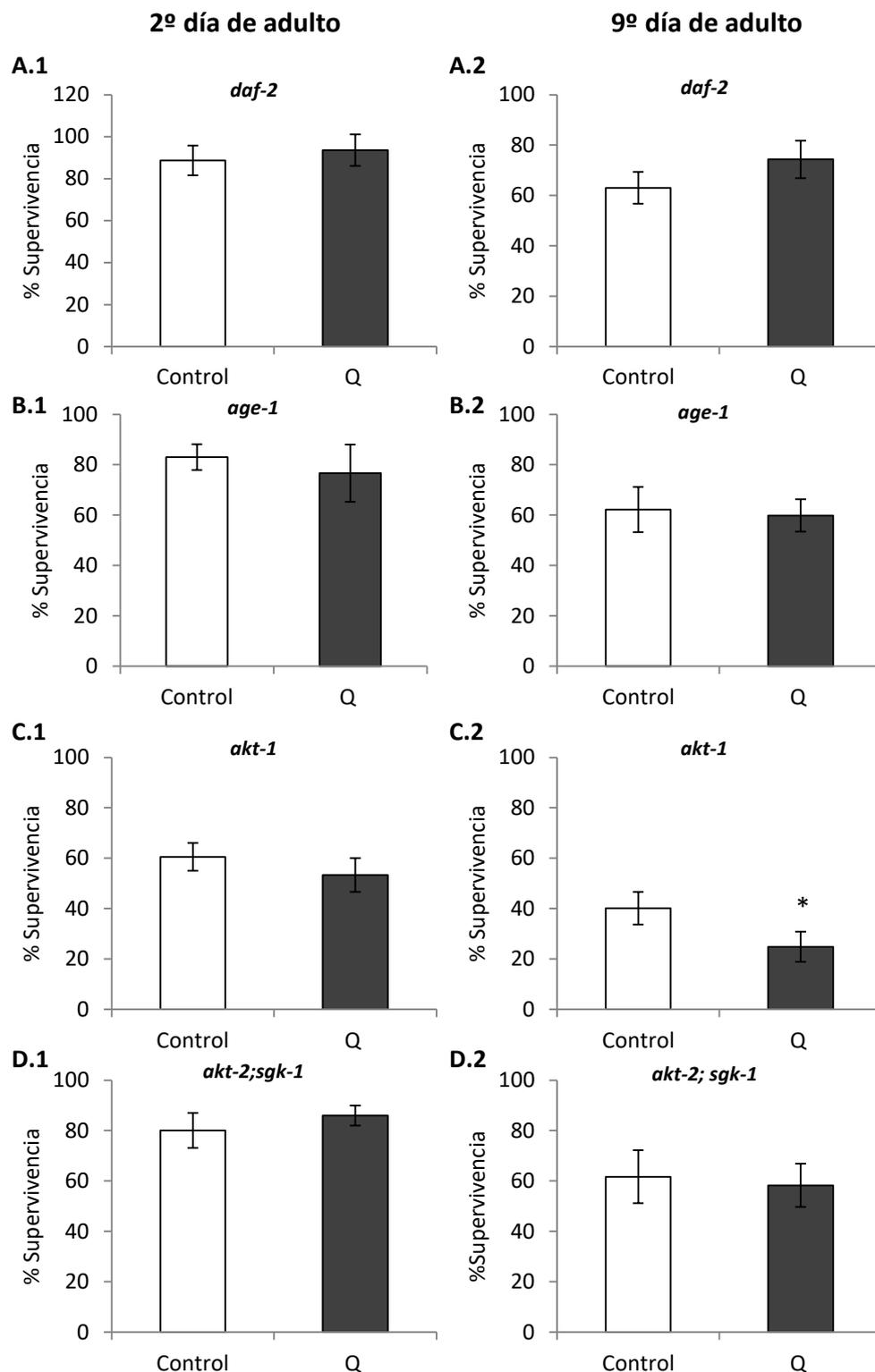


Figura IV.3.2. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 8 h) los días 2 y 9 de adulto en diferentes cepas mutantes de vida larga de la ruta de la insulina: *daf-2(e1370)*, *age-1(hx546)*, *akt-1(mg306)* y *akt-2(tm812);sgk-1(ft15)* cultivadas en ausencia (controles) y en presencia de quercetina (200 μ M). En cada caso, se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SD. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0.05$).

Se estudió también la posible influencia en los efectos de Q de los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1, que producen cambios en la expresión de genes en respuesta a una inhibición de la ruta IIS. Los genes regulados por estos factores de transcripción son funcionalmente significativos, incluyendo genes de respuesta a estrés, como catalasas, glutatión-S-transferasas y metalotioneínas, y genes que codifican péptidos antimicrobianos, chaperonas, apolipoproteínas y lipasas (Kenyon, 2010). Concretamente se evaluó la resistencia a estrés térmico en los mutantes con pérdida de función de *daf-16(mu8)*, *hsf-1(sy441)*, *skn-(zu67)* y *daf-18(e1375)*. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura IV.3.3. Se observó que el tratamiento con Q no mejoraba la supervivencia de los mutantes de *daf-18* y *skn-1*, lo que sugiere que estos genes serían necesarios para explicar el aumento de la supervivencia en gusanos tratados con Q expuestos a estrés térmico. Sin embargo, el tratamiento con Q seguía produciendo una mejora en la resistencia al estrés térmico en los mutantes *daf-16* y *hsf-1*, indicando que el efecto de Q en *C. elegans* es independiente de los genes *daf-16* y *hsf-1*. Además, en la Figura IV.3.3 también se puede observar que la influencia de Q en los mutantes estudiados fue similar en adultos jóvenes y mayores (comparar A.1-A.2, B.1-B.2, C.1-C.2, D.1-D.2).

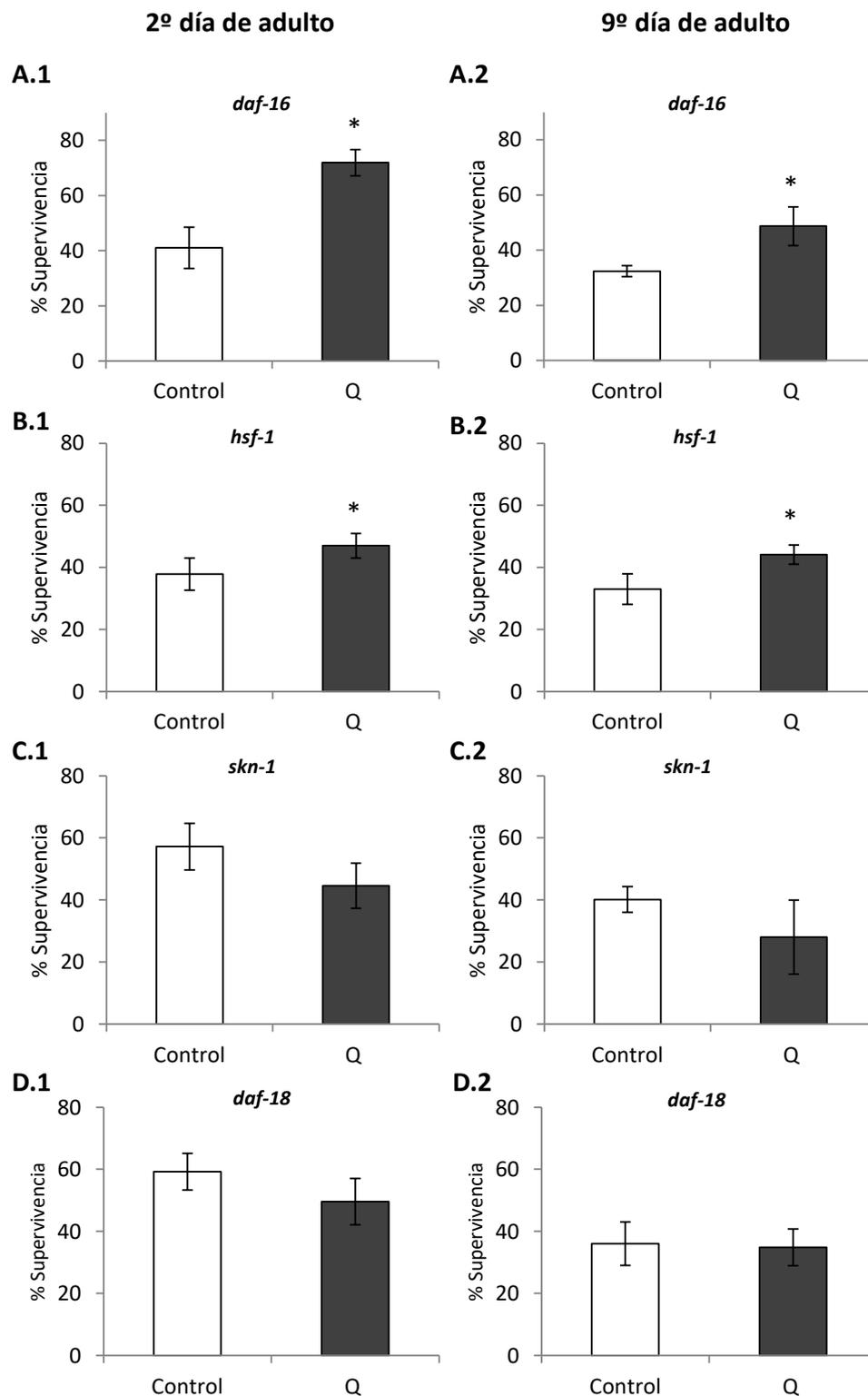


Figura IV.3.3. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 6 h) los días 2 y 9 de adulto en diferentes cepas mutantes: *daf-16(mu86)*, *hsf-1(sy441)*, *skn-1(zu67)* y *daf-18(e1375)*, cultivadas en ausencia (controles) y en presencia de Q (200 μM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados representan la media ± SD. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0.05$).

Como se indicó anteriormente, el factor de transcripción DAF-16/FOXO de la ruta de la insulina, considerado un regulador clave de diferentes procesos biológicos, no parece mediar los efectos inducidos por el tratamiento con Q con relación a resistencia a estrés térmico en *C. elegans*, ya que los mutantes *daf-16(mu8)* siguen mostrando un aumento de la resistencia a estrés térmico tanto a día 2 como a día 9 de adulto (Figura IV.3.3, A.1 y A.2). Con el fin de confirmar este supuesto, se llevaron a cabo estudios de expresión de *daf-16* mediante RT-qPCR en gusanos de la cepa silvestre N2 sometidos y no sometidos a estrés. Los resultados mostraron que el tratamiento con Q no producía un cambio en la expresión de *daf-6* sino incluso, si acaso, un descenso no significativo en su expresión en los gusanos estresados (Figura IV.3.4, A y B). Estos resultados junto a los obtenidos en los mutantes parecen confirmar que los efectos de Q sobre la resistencia a estrés serían independientes de *daf-16*.

Otros autores también han estudiado el efecto de Q en gusanos mutantes *daf-16* (Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009; Grünz et al., 2012), observando, en consonancia con nuestros resultados, que los gusanos mutantes tratados con Q seguían mostrando una mejora en la resistencia a estrés térmico (Saul et al., 2008). Además, estos autores comprobaron que en los mismos la Q también seguía produciendo un aumento de la longevidad y en la resistencia a estrés oxidativo inducido mediante peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos por Saul et al. (2008), Pietsch et al. (2009) y Grünz et al. (2012) en estudios de longevidad, realizados en condiciones normales de cultivo, apoyarían los resultados aquí obtenidos en los análisis de RT-qPCR, donde no se observa un aumento de la expresión de *daf-16* en condiciones normales de desarrollo. Por lo tanto, nuestros datos, apoyados por los de otros autores, parecen confirmar que DAF-16 no es imprescindible en los efectos de Q, ni en condiciones normales de crecimiento ni cuando los gusanos son sometidos a algún tipo de estrés.

En esta Tesis también se estudió la influencia del tratamiento con Q sobre el factor de transcripción de choque térmico de *C. elegans*, HSF-1. Para ello se cuantificó la expresión de *hsf-1* mediante RT-qPCR en gusanos N2 cultivados en presencia de Q, en condiciones normales de crecimiento y tras someterlos a estrés térmico. En la Figura IV.3.4, A y B se puede observar que el tratamiento con Q no modificó la expresión de *hsf-1* ni en ausencia ni en presencia de estrés térmico (35 °C, 5 h). Estos

resultados apoyan los obtenidos en los estudios con mutantes, donde la Q seguía aumentando la supervivencia en las cepas de gusanos que carecían de función del *hsf-1* (Figura IV.3.3, B.1 y B.2), confirmando que los efectos de Q también parecen ser independientes de este gen.

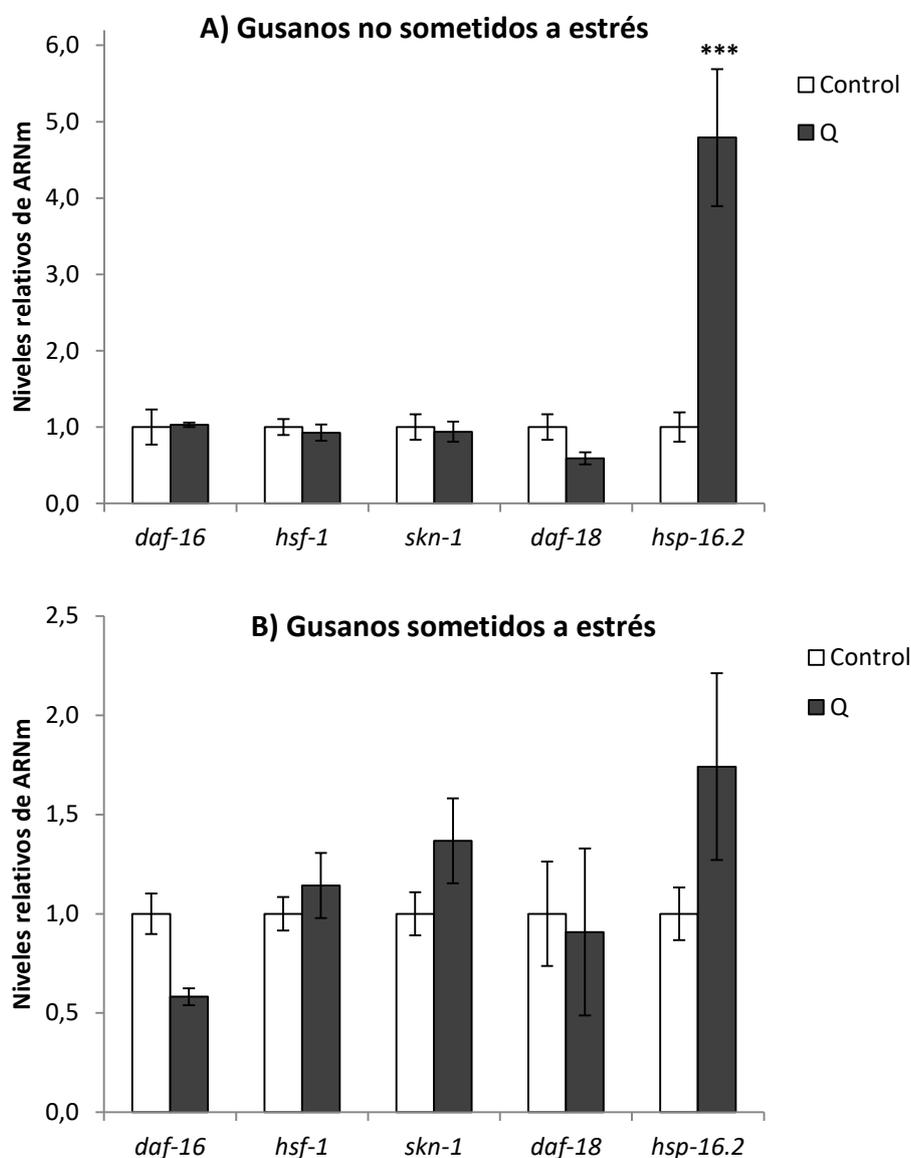


Figura IV.3.4. Efecto de Q sobre la expresión de los genes *daf-16*, *hsf-1*, *skn-1*, *daf-18* y *hsp-16.2* en la cepa silvestre N2 de *C. elegans* cultivada en ausencia (controles) y presencia de Q (200 μ M), en gusanos no sometidos (A) o sometidos a estrés térmico (35 $^{\circ}$ C, 5 h) (B). El nivel de expresión fue determinado por RT-qPCR, empleando *act-1* como control interno. En cada caso, se realizaron nueve experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

De igual manera, se llevaron a cabo estudios para evaluar la influencia de Q en SKN-1/Nrf-2, otro co-regulador transcripcional de DAF-16. Los resultados, aunque no

significativos, mostraron un incremento en la expresión de *skn-1* en gusanos N2 tratados con Q tras ser sometidos a estrés (Figura IV.3.4, B *skn-1*). Esta tendencia fue observada de modo consistente en cada una de las nueve repeticiones del ensayo realizadas. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión media de *skn-1* entre gusanos tratados y no tratados con Q cuando no eran sometidos a estrés (Figura IV.3.4, A *skn-1*), aunque en este caso, los resultados obtenidos en los distintos ensayos individuales no siempre presentaban la misma tendencia. Debido a esta variabilidad en la expresión de *skn-1*, se decidió realizar un estudio de la expresión de *skn-1* en condiciones normales de crecimiento a lo largo de toda la vida del gusano, para comprobar si el nivel de ARNm podía estar influido por el momento de la vida del gusano. Concretamente se analizaron las diferencias en la expresión de *skn-1* entre gusanos tratados con Q y no tratados (individuos control) los días 2, 5, 9, 12 y 16. Los resultados obtenidos (Figura IV.3.5) no revelaron la existencia de diferencias significativas en la expresión de *skn-1* a lo largo del tiempo como consecuencia del tratamiento con Q, aunque sí se observaban distintas tendencias en los niveles de ARNm entre gusanos tratados y no tratados según el día de desarrollo, si bien nunca de manera significativa.

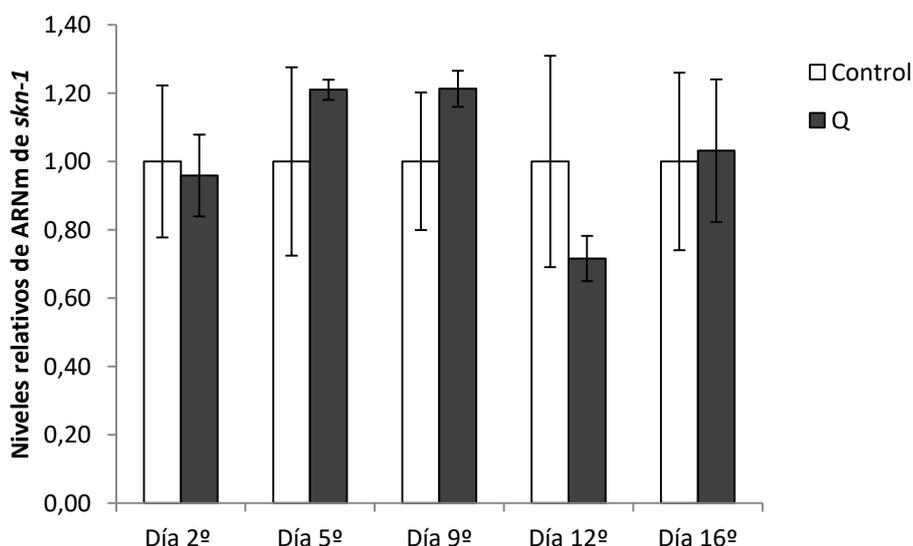


Figura IV.3.5. Efecto de Q sobre la expresión del gen *skn-1* en *C. elegans* N2 cultivados en ausencia (controles) y presencia de Q (200 µM) en condiciones normales de crecimiento. El nivel de expresión fue determinado por RT-qPCR, empleando *act-1* como control interno. En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (* $p < 0,05$).

El factor de transcripción SKN-1/Nrf-2 regula la resistencia a estrés oxidativo y la expresión de genes de detoxificación en respuesta a una señal reducida de IIS, pero extiende la vida media de manera independiente de DAF-16 (Tullet et al., 2008 y 2017). Además, la localización nuclear de SKN-1 está controlada por fosforilación por la vía p38 MAPK, mientras que su regulación negativa es controlada por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), para prevenir que esto ocurra constitutivamente (An et al., 2005; Inoue et al., 2005). Este mecanismo de acción podría apoyar los resultados aquí obtenidos, que parecen indicar que *skn-1* es un mediador necesario en los efectos observados en gusanos tratados con Q y sometidos a estrés, como se deduce tanto por la pérdida de mejora de resistencia al estrés en los mutantes *skn-1*, ya sea a día 2 o 9, como por el aumento en la expresión de *skn-1* en condiciones de estrés. Sin embargo, no parece que *daf-16* esté involucrado en los efectos producidos en *C. elegans* por el tratamiento con Q (Figuras IV.3.3 y IV.3.4). Por otro lado, Pietsch et al. (2009) estudiaron los efectos de quercetina sobre longevidad en mutantes *skn-1* solamente en condiciones normales de crecimiento, encontrando que el flavonol seguía produciendo un aumento en la vida media en estos mutantes, por lo que concluían que Q puede aumentar la longevidad independientemente de ese gen.

Se evaluó también la expresión de *daf-18* mediante la cuantificación de ARNm por RT-qPCR en condiciones normales de cultivo y tras someter a los gusanos a estrés térmico (35 °C, 5 h). Como se puede observar en la Figura IV.3.4, A y B, el tratamiento con Q no modificó de manera significativa la expresión de este gen en ninguna de las dos condiciones. Sin embargo, los resultados obtenidos con los mutantes (Figura IV.3.3, D.1 y D.2) sí indicaban que los efectos protectores conferidos por quercetina frente al estrés dependían de DAF-18. Una posible explicación a esta aparente contradicción podría ser que los resultados obtenidos en los ensayos con mutantes *daf-18* pudieran estar reflejando la implicación de la proteína con actividad quinasa AGE-1, cuya influencia en los efectos de Q se ha discutido anteriormente, ya que la proteína DAF-18/PTEN se encarga de desfosforilar e inhibir a AGE-1/PI3K, contrarrestando así su actividad (Lapierre y Hansen, 2012).

Por último, utilizando la misma metodología, se estudiaron las proteínas de choque térmico HSP-16.2, cuya expresión, como se indicó previamente, puede estar

influida por los principales factores de transcripción regulados por la IIS (DAF-16, HSF-1 y SKN-1). Para establecer la influencia del tratamiento con Q en las HSP-16.2, al igual que con el resto de mutantes, se evaluó la resistencia a estrés oxidativo inducido térmicamente en una cepa mutante, *hsp-16.2(gk249)* que había sido cultivada en presencia del flavonol. Los resultados obtenidos mostraron que los mutantes *hsp-16.2* tratados con quercetina no presentaban mayor supervivencia que los gusanos control, sino que, por el contrario, cuando el estrés se aplicaba en el día 2 se producía incluso un descenso significativo en la supervivencia de los gusanos tratados con Q respecto a su control (Figura IV.3.6).

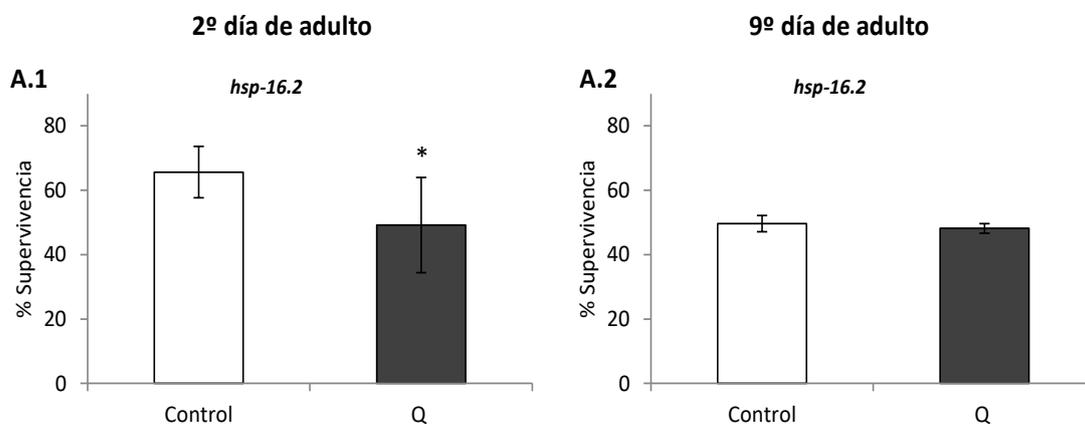


Figura IV.3.6. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C, 4 h) en los días 2 y 9 de adulto en la cepa mutante *hsp-16.2(gk249)*, cultivada en ausencia (controles) y en presencia de Q (200 μM). Se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media ± SD. La significación estadística se calculó usando la Prueba Chi Cuadrado (* $p < 0.05$).

Para obtener más información sobre la implicación de estas proteínas en los efectos de Q sobre la resistencia al estrés, se analizó también la expresión de *hsp-16.2* mediante RT-qPCR en gusanos de la cepa silvestre N2 cultivados en condiciones normales y sometidos o no a estrés térmico. Los resultados (Figura IV.3.4, A y B) mostraron una clara inducción de la expresión de *hsp-16.2* por el tratamiento con Q, tanto tras estrés como en su ausencia. No obstante, las diferencias solo eran estadísticamente significativas en ausencia de estrés, lo que posiblemente puede ser explicado por la ya fuerte inducción de las HSP-16.2 por las propias condiciones de

estrés térmico, que haría menos relevante el efecto que adicionalmente está induciendo la Q.

El empleo de nematodos mutantes que carecen de la actividad de genes importantes en rutas involucradas en la tolerancia al estrés y la longevidad, así como la cuantificación de la expresión de dichos genes han sido aproximaciones utilizadas por distintos autores para explorar los mecanismos de acción implicados en los efectos observados tras el tratamiento con distintos compuestos de la familia de los flavonoles, además de quercetina.

Por ejemplo, el efecto de la extensión de la vida media de *C. elegans* por el tratamiento con quercetina-3-O-diglucósido fue explicado por Xue et al. (2011) por un incremento en la expresión de los genes *daf-2*, *old-1* (codifica un receptor tirosina quinasa y tiene un papel en resistencia al estrés y en la regulación de la longevidad, ya que está influenciado por el gen *daf-2*; Murphy et al., 2003), *osr-1* (media la supervivencia en ambientes hiperosmóticos; Solomon et al., 2004) y *sek-1* (MAP2K; Kim et al., 2002). Sin embargo, este flavonol no modificaba la expresión de *daf-16*, *age-1* y *sir-2.1*, todos ellos evaluados mediante RT-qPCR (Xue et al., 2011). Paiva et al. (2015) también estudiaron los mecanismos subyacentes a la mejora de la resistencia a estrés oxidativo inducido por el tratamiento con un extracto rico en flavonoles obtenido de la planta *Baccharis trimera* mediante el uso de diferentes mutantes. Concretamente, vieron que el aumento de la resistencia al estrés era independiente de *skn-1* y *daf-16*, así como de los genes *nsy-1*, *pmk-1*, *sek-1*, *jnk-1*, *osr-1*, *unc-43* y *mpk-1*, todos ellos relacionados con las rutas de señalación altamente conservadas MAPK p38, JNK y ERK MAPK, que pueden activar diferentes factores de transcripción entre los que se incluyen SKN-1 y DAF-16. De la misma manera, para comprobar si la reducción de ROS observada al tratar nematodos N2 de miricetina, kaempferol o quercetina era la causa de la extensión de longevidad, Grünz et al. (2012) midieron los niveles de ROS en mutantes *mev-1*, que presentan una mutación en un gen del citocromo b de la succinato deshidrogenasa, que hace que estos animales presenten niveles elevados de especies reactivas (Ishii et al., 1998). Los resultados mostraron que los flavonoles seguían produciendo un descenso de los niveles de ROS independientemente de la concentración inicial de ROS en los gusanos. Sin embargo, pese a que en la cepa N2 el

aumento de longevidad se producía con los tres flavonoles, solo miricetina era capaz de aumentar la longevidad en los mutantes *mev-1*, sugiriendo que la capacidad de los flavonoles para reducir los niveles de ROS no era por sí misma motivo suficiente para prolongar la longevidad. Además, comprobaron que tanto miricetina como quercetina seguían provocando un aumento de la longevidad en mutantes *daf-16*, por lo que concluyeron que la extensión de la longevidad inducida por los flavonoles era independiente de DAF-16 (Grünz et al., 2012).

Como conclusión de los estudios realizados en individuos mutantes y de expresión génica descritos en este apartado, teniendo en cuenta el conjunto de resultados obtenidos, parece que, al menos en parte, la ruta IIS estaría implicada en la mejora de la supervivencia a estrés oxidativo inducido térmicamente producida por el tratamiento con Q. Concretamente el efecto de mejora en las propiedades de termotolerancia sería dependiente de los genes *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *sgk-1*, *daf-2*, *skn-1* y *hsp-16.2* e independiente de *daf-16* y *hsf-1*. Además, este mecanismo no parece ser modificado por la edad del gusano.

4.3.3 Cuantificación de la expresión génica mediante el uso de reporteros fluorescentes en estirpes transgénicas de *C. elegans*

Con el objeto de contribuir a elucidar los mecanismos de acción relacionados con los efectos de extensión de la vida media y la mejora en la resistencia al estrés observados tras el tratamiento con Q en *C. elegans*, se estudió la expresión de varios genes relacionados con la respuesta a estrés, concretamente de las proteínas de choque térmico HSP-16.2 y HSP-70 y de las enzimas SOD-3 y GST-4. Como se ha indicado anteriormente, la ruta IIS transmite señales que dependen de las condiciones ambientales que pueden cambiar la expresión de estos y otros genes relacionados con estrés y longevidad y que en conjunto regulan procesos tan importantes como envejecimiento, formación del estado de resistencia *dauer* o metabolismo.

Para este trabajo, gusanos de cepas transgénicas que expresan GFP bajo el control de los promotores de *gst-4*, *sod-3*, *hsp-16.2* y *hsp-70* fueron estudiados tras ser cultivados en presencia o ausencia de Q (200 μ M). También, se utilizó una cepa transgénica que expresa una proteína de fusión DAF-16::GFP para examinar si el

tratamiento con Q activaba la translocación nuclear de DAF-16 en condiciones normales y de estrés.

Los reporteros de *gst-4* se evaluaron a día 3 de desarrollo del gusano adulto y los *hsp-70* a día 5. Los días de ensayo se escogieron en función de cuando se observaba una mayor intensidad de fluorescencia tras realizar un seguimiento inicial a lo largo de toda la vida del gusano en las diferentes cepas tratadas con el flavonoide. En los casos en los que no se apreciaba un aumento de fluorescencia llamativo a lo largo del tiempo, como era el caso de las cepas reporteras de *hsp-16.2*, *sod-3* y DAF-16::GFP, se estudiaron gusanos adultos jóvenes (día 2 de adulto) y mayores (día 9 de adulto), como se había realizado previamente en los ensayos con mutantes. Todas las cepas se estudiaron en condiciones normales de crecimiento y tras someter a los gusanos a estrés térmico (35 °C, 1 h). Para la correcta visualización de la fluorescencia de los reporteros de *hsp-16.2* y *hsp-70* era necesario que éstos se recuperaran a 20 °C durante 2 y 3 horas respectivamente tras el estrés térmico. Para las cepas reporteras de *sod-3* y *gst-4* no se observó inducción de la fluorescencia tras estrés térmico, por lo que solo se evaluaron en condiciones nativas.

Los resultados de estos ensayos se recogen en la Figura IV.3.7, donde se puede comprobar que el tratamiento con Q no producía un aumento significativo en la expresión de ninguno de los genes estudiados (*gst-4*, *sod-3*, *hsp-16.2* y *hsp-70*), incluso se aprecia un descenso significativo en la expresión de *hsp-70* en los gusanos tratados con Q. Para facilitar la comparación, en la Figura IV.3.7 se muestran los resultados en forma de gráfico de barras, recogiendo la expresión de GFP en las cepas reporteras de *gst-4* y *sod-3* en condiciones normales de crecimiento, y de *hsp-16.2* y *hsp-70* tras ser sometidas a estrés (35 °C, 1 h) y recuperadas a 20 °C durante 2 h y 3 h, respectivamente, ya que su intensidad de fluorescencia difícilmente se detectaba antes de someter los nematodos a estrés.

Alguno de los genes de respuesta al estrés y destoxificación xenobiótica regulados por la ruta IIS ya habían sido estudiados por otros autores mediante el uso de cepas reporteras, para explorar la respuesta al tratamiento con Q, concretamente GST-4 y SOD-3. Los resultados de los efectos de Q en el reportero de *sod-3* son controvertidos, mientras que (Kampkötter et al., 2008) observaban un descenso de la

expresión de *sod-3* (100 μ M tras 72h de incubación), Grünz et al. (2012) encontraron que el tratamiento con 100 μ M durante 48 h de Q producía un aumento significativo de *sod-3*. En nuestro caso no se detectaron cambios significativos en la expresión de *sod-3* tras el tratamiento con Q. Por otro lado, Kampkötter et al. (2007b) observaron que la expresión de *gst-4* no se modificaba por el tratamiento con Q (100 μ M) en condiciones normales de desarrollo. Sin embargo, al estudiar la expresión de *gst-4* tras someter a los gusanos a estrés oxidativo con juglona 20 μ M encontraron que la Q producía un descenso en los niveles de GST-4 respecto al control (Kampkötter et al., 2007b). Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos en nuestros estudios, donde tampoco se observó un aumento de la expresión de la enzima antioxidante detoxificante GST-4 en condiciones normales de crecimiento.

Por último, no se vio que el tratamiento con Q produjera una mayor translocación de DAF-16 al núcleo respecto a los gusanos control, ni en condiciones nativas ni tras someter a los gusanos a estrés térmico (35 °C, 1 h) (Figura IV.3.8). En todo caso, hay que señalar que el propio estrés térmico ya induce de por sí una fuerte translocación de DAF-16 al núcleo, próxima a la máxima observable, lo que dificulta la discriminación de las posibles diferencias inducidas por el tratamiento con Q en nematodos DAF-16::GFP.

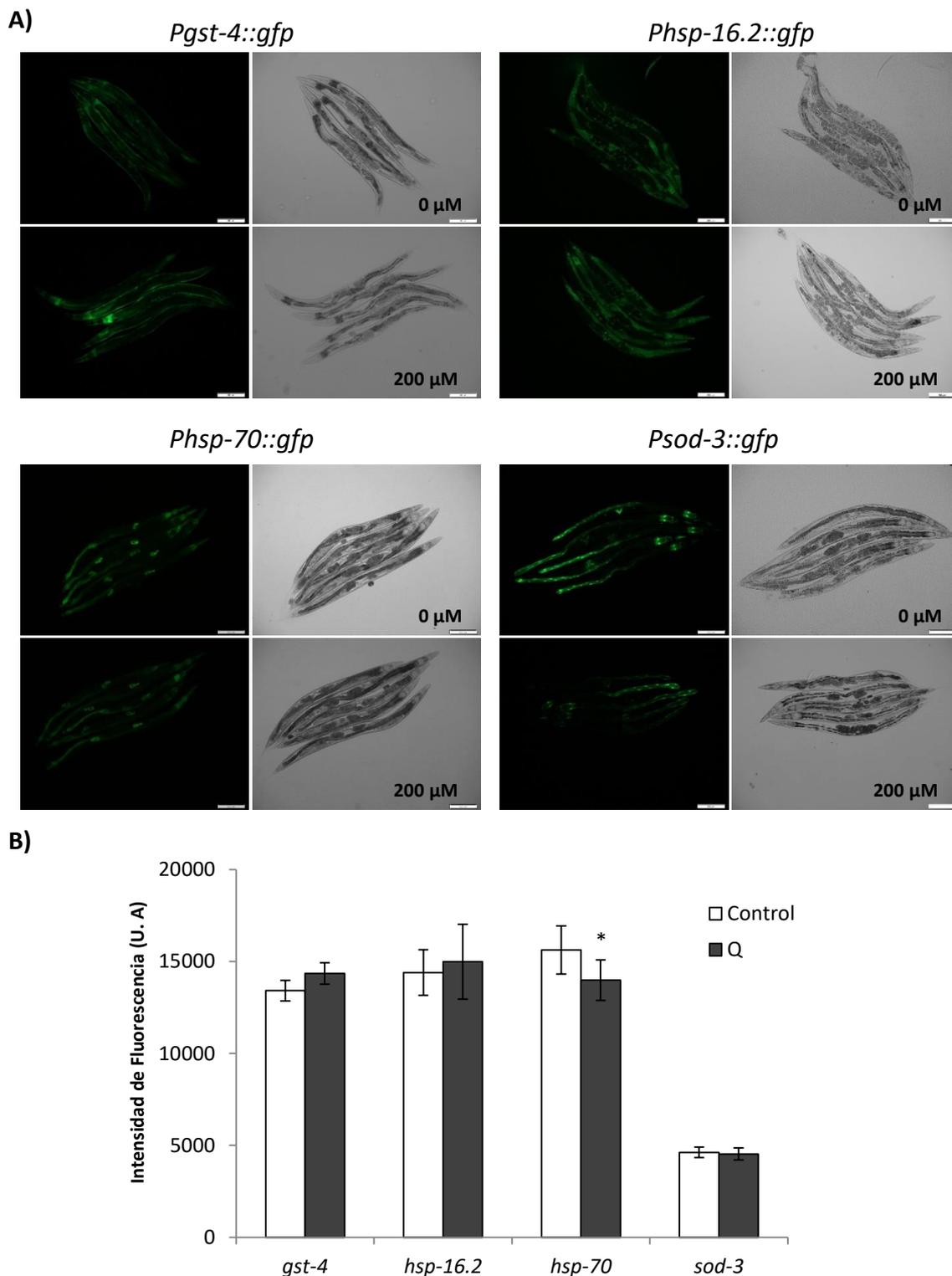
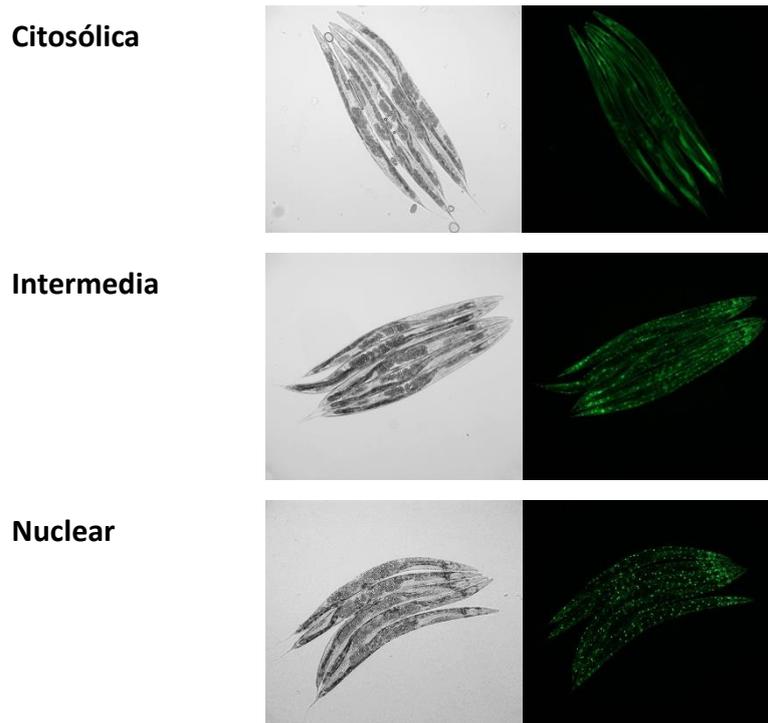


Figura IV.3.7. Efecto de Q sobre la expresión de *gst-4*, *hsp-16.2*, *hsp-70* y *sod-3* en *C. elegans*. (A) Imágenes de fluorescencia representativas de las cepas control y tratadas. (B) Intensidad de fluorescencia relativa en gusanos transgénicos. La fluorescencia se cuantificó utilizando el software Image J. Aproximadamente se examinaron 30 gusanos seleccionados aleatoriamente de cada experimento. Los experimentos se realizaron de forma independiente 3 veces. Los resultados representan la media \pm SEM. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) mediante ANOVA de un factor.

A)



B)

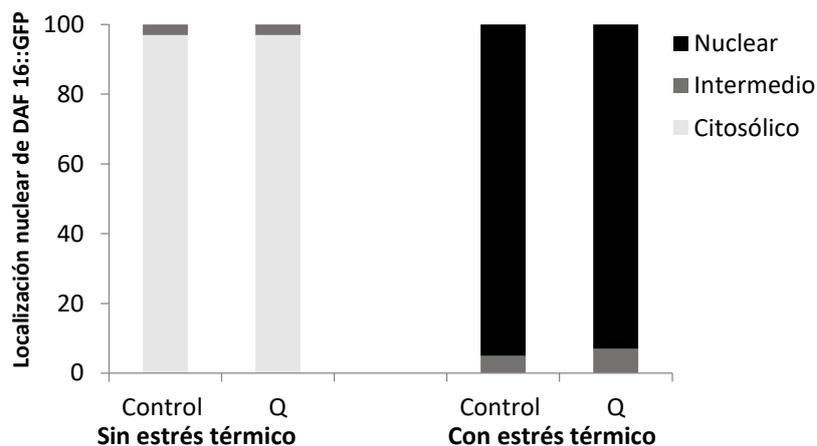


Figura IV.3.8. Efecto de Q en la localización nuclear de DAF-16::GFP en gusanos no sometidos y sometidos a estrés térmico (35 °C, 1 h). Los gusanos transgénicos que expresan la proteína de fusión DAF-16::GFP se cultivaron en ausencia (controles) y presencia de Q (200 μ M) y se evaluaron el día 2 de adulto. La distribución subcelular de DAF-16::GFP fue clasificada como citosólica, intermedia y nuclear.

Como se había comentado anteriormente, en los ensayos realizados en cepas mutantes *daf-16(mu86)* se había encontrado que el tratamiento con Q seguía produciendo un aumento significativo de la resistencia a estrés térmico y también que no producía cambios significativos en la expresión de *daf-16*, ni en condiciones

normales ni tras aplicación de estrés térmico. Esto llevaba a concluir que el efecto de este flavonol en la mejora de la resistencia a estrés parecía ser independiente de este gen, lo que también fue sugerido por otros autores (Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009; Grünz et al., 2012).

Los estudios de expresión de la localización subcelular de DAF-16 tampoco mostraron una implicación de dicho factor de transcripción, ya que no se observaba una mayor localización nuclear de DAF-16 en los gusanos tratados con Q, ni en condiciones normales ni tras someterlos a choque térmico, si bien dicho choque ya produce la casi totalidad de translocación de DAF-16 desde el citoplasma al núcleo, dificultando ver posibles diferencias debidas al tratamiento en condiciones de estrés. Otros autores, sin embargo, sí han encontrado mayor translocación de DAF-16 al núcleo tras el tratamiento con Q en gusanos no sometidos a estrés (Kampkötter et al., 2007b y 2008; Grünz et al., 2012). En relación con ello, Saul et al. (2008) sugirieron que la translocación de DAF-16 al núcleo en respuesta a quercetina podría ser más un efecto circunstancial que una prueba de un mecanismo de longevidad subyacente. Aunque DAF-16 es un factor clave en el control de la respuesta al estrés y en longevidad (Kenyon et al., 1993; Oh et al., 2005; Tullet, 2015), también se ha señalado que la translocación de DAF-16 al núcleo no garantiza una vida más larga. Por ejemplo, Hekimi et al. (2001) observaron que la translocación de DAF-16 al núcleo no es suficiente para aumentar la longevidad, ya que, aunque los mutantes longevos *daf-2* presentan una acumulación aumentada de DAF-16 en el núcleo, cuando se realizan mutaciones en *akt* (lo que evita la fosforilación de DAF-16 y por lo tanto provoca que DAF-16 se encuentre constitutivamente en el núcleo) solo se produce un ligero aumento de la longevidad. Por ello, estos autores proponen que *daf-2* tiene efectos en DAF-16 adicionales a su fosforilación o, cuando menos, que *daf-2* actúa sobre otra diana molecular. Uno y Nishida (2016), también señalaron que, aunque DAF-16 tiene un papel fundamental en la regulación de la longevidad, la localización nuclear de DAF-16, que es necesaria para su actividad transcripcional, no es suficiente para aumentar la longevidad y que la sobreexpresión de *daf-16* en N2 solo producía un ligero aumento de la longevidad, por lo que el incremento de DAF-16 por sí solo no es

suficiente para extender la vida significativamente. Todas estas evidencias sugieren que DAF-16 no actuaría necesariamente solo en la regulación de la longevidad.

Existen otros factores que ayudan a la activación de genes particulares por DAF-16 en un determinado contexto, como por ejemplo la actuación de las quinasas JNK-1 y CST-1, que regulan la actividad de DAF-16 mediante modificaciones postranscripcionales (Oh et al., 2005; Lehtinen et al., 2006). Otras proteínas como SIR-2.1, LIN-14, PRMT-1, RLE-1 y AAK-2 también están involucradas en regular la actividad transcripcional de DAF-16 después de la localización nuclear (Berdichevsky et al., 2006; Greer et al., 2007; Li et al., 2007; Saul et al., 2008; Takahashi et al., 2011). Por lo tanto, estos reguladores también serían responsables de la activación de la expresión de genes concretos influenciados por DAF-16 y los consecuentes fenotipos. Todo ello pone a su vez de manifiesto la compleja regulación de la longevidad, resistencia al estrés y otros efectos por la ruta IIS.

Según nuestros resultados, los efectos de Q parecen ser independientes de *daf-16* pero dependientes *daf-2* y de otros componentes de la IIS, como *akt-1*, *age-1* y *akt-2*, junto con *sgk-1*, lo cual podría resultar sorprendente. Sin embargo, Hekime et al. (2001) y Lin et al. (2001) señalan que cuando la ruta IIS es inhibida en respuesta a diferentes señales medioambientales, además de la regulación de genes de resistencia frente al estrés, son muy importantes señales aún no identificadas que también son reguladas en *daf-2* pero no son dependientes de *daf-16* y que son esenciales para la extensión de la longevidad observada en mutantes *daf-2*.

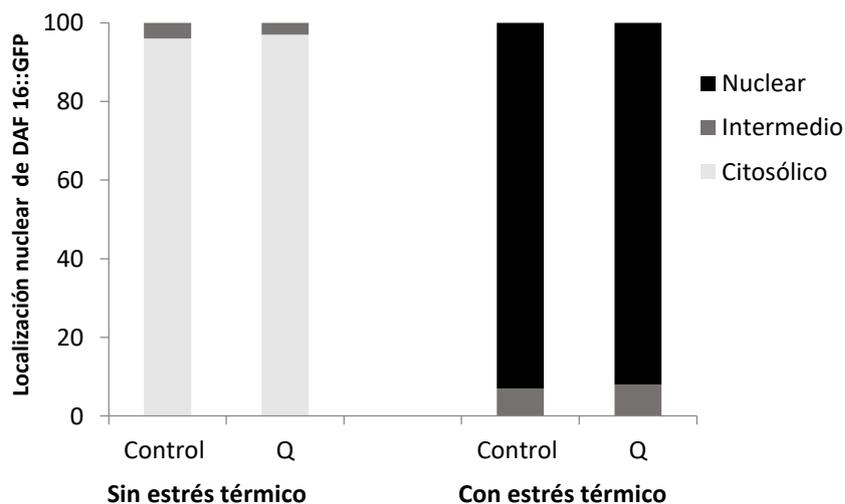


Figura IV.3.9. Efecto de Q en la localización nuclear de DAF-16::GFP en gusanos no sometidos y sometidos a estrés térmico (35 °C, 1 h). Los gusanos transgénicos que expresan la proteína de fusión DAF-16::GFP se cultivaron en ausencia (controles) y presencia de Q (200 μ M) y se evaluaron el día 9 de adulto. La distribución subcelular de DAF-16::GFP fue clasificada como citosólica, intermedia y nuclear.

Al igual que en los estudios con EC, se quiso comprobar si la expresión de GFP era diferente en algunas cepas reporteras de *hsp-16.2*, *sod-3* y DAF-16::GFP en gusanos adultos jóvenes (día 2 de adulto) y en gusanos más mayores (día 9), que presentan diferentes momentos reproductivos, con el fin de establecer si el mecanismo de acción subyacente del tratamiento con Q dependía del estado de desarrollo del gusano. En la Figura IV.3.9 se puede observar que el resultado en la translocación nuclear de DAF-16 a día 9 era similar al encontrado para los gusanos a día 2 (Figura IV.3.8). De la misma manera, los resultados de la expresión de *sod-3* fueron similares a los obtenidos en gusanos más jóvenes, no encontrando diferencias en su expresión debido al tratamiento con Q (Figura IV.3.10).

Sin embargo, cuando se analizó la expresión de *hsp-16.2* en los individuos a día 9 de adulto (Figura IV.3.10) se observó un aumento significativo en la expresión de los genes que codifican proteínas de choque térmico debido al tratamiento con Q que no era observado a día 2 (Figura IV.3.7). Concretamente, la expresión de *hsp-16.2* por el tratamiento con Q respecto al control a día 2 mostraba un porcentaje de aumento de 4,13 % no significativo respecto al control, mientras que a día 9 el aumento era significativo alcanzando el 18,76 %. Esta observación puede ser importante para

entender los efectos de aumento de vida media y de mayor resistencia al estrés inducidos por Q en *C. elegans*, ya que muchas proteínas de choque térmico se pueden regular positivamente al comienzo de la vida adulta, para luego sufrir una disminución a lo largo de la vida, descenso que parece compensarse por efecto del tratamiento con Q. Además, bajos niveles de HSP en edades avanzadas pueden conducir al aumento creciente de proteínas mal plegadas y, por tanto, a la pérdida de homeostasis y a la senescencia del organismo (Lund et al., 2002; Braeckman y Vanfleteren, 2007).

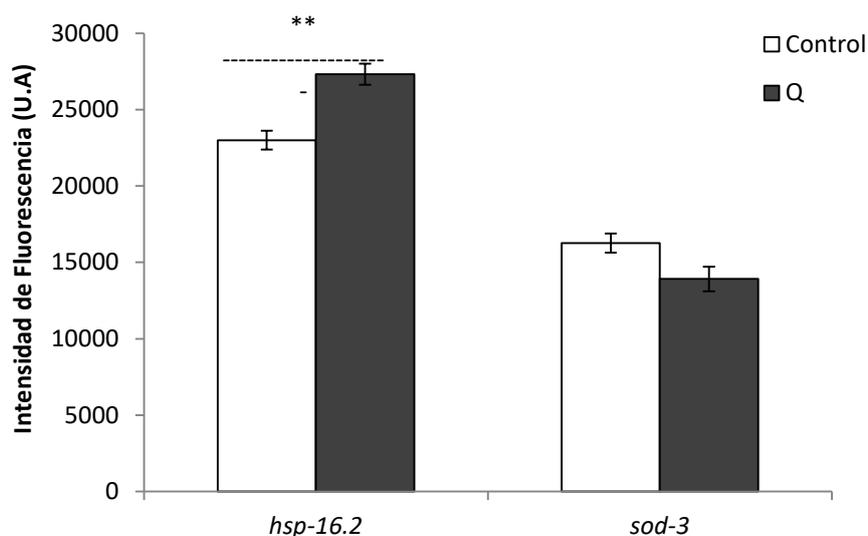


Figura IV.3.10. Efecto de Q sobre la expresión de *sod-3* y *hsp-16.2* en *C. elegans* en gusanos de avanzada edad (día 9 de adulto). Los gusanos transgénicos se cultivaron en ausencia (controles) y presencia de Q (200 μ M). La fluorescencia se cuantificó utilizando el software Image J. Aproximadamente se examinaron 30 gusanos seleccionados aleatoriamente de cada experimento. Los experimentos se realizaron de forma independiente 3 veces. Los resultados representan la media \pm SEM. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) mediante ANOVA de un factor.

Algunos autores han explicado la mayor longevidad y termotolerancia observadas en determinados mutantes, como los *age-1* de vida larga, por un aumento de la regulación y la acumulación de HSP-16 (Walker et al., 2001). Estas afirmaciones parecen ser coherentes con nuestros resultados, ya que el aumento de la expresión de *hsp-16.2* encontrado en los estudios de RT-qPCR (Figura IV.3.4) se podría ver reflejado en la mayor expresión del reportero de *hsp-16.2* a día 9 de adulto (Figura IV.3.10). Además, cuando se observa la curva de longevidad de Q (Figura IV.3.1), se puede comprobar que pasa a situarse por encima de la curva de los gusanos control a partir

de aproximadamente el día 8, para ya mantener esa tendencia hasta el final de la vida de *C. elegans*; ello coincidiría con el momento en que según los resultados de la expresión de *hsp-16.2* estarían aumentadas las HSP. Aparentemente contradictorios con este supuesto son los resultados obtenidos con las otras proteínas de choque térmico estudiadas en este trabajo, las HSP-70, ya que los resultados mostraron una disminución significativa del reportero de *hsp-70* en los gusanos tratados con Q (Figura IV.3.7). En todo caso, estas proteínas no fueron estudiadas en individuos a día 9, por lo que se desconoce la tendencia en su expresión, que podría verse modificada a lo largo del desarrollo del gusano, como se intuye para las proteínas HSP-16.2.

Pietsch et al. (2011) evaluaron la influencia de Q, ácido cafeico y ácido rosmarínico sobre la expresión de diferentes HSP (*hsp-3*, *hsp-12.6*, *hsp-16.1*, *hsp-16.41*, *hsp-17* y *hsp-70*) mediante RT-qPCR, observando que la Q producía un aumento en la expresión de cuatro de las HSP y una disminución significativa de las otras dos, en particular *hsp-70* y *hsp-17*, lo que puede servir como apoyo a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por otro lado, dos factores de transcripción clave en la expresión de las HSP, DAF-16 y HSF-1 (Hsu et al., 2003) no estaban implicados en los efectos que ejercía Q sobre *C. elegans* (Figuras IV.3.3 y IV.3.4), como se ha discutido anteriormente. En todo caso, la pregunta de si HSF-1 puede activar todas las HSP sigue sin respuesta, aunque resultados recientes de Tang et al. (2016) apuntan a que no sería así.

Mertenskötter et al. (2013) mostraron la regulación positiva en la expresión de genes de chaperonas, biosíntesis de proteínas y degradación de proteínas mediante la ruta PMK-1 (SEK-1, PMK-1 y SKN-1) y establecieron la importancia de la contribución de dicha ruta en la tolerancia térmica en *C. elegans*. PMK-1 codifica una proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), ortóloga a la MAPK humana p38, que es un importante regulador de la inmunidad innata en *C. elegans* (Hoeven et al., 2011). Además, la ruta de señalización MAPK p38 regula mediante fosforilación la actividad transcripcional y la localización subcelular de SKN-1/Nrf2 en el intestino, por lo que también influye en la respuesta a estrés oxidativo (Tullet et al., 2008). PMK-1 está regulada por una cascada de fosforilación que implica la activación de un receptor Toll/IL-1 (TIR-1), que conduce a la activación de una MAP3K, llamada NSY-1, que

posteriormente activa una MAP2K (SEK-1), que culmina en la fosforilación de PMK-1 (Figura IV.3.11). Originalmente, esta ruta MAPK se había caracterizado por desempeñar un papel en la determinación de destino asimétrico de las células neuronales. Actualmente se piensa que la fosforilación del factor de transcripción ATF-7 por PMK-1 promovería la expresión genes de la respuesta inmune innata, mientras que SEK-1 sería necesario para la activación de SKN-1 mediante estrés oxidativo (Hoeven et al., 2011). Además, NYS-1 y SEK-1 también pueden actuar en respuesta a UNC-43 (Figura IV.3.11), que codifica una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina tipo II (CaMKII). La actividad de UNC-43 es necesaria para una serie de procesos, incluida la locomoción, la especificación del destino de las células neuronales y la regulación de la densidad sináptica, la puesta de huevos, la defecación y la maduración meiótica, cuya activación depende de la actividad de la vía de CaMKII.

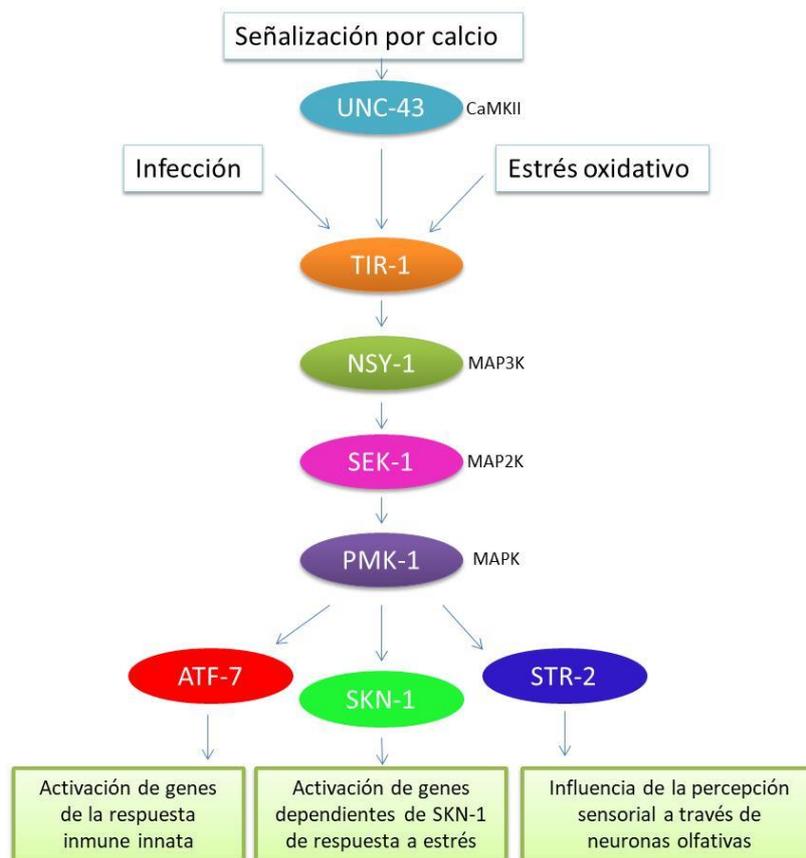


Figura IV.3.11. Rutas genéticas controladas por rutas MAPK.

Tanto *sek-1* como *unc-43* parecen estar también involucrados en el mecanismo molecular de la respuesta a quercetina. Pietsch et al. (2009) proponen que las rutas MAPK y Ca^{2+} /Calmodulina podrían intervenir en el aumento de longevidad al conducir a una elevada respuesta inmune e influir en el control de la resistencia mediante SKN-1, así como en la percepción sensorial a través de las neuronas olfatorias mediante el receptor STR-2. Para profundizar en estos aspectos, Pietsch et al. (2012) realizaron un estudio de los patrones transcripcionales globales de los nematodos tras el tratamiento con Q, donde demostraron que el metaboloma y las rutas de señalización de TGF- β , que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y la fisiología de diversas especies, la ruta de señalización de la IIS y la ruta p38 MAPK, estaban involucradas en el aumento de longevidad producido por quercetina. Otros autores también concluyeron la implicación de componentes de esta ruta en los efectos de polifenoles. Por ejemplo, Bonomo et al. (2014) encontraron que el efecto de un extracto rico en polifenoles de Açaí en resistencia a estrés oxidativo era dependiente de SEK-1, OSR-1 (implicado en la regulación de la respuesta al estrés osmótico) y UNC-43. Por su parte, Wilson et al. (2006) observaron que el aumento de longevidad producido por el tratamiento con extractos de arándanos implicaba la ruta CaMKII. En vista de estos resultados, las rutas MAPK podrían estar involucradas en los efectos mediados por quercetina, lo que podría explicar al menos en parte la implicación de SKN-1 y la activación de determinadas HSP.

4.3.4 Comentarios finales

El tratamiento de *C. elegans* con 200 μM de quercetina producía un efecto protector que se reflejó en una mejora de la resistencia a estrés térmico y oxidativo y un aumento de la vida media y máxima. En vista de los resultados obtenidos, parece que estos efectos podrían explicarse, al menos en parte, por la modulación de la ruta de la señalización de la insulina. Concretamente, los genes *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *daf-18*, *sgk-1*, *daf-2*, *skn-1* y *hsp-16.2* estarían implicados en la mejora de la resistencia a estrés observada tras el tratamiento con Q. Sin embargo, este efecto sería independiente de *daf-16* y *hsf-1*. La implicación de *daf-2* y no de *daf-16* en los efectos observados tras el tratamiento con Q parece reforzar la idea de que existen señales aún no identificadas

que también son reguladas por *daf-2* pero son independientes de *daf-16* y que son esenciales para la extensión de la longevidad y la resistencia al estrés.

El hecho de que el factor de transcripción SKN-1 promueva la longevidad por un mecanismo diferente a la protección frente al daño oxidativo, demostrado, por un lado, porque los mutantes *skn-1* dejaban de mostrar un aumento de la resistencia a estrés térmico y, por otro, porque no se encontraba un cambio significativo en la expresión del gen en condiciones normales de crecimiento, apoyados por el mantenimiento de la longevidad en mutantes *skn-1* tras tratamiento con Q observado por Pietsch et al. (2009), parecen indicar que el gen *skn-1* no estaría implicado en los efectos de Q en condiciones normales, mientras sí podría estarlo en los producidos en situación de estrés.

Los resultados de expresión de genes mediante el uso de cepas transgénicas de *C. elegans* mostraron que el tratamiento con quercetina no producía un aumento en la expresión de las enzimas GST-4 y SOD-3 ni de las proteínas de choque térmico HSP-16.2 y HSP-70. Además, en base a los resultados obtenidos en dos momentos de desarrollo del gusano, el mecanismo de acción implicado en los efectos de Q no parece verse modificado por la edad del gusano, salvo en el caso de las proteínas HSP-16.2, que presentaban un aumento significativo en su expresión en gusanos de más edad (día 9 de adulto) que no era observado en individuos jóvenes (día 2). Este dato podría ser importante para explicar, al menos en parte, los efectos de aumento de vida media y mayor resistencia al estrés producidos por Q en *C. elegans*, ya que muchas proteínas de choque térmico se regulan positivamente al comienzo de la vida adulta para luego disminuir a lo largo de la vida.

Por último, las rutas MAPK exploradas por otros autores también podrían contribuir a explicar los datos obtenidos en este estudio debido a su implicación para activar SKN-1 y determinadas HSP.

A pesar de la enorme cantidad de información para entender los procesos biológicos que regulan el envejecimiento recopilada en los últimos años a través de análisis genómicos, definir qué genes son funcionalmente importantes para la longevidad ha demostrado ser un desafío, y sigue siendo uno de los grandes misterios

de la Biogerontología. Por ello, el avance en los conocimientos en este campo puede ser clave para entender los mecanismos de acción subyacentes de la actividad de los flavonoides. Los estudios disponibles muestran que la red de rutas de señalización que podrían ser moduladas por flavonoides es compleja, incluyendo las rutas IIS, p38 MAPK y CaMKII, así como varias opciones de interacción lo que dificulta la comprensión de los posibles mecanismos de acción.



V. CONCLUSIONES GENERALES



Se ha observado que el tratamiento con **extractos de subproductos de vinificación ricos en polifenoles**, produce en el nematodo una respuesta de tipo hormético, de manera que concentraciones fenólicas relativas bajas mejoran su resistencia al estrés oxidativo inducido térmicamente, mientras que concentraciones elevadas aumentan la mortalidad. El efecto beneficioso también se encuentra influido por la composición fenólica cualitativa de los extractos y es más acusado en gusanos de mayor edad que en adultos jóvenes.

El tratamiento de *C. elegans* con **epicatequina** conduce a un aumento en la supervivencia del nematodo cuando se somete a estrés oxidativo inducido térmicamente, así como a un descenso en los niveles de peroxidación lipídica y de proteínas carboniladas. Estos resultados sugieren un posible **efecto protector** de epicatequina frente al daño oxidativo, todavía observable en gusanos de mayor edad. Los niveles de especies reactivas de oxígeno muestran, sin embargo, diferente comportamiento según la fase de desarrollo del nematodo, ya que disminuyen por el tratamiento con epicatequina en individuos jóvenes, mientras aumentan en los de más edad. Aunque la influencia de los niveles de ROS sobre la supervivencia de *C. elegans* está todavía bajo discusión, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que este aumento moderado de las mismas podría ser beneficioso, posiblemente por conducir a una respuesta compensatoria estimulando los mecanismos endógenos de protección.

Los efectos derivados del tratamiento con epicatequina parecen, al menos en parte, estar mediados por la regulación de la **ruta de señalización de la insulina/IGF-1**, ya que una variedad de mutantes con pérdida de función en genes clave de esta ruta (*daf-2*, *age-1*, *akt-1*, *akt-2*; *sgk-1*, *daf-16*, *daf-18*, *skn-1* y *hsf-1*) no muestran el fenotipo termorresistente que este flavonoide proporciona en los gusanos silvestres. Por otra parte, la **epicatequina** también induce un aumento en la expresión de enzimas de fase II (GST-4) y de proteínas de choque térmico (HSP-16.2 y HSP-70), lo que mejoraría la capacidad de destoxificación y de eliminación de proteínas dañadas en el gusano. Estos mecanismos de acción no parecen verse modificados por la edad, aunque sus efectos son más acusados en etapas más avanzadas de la vida de *C. elegans*, en las que, como respuesta al tratamiento con epicatequina, se produce un acentuado aumento en la expresión de HSP-16.2, que en condiciones fisiológicas se encuentran disminuidas a causa del envejecimiento.

Al igual que en el caso de epicatequina, los genes *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *daf-18*, *sgk-1*, *daf-2*, *skn-1* y *hsp-16.2* también parecen estar implicados en la mejora de la resistencia al estrés observada tras el tratamiento con **quercetina**. Sin embargo, en este caso el efecto es independiente de *daf-16* y *hsf-1*. La implicación de *daf-2* y no de *daf-16* en los efectos de quercetina refuerza la idea de que existen señales aún no identificadas que también son reguladas por *daf-2*, aunque independientes de *daf-16*, que son esenciales para la extensión de la longevidad y la resistencia al estrés.

El mecanismo de acción implicado en los efectos de **quercetina** tampoco parece verse modificado por la edad del gusano, aunque, como para epicatequina, el tratamiento conduce a un aumento significativo en la expresión de las proteínas HSP-16.2 en gusanos mayores no observado en individuos jóvenes. Esta observación podría ser importante para explicar, al menos en parte, los efectos de aumento de vida media y mayor resistencia al estrés producidos por quercetina en *C. elegans*, ya que muchas proteínas de choque térmico se regulan positivamente al comienzo de la vida adulta para luego disminuir a lo largo de la vida.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de manifiesto que no se puede asignar un mecanismo único de acción a los flavonoides, sino que **pueden existir mecanismos diferentes según el compuesto**, como denota el hecho de que epicatequina y quercetina, aún compartiendo elementos comunes en su actividad, ejercen distinta influencia sobre algunos de los componentes reguladores de la ruta de la insulina/IGF-1. En definitiva, los mecanismos a través de los que los flavonoides y otros compuestos fenólicos pueden llegar a ejercer su actividad biológica son complejos y diversos, estando claro que van más allá del mero papel que clásicamente se les ha atribuido como antioxidantes. Es de esperar que en los próximos años se produzcan avances sustanciales en la elucidación de los mecanismos de acción de los flavonoides y otros compuestos fenólicos, así como en el conocimiento de los procesos biológicos que regulan el envejecimiento y otros procesos con base en el estrés oxidativo, favorecidos por el empleo de organismos modelo, como *C. elegans*, y de las nuevas técnicas moleculares y genómicas disponibles.



VI. BIBLIOGRAFÍA



- Abbas, S.; Wink, M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Medica*. (2009), 75, 216-221.
- Abbas, S.; Wink, M. Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signalling pathway. *Phytomedicine*. (2010), 17, 902-909.
- Abbas, S.; Wink, M. Green Tea Extract Induces the Resistance of *Caenorhabditis elegans* against Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*. (2014), 3, 129-43.
- Ahn, D.; Lee, E.B.; Kim, B.J.; Lee, S.Y.; Lee, T.G.; Ahn, M.S.; Lim, H.W.; Cha, D.S.; Jeon, H.; Kim, D.K. Antioxidant and lifespan extending property of quercetin-3-O-dirhamnoside from *Curcuma longa* L. in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*. (2014), 57, 709-714.
- Altintas, O.; Park, S.; Lee, S.J.V. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model in vertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Reports*. (2016), 49, 81-92.
- Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. (1993), 90, 7915-7922.
- An, J.H.; Blackwell, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & Development*. (2003), 17, 1882-93.
- An, J.H.; Vranas, K.; Lucke, M.; Inoue, H.; Hisamoto, N.; Matsumoto, K.; Blackwell, T.K. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2005), 102, 16275-16280.
- Andreoli, A.; Manini, P.; Corradi, M.; Mutti, A.; Niessen, W.M. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. (2003), 17, 637-645.
- Antebi, A. Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Genetics*. (2007), 3, e129.
- Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K.M.; Özyürek, M.; Glüçü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/ activity. *IUPAC Analytical Chemistry Division*. (2013), 85, 957-998.
- Appeldoorn, M.M.; Vincken, J.P.; Aura, A.M.; Hollman, P.C.; Gruppen, H. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone as the major metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2009), 57, 1084-1092.
- Arantes-Oliveira, N.; Apfeld, J.; Dillin, A.; Kenyon, C. Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. (2002), 295, 502-505.

- Aron, P.M.; Kennedy, J.A. Flavan-3-oles: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*. (2008), 52, 79-104.
- Arts, I.C.; Hollman, P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. (2005), 81, 317S-325S.
- Arts, I.C.; Hollman, P.C.; Feskens, E.J.; Bueno de Mesquita, H.B.; Kromhout, D. Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. *European Journal of Clinical Nutrition*. (2001), 55, 76-81.
- Arts, I.C.; Sesink, A.L.; Faassen-Peters, M.; Hollman, P.C. The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *The British Journal of Nutrition*. (2004), 91, 841-7.
- Asthana, J.; Mishra, B.N.; Pandey, R. Acacetin promotes healthy aging by altering stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Research*. (2016), 50, 861-74.
- Aura, A.M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*. (2008), 7, 407-429.
- Avery, S.V. Oxidative stress and cell function. En *Systems biology of free radicals and antioxidants*. Laher, I. (Ed.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. (2014), 89-112.
- Bahia, P.K.; Rattray, M.; Williams, R.J. Dietary flavonoid (-)epicatechin stimulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent anti-oxidant response element activity and up-regulates glutathione in cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. (2008), 106, 2194-2204.
- Balzer, J.; Rassaf, T.; Heiss, C.; Kleinbongard, P.; Lauer, T.; Merx, M.; Heussen, N.; Gross, H.B.; Keen, C.L.; Schroeter, H.; Kelm, M. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*. (2008), 51, 2141-2149.
- Bartholome, A.; Kampkötter, A.; Tanner, S.; Sies, H.; Klotz, L.O. Epigallocatechin gallate-induced modulation of FoxO signaling in mammalian cells and *C. elegans*: FoxO stimulation is masked via PI3K/Akt activation by hydrogen peroxide formed in cell culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (2010), 501, 68-64.
- Baruah, A.; Chang, H.; Hall, M.; Yuan, J.; Gordon, S.; Johnson, E.; Shtessel, L.L.; Yee, C.; Hekimi, S.; Derry, W.B.; Lee, S.S. CEP-1, the *Caenorhabditis elegans* p53 homolog, mediates opposing longevity outcomes in mitochondrial electron transport chain mutants. *PLoS Genetics*. (2014), e1004097.
- Baumeister, R.; Schaffitzel, E.; Hertweck, M. Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *The Journal of Endocrinology*. (2006), 190, 191-202.
- Benedetti, C.; Haynes, C.M.; Yang, Y.; Harding, H.P.; Ron, D. Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response. *Genetics*. (2006), 174, 229-239.

- Benetou, V.; Orfanos, P.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D.; Boffetta, P.; Trichopoulou, A. Vegetables and fruits in relation to cancer risk: evidence from the Greek EPIC cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. (2008), 17, 387-392.
- Bennett, C.F.; Wende, H.V.; Simko, M.; Klum, S.; Barfield, S.; Choi, H.; Pineda, V.V.; Kaeberlein, M. Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*. (2014), 5, 3483.
- Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. (1996), 239, 70-76.
- Berdichevsky, A.; Viswanathan, M.; Horvitz, H.R.; Guarente, L. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell*. (2006), 125, 1165-77.
- Bettuzzi, S.; Brausi, M.; Rizzi, F.; Castagnetti, G.; Peracchia, G.; Corti, A. Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Research*. (2006), 66, 1234–1240.
- Bird, A.F.; Bird, J. The structure of nematodes. S. Diego, CA: Academic Press. (1991).
- Bishop, N.A.; Guarente, L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*. (2007), 447, 545-549.
- Blackwell, T.K.; Bowerman, B.; Priess, J.R.; Weintraub, H. Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1bZIP and homeodomain elements. *Science*. (1994), 266, 621–628.
- Blackwell, T.K.; Steinbaugh, M.J.; Hourihan, J.M.; Ewald, C.Y.; Isik, M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology & Medicine*. (2015), 88, 290-301.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. (2003), 91, 179-94.
- Bo, Y.; Sun, J.; Wang, M.; Ding, J.; Lu, Q.; Yuan, L. Dietary flavonoid intake and the risk of digestive tract cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. (2016), 6, 24836.
- Bonomo, L.F.; Silva, D.N.; Boasquivis, P.F.; Paiva, F.A.; Guerra, J.F.; Martins, T.A.; de Jesus-Torres, Á.G.; de Paula, I.T.; Caneschi, W.L.; Jacolot, P.; Grossin, N.; Tessier, F.J.; Silva, M.E.; Pedrosa, M.L.; Oliveira, R.P. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLoS One*. (2014), 3, 9, e89933.
- Boots, A.W.; Haenen, G.R.; Bast, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. (2008), 585, 325-337.
- Bors, W.; Michel, C.; Stettmaier, K. Antioxidant effects of flavonoids. *BioFactors*. (1997), 6, 399-402.

- Bradford, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. (1976), 72, 248-254.
- Braeckman, B.P.; Vanfleteren, J.R. Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Experimental Gerontology*. (2007), 42, 90-8.
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. (1974), 77, 71-94.
- Brettschneider, J.; Del Tredici, K.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature Reviews Neurosciencie*. (2015), 16, 109-20.
- Brown, M.K.; Evans, J.L.; Luo, Y. Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and α -lipoic acid on lifespan and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological, Biochemical and Behavior*. (2006), 85, 620-628.
- Büchter, C.; Ackermann, D.; Havermann, S.; Honnen, S.; Chovolou, Y.; Fritz, G.; Kampkötter, A.; Wätjen, W. Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. *International journal of Molecular Sciences*. (2013), 14, 6, 11895-914.
- Büchter, C.; Ackermann, D.; Honnen, S.; Arnold, N.; Havermann, S.; Koch, K.; Wätjen, W. Methylated derivatives of myricetin enhance life span in *Caenorhabditis elegans* dependent on the transcription factor DAF-16. *Food & Function*. (2015), 6, 10, 3383-92.
- Buijsse, B.; Feskens, E.J.; Kok, F.J.; Kromhout, D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Archives of Internal Medicine*. (2006), 166, 411-7.
- Bulló, M.; Lamuela-Raventós, R.; Salas-Salvadó, J. Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oil as important sources of fat and antioxidants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. (2011), 11, 1797-1810.
- 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.
- Cai, W.J.; Huang, J.H.; Zhang, S.Q.; Wu, B.; Kapahi, P.; Zhang, X.M.; Shen, Z.Y. Icaritin and its derivative icariside II extend healthspan via insulin/IGF-1 pathway in *C. elegans*. *PLoS One*. (2011), 6, e28835.
- Castilla, P.; Davalos, A.; Teruel, J.L.; Cerrato, F.; Fernández-Lucas, M.; Merino, J.L.; Sánchez-Martín, C.C.; Ortuño, J.; Lasunción, M.A. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*. (2008), 87, 1053-61.
- Chaudhuri, A.R.; De Waal, E.M.; Pierce, A.; Remmen, H.V.; Ward, W.F.; Richardson, A. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: a fluorescence-based proteomic approach. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2006), 127, 849-861.

- Chen, D.; Li, P.W.; Goldstein, B.A.; Cai, W.; Thomas, E.L.; Chen, F.; Hubbard, A.E.; Melov, S.; Kapahi, P. Germline signaling mediates the synergistically prolonged longevity produced by double mutations in *daf-2* and *rsk-1* in *C. elegans*. *Cell Reports*. (2013), 5, 1600-1610.
- Chen, J.; Zhang, Z.; Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by *nrf2*: current status. *Diabetes & Metabolism Journal*. (2014), 38, 337-45.
- Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Wang, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*. (2010), 44, 587-604.
- Cheng, S.C.; Li, W.H.; Shi, Y.C.; Yen, P.L.; Lin, H.Y.; Liao, V.H.; Chang, S.T. Antioxidant activity and delayed aging effects of hot water extract from *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2014), 7, 62, 4159-65.
- Chiang, W.C.; Ching, T.T.; Lee, H.C.; Mousigian, C.; Hsu, A.L. HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity. *Cell*. (2012), 148, 322-334.
- Choi, D.Y.; Lee, Y.J.; Hong, J.T.; Lee, H.J. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Ressearch Bulletin*. (2012), 87, 144-53.
- Clifford, M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*. (2004), 70, 1103-1114.
- Corsi, A.K.; Wightman, B.; Chalfie, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. En *WormBook, the online review of C. elegans biology*. The *C. elegans* Research Community (Ed.). (2015), 1-31.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*. (1998), 61, 71-6.
- Cueva, C.; Gil-Sánchez, I.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. An Integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules*. (2017), 22, pii: E99.
- Dai, Q.; Borenstein, A.R.; Wu, Y.; Jackson, J.C.; Larson, E.B. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. *The American journal of medicine*. (2006), 119, 751-9.
- Dancy, B.M.; Sedensky, M.M.; Morgan, P.G. Effects of the mitochondrial respiratory chain on longevity in *C. elegans*. *Experimental Gerontology*. (2014), 56, 245-55.
- Darband, S.G.; Kaviani, M.; Yousefi, B.; Sadighparvar, S.; Pakdel, F.G.; Attari, J.A.; Mohebbi, I.; Naderi, S.; Majidinia, M. Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-

- preventive properties in colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*. (2018), 233, 6544-6560.
- Davison, K.; Howe, P.R. Potential implications of dose and diet for the effects of cocoa flavanols on cardiometabolic function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2015), 18, 63, 9942-9947.
- 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.; Gee, J.M.; DuPont, M.S.; Johnson, I.T.; Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology*. (2003), 65, 1199-1206.
- De Pascual-Teresa, S.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International journal of Molecular Sciences*. (2010), 11, 1679-1703. 20.
- De Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. Catechins intake in the Spanish diet. En *COST 916 - Bioactive compounds in plant foods. Health Effects and Perspectives for the Food Industry*. Amadó, R.; Abt, B.; Bravo, L.; Goñi, I.; Saura-Calixto, F. (Eds.). Tenerife, Spain: Office for Official Publications of the European Communities. (2002), 317-318.
- De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2000), 48, 5331-5337.
- Del Rio, D.; Rodríguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; 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, 1818-1891.
- Diebolt, M.; Bucher, B.; Andriantsitohaina, R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*. (2001), 38, 159-165.
- Dikalov, S.I.; Harrison, D.G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species *Antioxidants & Redox Signaling*. (2014), 20, 72-382.
- Donovan, J.L.; Manach, C.; Faulks, R.M.; Kroon, P.A. Absorption and metabolism of plant secondary metabolites. En *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Crozier, A.; Clifford, M.N.; Ashihara, H. (Eds.). Oxford, U.K: Wiley-Blackwell. (2006), 303-351.
- Dragsted, L.O.; Strube, M.; Leth, T. Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer?. *European Journal of Cancer Prevention*. (1997), 6, 522-528.

- Driscoll, M.; Kaplan, J. Mechanotransduction. En *C. elegans* II. Riddle, D.L.; Blumenthal, T.; Meyer, B.J.; Priess, J.R. (Eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1997), 645-677.
- Dueñas, M.; Cueva, C.; Muñoz-González, I.; Jiménez-Girón, A.; Sánchez-Patán, F.; Santos-Buelga, C.; Moreno-Arribas, M.V.; Bartolomé, B. Studies on modulation of gut microbiota by wine polyphenols: from isolated cultures to omic approaches. *Antioxidants*. (2015), 4, 1-21.
- Dueñas, M.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.; Santos-Buelga, C. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2010), 51, 443-449.
- Dueñas, M.; Surco-Laos, F.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga C. Antioxidant properties of major quercetin metabolites. *European Food Research and Technology*. (2011), 232, 103-111.
- Dueñas, M.; Surco-Laos, F.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Gómez-Orte, E.; Cabello, J.; Santos-Buelga, C. Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological research*. (2013), 76, 41-8.
- Durieux, J.; Wolff, S.; Dillin, A. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*. (2011), 144, 79-91.
- Erlund, I.; Kosonen, T.; Alfthan, G.; Mäenpää, J.; Perttunen, K.; Kenraali, J.; Parantainen, J.; Aro, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*. (2000), 56, 545-553.
- Ersus, S.; Yurdagel, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*. (2007), 80, 805-812
- Espín, J.C.; García-Conesa, M.T.; Tomás-Baberán, F.A. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*. (2007), 68, 2986-3008
- Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.I.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventós, R.M.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Basora, J.; Muñoz, M.A.; Sorlí, J.V.; Martínez, J.A.; Martínez-González, M.A. Retraction and republication: primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013; 368: 1279-90. *The New England journal of medicine*. (2018a), 378, 2441-2442.
- Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.I.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventós, R.M.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Basora, J.; Muñoz, M.A.; Sorlí, J.V.; Martínez, J.A.; Fitó, M.; Gea, A.; Hernán, J.A.; Martínez-González, M.A. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *The New England journal of medicine*. (2018b), 378, e34-e34.

- Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.I.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventos, R.M.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Basora, J.; Muñoz, M.A.; Sorlí, J.V.; Martínez, J.A.; Martínez-González, M.A. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine*. (2013), 368, 1279-1290.
- Evans, M.D.; Dizdaroğlu, M.; Cooke, M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*. (2004), 567, 1-61.
- Fares, H.; Grant, B. Deciphering endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Traffic*. (2002), 3, 11-19.
- Feliciano, R.P.; Istas, G.; Heiss, C.; Rodríguez-Mateos, A. Plasma and urinary phenolic profiles after acute and repetitive intake of wild blueberry. *Molecules*. (2016), 21, 1120.
- Fernandes, I.; Pérez-Gregorio, R.; Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Wine flavonoids in health and disease prevention. *Molecules*. (2017), 22.
- Fernandez, M.T.; Mira, M.L.; Florencio, M.H.; Jennings, K.R. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*. (2002), 92, 105-111.
- Fink, B.N.; Steck, S.E.; Wolff, M.S.; Britton, J.A.; Kabat, G.C.; Schroeder, J.C.; Teitelbaum, S.L.; Neugut, A.I.; Gammon, M.D. Dietary flavonoid intake and breast cancer risk among women on Long Island. *American Journal of Epidemiology*. (2007), 165, 514-23.
- Fisher, N.D.; Hughes, M.; Gerhard-Herman, M.; Hollenberg, N.K. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of Hypertension*. (2003), 21, 2281-2286.
- Fontana, A.R.; Antonioli, A.; Bottini, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2013), 61, 8987-9003.
- Fraga, C.G. Plant polyphenols: How to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB Life*. (2007), 59, 308-315.
- Fraga, C.G.; Galleano, M.; Verstraeten, S.V.; Oteiza, P.I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular aspects of medicine*. (2010), 31, 435-45.
- Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*. (2011), 51, 813-823.
- Frank, J.; Budek, A.; Lundh, T.; Parker, R.S.; Swanson, J.E.; Lourenço, C.F.; Gago, B.; Laranjinha, J.; Vessby, B.; Kamal-Eldin A. Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha-tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation *in vitro*. *Journal of Lipid Research*. (2006), 47, 2718-2725.

- Friedman, D.B.; Johnson, T.E. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics*. (1988), 118,75-86.
- Furuyama, T.; Nakazawa, T.; Nakano, I.; Mori, N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *The Biochemical Journal*. (2000), 349, 629-34.
- Gems, D.; McElwee, J.J. Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? *Mechanisms of Ageing and Development*. (2005), 126, 381-387.
- Gems, D.; Partridge, L. Genetics of longevity in model organisms: Debates and paradigm shifts. *Annual Review of Physiology*. (2013), 75, 621-644.
- Gems, D.; Partridge, L. Stress-response hormesis and aging: "That which does not kill us makes us stronger". *Cell Metabolis*. (2008), 7,200-203.
- Georgetti, S.R.; Casagrande, R.; Souza, C.R.F.; Oliveira, W.P.; Fonseca, M.J.V. Spray drying of the soybean extract: effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. (2008), 41, 1521-1527.
- Gerisch, B.; Antebi, A. Hormonal signals produced by DAF-9/ cytochrome P450 regulate *C. elegans* dauer diapause in response to environmental cues. *Development*. (2004), 131, 1765-1776.
- Gil-Sánchez, I.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Cueva, C.; Martín-Cabrejas, M.A.; Sanz-Buenhombre, M.; Guadarrama, A.; Moreno-Arribas, M.V.; Bartolomé, B. Chemical characterization and *in vitro* colonic fermentation of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (2017), 97, 3433-3444.
- Gladyshev, V.N. The free Radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxidants & Redox Signaling*. (2014), 20, 727-731.
- 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-Paramás, A.M.; Esteban-Ruano, S.; Santos-Buelga, C.; De Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2004), 52, 234-238.
- Granado-Serrano, A.B.; Martín, M.A.; Haegeman, G.; Goya, L.; Bravo, L.; Ramos, S. 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. *The British Journal of Nutrition*. (2010), 103, 168-79.

- Greer, E.L.; Dowlatshahi, D.; Banko, M.R.; Villen, J.; Hoang, K.; Blanchard, D.; Gygi, S.P.; Brunet, A. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Current Biology*. (2007), 17, 1646-1656.
- Grünz, G.; Haas, K.; Soukup, S.; Klingenspor, M.; Kulling, S.E.; Daniel, H.; Spanier, B. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2012), 133, 1-10.
- Gu, L.; Kelm, M.A.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S.; Prior, R. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of Nutrition*. (2004), 134, 613-617.
- Guarente, L.; Kenyon, C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*. (2000), 408, 255-262.
- Guasch-Ferré, M.; Merino, J.; Sun, Q.; Fitó, M.; Salas-Salvadó, J. Dietary polyphenols, mediterranean diet, prediabetes, and type 2 diabetes: a narrative review of the evidence. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. (2017), 6723931.
- Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (2008), 476, 107-112.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. third ed. Oxford :Oxford University Press. (1998).
- Hamilton, B.; Dong, Y.; Shindo, M.; Liu, W.; Odell, I.; Ruvkun, G.; Lee, S.S. A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes and Development*. (2005), 19, 1544-1555.
- Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. (1994), 16, 845-50.
- Hansen, M.; Hsu, A.L.; Dillin, A.; Kenyon, C. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen. *PLoS Genetics*. (2005), 1, 119-128.
- Harman, D. The biologic clock: the mitochondria?. *Journal of the American Geriatrics Society*. (1972), 20, 145-147.
- Hayes, J.D.; Dinkova-Kostova, A.T. TheNrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*. (2014), 39, 199-218.
- Haynes, C.M.; Ron, D. The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *Journal of Cell Science*. (2010), 123, 3849-55.
- Heidler, T.; Hartwig, K.; Daniel, H.; Wenzel, U. *Caenorhabditis elegans* lifespan extension caused by treatment with an orally active ROS-generator is dependent on DAF-16 and SIR-2.1. *Biogerontology*. (2010), 11, 183-195.

- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. (2002), 13, 572-584.
- Hekimi, S.; Burgess, J.; Bussière, F.; Meng, Y.; Bénard, C. Genetics of lifespan in *C. elegans*: molecular diversity, physiological complexity, mechanistic simplicity. *Trends in Genetics*. (2001), 17, 712-8.
- Hekimi, S.; Wang, Y.; Noë, A. Mitochondrial ROS and the Effectors of the Intrinsic Apoptotic Pathway in Aging Cells: The Discerning Killers! *Frontiers in Genetics*. (2016), 7, 161.
- 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.
- Hertog, M.G.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B.S.; Toshima, H.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*. (1995), 155, 381-386.
- Hervet, D.; Goñi, I. Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review. *Food Reviews International*. (2011), 27, 154-169.
- Hirsh, D.; Oppenheim, D.; Klass, M. Development of reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*. (1976), 49, 1, 200-219.
- Hodgkin, J. Sexual dimorphism and sex determination. En *The nematode C. elegans*. Wood, W.B. (Ed.). : New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1988), 9, 243-279.
- Hodgkin, J.; Horvitz, H.R.; Brenner, S. Nondisjunction mutants of the nematode *C. elegans*. *Genetics*. (1979), 91, 67-94.
- Hoeven, R.V.; McCallum, K.C.; Cruz, M.R.; Garsin, D.A. Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. Elegans*. *PLoS PathogENS*. (2011), 7, e1002453.
- Hogan, S.; Zhang, L.; Li, J.; Zoecklein, B.; Zhou, K. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *LWT-Food Science and Technology*. (2009), 42, 1269-1274.
- Hollman, P.C.; Cassidy, A.; Comte, B.; Heinonen, M.; Richelle, M.; Richling, E.; Serafini, M.; Scalbert, A.; Sies, H.; Vidry, S. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *The Journal of Nutrition*. (2011), 141, 989S-1009S.
- Holt, R.R.; Actis-Goretta, L.; Momma, T.Y.; Keen, C.L. Dietary flavanols and platelet reactivity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. (2006), 47, S187-96.

- Hong, Y.J.; Mitchell, A.E. Identification of glutathione-related quercetin metabolites in humans. *Chemical Research in Toxicology*. (2006), 19, 1525-1532.
- Honjoh, S.; Yamamoto, T.; Uno, M.; Nishida, E. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*. (2009), 457, 726-730.
- Hooper, L.; Kay, C.; Abdelhamid, A.; Kroon, P.A.; Cohn, J.S.; Rimm, E.B.; Cassidy, A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American Journal of Nutrition*. (2012), 95, 740-751.
- 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), 13, 369-374.
- Houtkooper, R.H.; Mouchiroud, L.; Ryu, D.; Moullan, N.; Katsyuba, E.; Knott, G.; Williams, R.W.; Auwerx, J. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature*. (2013), 497, 451-457
- Hsin, H.; Kenyon, C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature*. (1999), 399, 362-366.
- Hsu, A.; Coleen, T.; Kenyon, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*. (2003), 300, 1142-1145.
- Hwang, A.B.; Ryu, E.A.; Artan, M.; Chang, H.W.; Kabir, M.H.; Nam, H.J.; Lee, D.; Yang, J.S.; Kim, S.; Mair, W.B.; Lee, C.; Lee, S.S.; Lee, S.J. Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2014), 111, E4458-E4467.
- Inoue, H.; Hisamoto, N.; An, J.H.; Oliveira, R.P.; Nishida, E.; Blackwell, T.K.; Matsumoto, K. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes & Development*. (2005), 19, 2278-2283.
- Ishii, N.; Fujii, M.; Hartman, P.S.; Tsuda, M.; Yasuda, K.; Senoo-Matsuda, N.; Yanase, S.; Ayusawa, D.; Suzuki, K. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*. (1998), 394, 694-697.
- Jaganath, I.B.; Crozier, A. Dietary flavonoids and phenolic compounds. En *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*. Fraga, C.G. (Ed.). , USA: John Wiley & Sons: Hoboken NJ (2010), 1-48.
- Jara-Palacios, M.J.; González-Manzano, S.; Escudero-Gilete, M.L.; Hernanz, D.; Dueñas, M.; González-Paramás, A.M.; Heredia, F.J.; Santos-Buelga, C. Study of Zalema Grape Pomace: Phenolic Composition and Biological Effects in *Caenorhabditis Elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2013), 61, 5114-5121.

- Jovaisaite, V.; Mouchiroud, L.; Auwerx, J. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *The Journal of Experimental Biology*. (2014), 217, 137-43.
- Kaeberlein, M.; Kirkland, K.T.; Fields, S.; Kennedy, B.K. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biology*. (2004), 2, E296.
- Kaeberlein, M.; McVey, M.; Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development*. (1999), 13, 2570-2580.
- Kahn, N.W.; Rea, S.L.; Moyle, S.; Kell, A.; Johnson, T.E. Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical Journal*. (2008), 409, 205-213.
- Kaletta, T.; Hengartner, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews. Drug Discovery*. (2006), 5, 387-399.
- Kaliora, A.C.; Dedoussis, G.V. Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. *Pharmacological Research*. (2007), 56, 99-109
- Kampkötter, A.; Gombitang-Nkwonkam, C.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Toxicology*. (2007a), 81, 849-58.
- Kampkötter, A.; Nkwonkam, C.G.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*. (2007b), 234, 113-123.
- Kampkötter, A.; Pielarski, T.; Rohrig, R.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. The *Ginkgo biloba* Egb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological Research*. (2007c), 55, 139-147.
- Kampkötter, A.; Timpel, C.; Zurawski, R.F.; Ruhl, S.; Chovolou, Y.; Proksch, P.; Wätjen, W. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. (2008), 314-323.
- Kay, R.J.; Boissy, R.J.; Russnak, R.H.; Candido, E.P. Efficient transcription of a *Caenorhabditis elegans* heat shock gene pair in mouse fibroblasts is dependent on multiple promoter elements which can function bidirectionally. *Molecular and Cellular Biology*. (1986), 6, 3134-3143.
- Kensler, T.W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. (2007), 47, 89-116.

- Kenyon, C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell*. (2005), 120, 449-460.
- Kenyon, C.; Chang, J.; Gensch, E.; Rudner, A.; Tabtiang, R.A. *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. (1993), 366, 461-464.
- Kenyon, C.J. The genetics of ageing. *Nature*. (2010), 25, 464, 504-12.
- Kern, A.; Ackermann, B.; Clement, A.M.; Duerk, H.; Behl, C. HSF1-controlled and age-associated chaperone capacity in neurons and muscle cells of *C. elegans*. *PLoS One*. (2010), 5, e8568.
- Kim, D.H.; Feinbaum, R.; Alloing, G.; Emerson, F.E.; Garsin, D.A.; Inoue, H.; Tanaka-Hino, M.; Hisamoto, N.; Matsumoto, K.; Tan, M.W.; Ausubel, F.M. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science*. (2002), 297, 623-626.
- Kimura, K.D.; Tissenbaum, H.A.; Liu, Y.; Ruvkun, G. Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. (1997), 277, 942-946.
- Koch, K.; Havermann, S.; Büchter, C.; Wätjen, W. *Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: effects of flavonoids on redox-sensitive signalling pathways and ageing. *The Scientific World Journal*. (2014), 920398.
- Krammer, J.M. Structures and functions of collagens in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal*. (1994), 8, 329-336.
- Krikorian, R.; Nash, T.A.; Shidler, M.D.; Shukitt-Hale, B.; Joseph, J.A. Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *The British Journal of Nutrition*. (2010a), 103, 730-734.
- Krikorian, R.; Shidler, M.D.; Nash, T.A.; Kalt, W.; Vinqvist-Tymchuk, M.R.; Shukitt-Hale, B.; Joseph, J.A. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2010b), 58, 3996-4000.
- Kroon, P.A.; Clifford, M.N.; Crozier, A.; Day, A.J.; Donovan, J.L.; Manach, C.; Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*?. *The American Journal of Clinical Nutrition*. (2004), 80, 15-21.
- Kühnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*. (1976), 24, 117-191.
- Kyriakakis, E.; Markaki, M.; Tavernarakis, N. *Caenorhabditis elegans* as a model for cancer research. *Molecular Cellular Oncology*. (2015), 2, e975027.
- Labuschagne, C.F.; Brenkman, A.B. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Ageing Research Reviews*. (2013), 12, 918-930.
- Lambert, J.D.; Rice, J.E.; Hong, J.; Hou, Z.; Yang, C.S. Synthesis and biological activity of the tea catechin metabolites, M4 and M6 and their methoxy-derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. (2005), 15, 873-876.

- Lapierre, L.R.; Gelino, S.; Melendez, A.; Hansen, M. Autophagy and lipid metabolism coordinately modulate life span in germline-less *C. elegans*. *Current Biology*. (2011), 21, 1507-1514.
- Lapierre, L.R.; Hansen, M. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. (2012), 23, 637-44.
- Lapointe, J.; Hekimi, S. When a theory of aging badly. *Cellular and Molecular Life Sciences*. (2010), 67, 1-8.
- Lapointe, J.; Stepanyan, Z.; Bigras, E.; Hekimi, S. Reversal of the mitochondrial phenotype and slow development of oxidative biomarkers of aging in long-lived Mcl1^{+/-} Mice. *The Journal of Biological Chemistry*. (2009), 284, 20364-20374.
- Laranjinha, J.; Vieira, O.; Madeira, V.; Almeida, L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (1995), 323, 373-381.
- Laranjinha, J.A.; Almeida, L.M.; Madeira, V.M. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*. (1994), 3, 48, 487-94.
- Larsson, S.C.; Andersson, S.O.; Johansson, J.E.; Wolk, A. Fruit and vegetable consumption and risk of bladder cancer: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. (2008), 17, 2519-2522.
- Lee, S.J.; Hwang, A.B.; Kenyon, C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Current Biology*. (2010), 20, 2131-2136.
- Lee, S.S.; Lee, R.Y.N.; Fraser, A.G.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Ruvkun, G. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nature Genetics*. (2003), 33, 40-48.
- Lehtinen, M.K.; Yuan, Z.; Boag, P.R.; Yang, Y.; Villén, J.; Becker, E.B.; DiBacco, S.; de la Iglesia, N.; Gygi, S.; Blackwell, T.K.; Bonni, A. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*. (2006), 125, 987-1001.
- Lewandowska, U.; Szewczyk, K.; Owczarek, K.; Hrabec, Z.; Podsędek, A.; Sosnowska, D.; Hrabec, E. Procyanidins from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds inhibit invasiveness of breast cancer cells and modulate the expression of selected genes involved in angiogenesis, metastasis, and apoptosis. *Nutrition and Cancer*. (2013), 65, 1219-1231.
- Lewis, J.A.; Fleming, J.T. Basic culture methods. En *Caenorhabditis elegans: modern biological analysis of an organism*. Epstein, H.; Shakes, D. (Eds.). California: Academic Press. (1995), 4-27.

- Li, N.; Sun, Z.; Han, C.; Chen, J. The chemopreventive effects of tea on human oral precancerous mucosa lesions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. (1999), 220, 218-224.
- Li, W.; Gao, B.; Lee, S.M.; Bennett, K.; Fang, D. RLE-1, an E3 ubiquitin ligase, regulates *C. elegans* aging by catalyzing DAF-16 polyubiquitination. *Developmental Cell*. (2007), 12, 235-246.
- Lin, K.; Dorman, J.B.; Rodan, A.; Kenyon, C. daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*. (1997a), 278, 1319-1322.
- Lin, K.; Hsin, H.; Libina, N.; Kenyon, C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nature Genetics*. (2001), 28, 139-145.
- Lin, S.J.; Guarente, L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Current Opinion in Cell Biology*. (2003), 15, 241-46.
- Lin, S.J.; Kaeberlein, M.; Andalis, A.A.; Sturtz, L.A.; Defossez, P.A.; Culotta, V.C.; Fink, G.R.; Guarente, L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*. (2002), 418, 344-348.
- Lin, Y.L.; Lin, J.K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Molecular Pharmacology*. (1997b), 52, 465-472.
- Lindsay, J.; Laurin, D.; Verreault, R.; Hebert, R.; Helliwell, B.; Hill, G.B.; McDowell, I. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology*. (2002), 156, 445-453.
- Liu, X.; Jiang, N.; Hughes, B.; Bigras, E.; Shoubridge, E.; Hekimi, S. Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes & Development*. (2005), 19, 2424-34.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. (2001), 25, 402-408.
- López-Alarcón, C.; Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*. (2013), 763, 1-10.
- Losada-Barreiro, S.; Bravo-Díaz, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. (2017), 133, 379-402.
- Lowe, F. Biomarkers of oxidative stress. En *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Laher, I. (Ed.). : Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. (2014), 65-87.

- Lü, J.M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. (2010), 14, 840-60.
- Lund, J.; Tedesco, P.; Duke, K.; Wang, J.; Kim, S.K.; Johnson, T.E. Transcriptional profile of aging in *C. elegans*. *Current Biology*. (2002), 12, 1566-1573.
- Malar, D.S.; Devi, K.P. Dietary polyphenols for treatment of Alzheimer's disease future research and development. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. (2014), 15, 330-42.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. (2005), 81, S230-42.
- Mandel, S.A.; Amit, T.; Weinreb, O.; Reznichenko, L.; Youdim, M.B. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. (2008), 14, 352-365.
- Mansuri, M.L.; Parihar, P.; Solanki, I.; Parihar, M.S. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes & Nutrition*. (2014), 9, 400.
- Marín, L.; Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*. (2015), 905215.
- Martinez-Finley, E.J.; Chakraborty, S.; Slaughter, J.C.; Aschner, M. Early-life exposure to methylmercury in wildtype and pdr-1/parkin knockout *C. elegans*. *Neurochemical Research*. (2013), 38, 1543-52.
- Martorell, P.; Vicent-Forment, P.; De Llanos, R.; Montón, F.; Llopis, S.; González, N.; Genovés, S.; Cienfuegos, E.; Monzó, H.; Ramón, D. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2011), 59, 2077-2085.
- McCullough, M.L.; Chevaux, K.; Jackson, L.; Preston, M.; Martinez, G.; Schmitz, H.H.; Coletti, C.; Campos, H.; Hollenberg, N.K. Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. (2006), 47, S103-109.
- Menéndez, C.; Dueñas, M.; Galindo, P.; González-Manzano, S.; Jimenez, R.; Moreno, L.; Zarzuelo, M.J.; Rodríguez-Gómez, I.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C.; Perez-Vizcaino, F. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed?. *Molecular Nutrition & Food Research*. (2011), 55, 1780-1790.
- Meng, J.; Lv, Z.; Qiao, X.; Li, X.; Li, Y.; Zhang, Y.; Chen, C. The decay of redox-stress response capacity is a substantive characteristic of aging: revising the redox theory of aging. *Redox Biology*. (2017), 11, 365-374.

- Mertenskötter, A.; Keshet, A.; Gerke, P.; Paul, R.J. The p38 MAPK PMK-1 shows heat-induced nuclear translocation, supports chaperone expression, and affects the heat tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress & Chaperones*. (2013), 18, 293-306.
- Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickançaité, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine*. (1999), 26, 107-116.
- Middleton E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. (2000), 52, 673-751.
- Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M.H.; Jennings, K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*. (2002), 36, 1199-1208.
- Miranda-Vizueté, A.; Veal, E.A. *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. *Redox Biology*. (2017), 11, 708-714.
- 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.
- Moerman, D.G.; Fire, A. Muscle: Structure, function and development. En *C. elegans* II. Riddle, D.L.; Blumenthal, T.; Meyer, B.J.; Priess, J.R. (Eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1997), 417-470.
- Mohanty, J.G.; Bhamidipaty, S.; Evans, M.K.; Rifkind, J.M. A fluorimetric semi-microplate format assay of protein carbonyls in blood plasma. *Analytic Biochemistry*. (2010), 400, 289-294.
- Monagas, M.; Garrido, I.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, M.C. Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Analytica Chimica Acta*. (2006), 563, 401-410.
- Morley, J.F.; Morimoto, R.I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Molecular Biology of the Cell*. (2004), 15, 657-64.
- Moro-González, C. Extraction process of polyphenols from grape pomace from distillation. Spanish Patent ES2319032A1. (2009).
- Mullen, W.; Rouanet, J.M.; Auger, C.; Teissèdre, P.L.; Caldwell, S.T.; Hartley, R.C.; Lean, M.E.; Edwards, C.A.; Crozier, A. Bioavailability of [2-¹⁴C]Quercetin-4'-glucoside in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2008), 56, 12127-12137.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. (1986), 51, 1, 263-73.

- Murota, K.; Nakamura, Y.; Uehara, M. Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. (2018), 82, 600-610.
- Murphy, C.T.; Hu, P.J. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. En *WormBook*. The *C. elegans* Research Community (Ed.). (2013), 1-43.
- Murphy, C.T.; McCarroll, S.A.; Bargmann, C.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. (2003), 424, 277-83.
- Muzolf, M.; Szymusiak, H.; Gliszczynska-Swiglo, A.; Rietjens, I.M.; Tyrakowska, B. pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2008), 56, 816-823.
- Myhre, O.; Andersen, J.M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. Evaluation of probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*. (2003), 65, 1575-1582.
- Nakamura, T.; Murota, K.; Kumamoto, S.; Misumi, K.; Bando, N.; Ikushiro, S.; Takahashi, N.; Sekido, K.; Kato, Y.; Terao, J. Plasma metabolites of dietary flavonoids after combination meal consumption with onion and tofu in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. (2014), 58, 310-317.
- Nehlig, A. The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British Journal of Clinical Pharmacology*. (2013), 75, 716-727.
- Nelson, F.K.; Riddle, D.L. Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory excretory system using laser microsurgery. *The Journal of Experimental Zoology*. (1984), 231, 45-56.
- Nguyen, T.; Nioi, P.; Pickett, C.B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. (2009), 284, 13291-5.
- Ogg, S.; Paradis, S.; Gottlieb, S.; Patterson, G.I.; Lee, L.; Tissenbaum, H.A.; Ruvkun, G. The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*. (1997), 389, 994-999.
- Ogg, S.; Ruvkun, G. The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Molecular Cell*. (1998), 2, 887-893.
- Oh, J.S.; Kim, H.; Vijayakumar, A.; Kwon, O.; Kim, Y.; Chang, N. Association of dietary flavonoid intake with prevalence of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk factors in Korean women aged ≥ 30 years. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*. (2017), 63, 51-58.
- Oh, S.W.; Mukhopadhyay, A.; Svrzikapa, N.; Jiang, F.; Davis, R.J.; Tissenbaum, H.A. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2005), 102, 4494-4499.

- Oikonomou, G.; Shaham, S. The glia of *Caenorhabditis elegans*. *Glia*. (2011) , 59, 1253-1263.
- Okamoto, T.; Kobayashi, R.; Natsume, M.; Nakazato, K. Habitual cocoa intake reduces arterial stiffness in postmenopausal women regardless of intake frequency: a randomized parallel-group study. *Clinical Interventions in Aging*. (2016), 11, 1645-1652.
- O'Leary, K.A.; Day, A.J.; Needs, P.W.; Mellon, F.A.; O'Brien, N.M.; Williamson, G. 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. *Biochemical Pharmacology*. (2003), 65, 479-491.
- Osakabe, N. Flavan 3-ols improve metabolic syndrome risk factors: evidence and mechanisms. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. (2013), 52, 186-92.
- Paiva, F.A.; Bonomo, L.F.; Boasquavis, P.F.; de Paula, I.T.; Guerra, J.F.; Leal, W.M.; Silva, M.E.; Pedrosa, M.L.; Oliveira, R.P. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stress and β -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*. (2015), 740162.
- Panchatcharam, M.; Miriyala, S.; Gayathri, V.S.; Suguna, L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry*. (2006), 290, 87-96.
- Pavelescu, L.A. On reactive oxygen species measurement in living systems. *Journal of Medicine and Life*. (2015), 8, 38-42.
- Peng, X.; Zhang, Z.; Zhang, N.; Liu, L.; Li, S.; Wei, H. *In vitro* catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Food & Nutrition Research*. (2014), 58, 23406.
- Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*. (2010), 64, 3, 112-20.
- Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (2012), 92, 1822-1825.
- Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*. (2009), 53, 75-100.
- Pietsch, K.; Saul, N.; Chakrabarti, S.; Stürzenbaum, S.R.; Menzel, R.; Steinberg, C.E. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology*. (2011), 12, 329-47.
- Pietsch, K.; Saul, N.; Menzel, R., Stürzenbaum, S.R.; Steinberg, C.E. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology*. (2009), 10, 565-578.

- Pietsch, K.; Saul, N.; Swain, S.C.; Menzel, R.; Steinberg, C.E.; Stürzenbaum, S.R. Meta-Analysis of Global Transcriptomics Suggests that Conserved Genetic Pathways are Responsible for Quercetin and Tannic Acid Mediated Longevity in *C. elegans*. *Frontiers in Genetics*. (2012), 5, 3, 48.
- Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. (2000), 63, 1035-42.
- Poquet, L.; Clifford, M.N.; Williamson, G. Bioavailability of flavanols and phenolic acids. En *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*. Fraga, C.G. (Ed.). Hoboken NJ, USA: John Wiley & Sons. (2009), 51-89.
- Prior, R.L.; Xianli, W.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2005), 53, 4290-4302.
- Queen, B.L.; Tollefsbol, T.O. Polyphenols and aging. *Current Aging Science*. (2010), 3, 34-42.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. (1999), 26, 1231-1237.
- Rea, S.L.; Wu, D.; Cypser, J.R.; Vaupel, J.W.; Thomas, E.J. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics*. (2005), 37, 894-898.
- Rechner, A.R.; Smith, M.A.; Kuhnle, G.; Gibson, G.R.; Debnam, E.S.; Srai, S.K.S.; Moore, K.P.; Rice-Evans, C.A. Colonic metabolism of dietary polyphenol: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*. (2004), 36, 212-225.
- 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.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. (1996), 20, 933-56.
- Riddle, D.L.; Blumenthal, T.; Meyer, B.J.; Priess, J.R. *C. elegans* II. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1997).
- Ristow, M.; Schmeisser, K. Mitohormesis: Promoting health and lifespan by 593 increased levels of reactive oxygen species (ROS). *Dose-Response*. (2014), 12, 288-341.
- Robida-Stubbs, S.; Glover-Cutter, K.; Lamming, D.W.; Mizunuma, M.; Narasimhan, S.D.; Neumann-Haefelin, E.; Sabatini, D.M.; Blackwell, T.K. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metabolism*. (2012), 15, 713-724.
- Rockenbach, I.I.; Rodrigues, E.; Gonzaga, L.V.; Caliari, V.; Genovese, M.I.; Gonçalves, A.E.; Fett, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red

- grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*. (2011), 127, 174-179.
- Rodríguez-Mateos, A.; Vauzour, D.; Krueger, C.G.; Shanmuganayagam, D.; Reed, J.; Calani, L.; Mena, P.; Del Rio, D.; Crozier, A. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of Toxicology*. (2014), 88, 1803-53.
- Sánchez-Blanco, A.; Rodríguez-Matellán, A.; González-Paramás, a.; González-Manzano, S.; Kim, S.K.; mollinedo, F. Dietary and microbiome factors determine longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Aging-US*. (2016), 8, 1513-1539.
- Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Flavonoids: functions, metabolism and biotechnology. En *Industrial Biotechnology of Vitamins, Pigments, and Antioxidants*. Edited by Vandamme, E.J.; Revuelta, J.L. (Eds.). John Wiley & Sons: Weinheim, Germany. (2016), 469-496.
- Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Strategies in the analysis of flavonoids. En *Handbook of chemical and biological plant analytical methods*. Hostettmann, K.; Stuppner, H.; Marston, A.; Chen, S. (Eds.). Switzerland: John Wiley & Sons. (2014), 543-569.
- Sanz, A. Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan?. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2016), 1857, 1116-1126.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Steinberg, C.E. Quercetin- mediated longevity in *C. elegans*: Is DAF-16 involved? *Mechanisms of Ageing and Development*. (2008), 129, 10, 611-613.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R.; Steinberg, C.E. 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. Diversity of Polyphenol Action in *Caenorhabditis elegans*: Between Toxicity and Longevity. *Journal of Natural Products*. (2011), 74, 1713-1720.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (2005), 45, 287-306.
- Scarmeas, N.; Stern, Y.; Mayeux, R.; Luchsinger, J.A. Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation. *Archives of Neurology*. (2006), 63, 1709-17.
- Schmeisser, S.; Schmeisser, K.; Weimer, S.; Groth, M.; Priebe, S.; Fazius, E.; Kuhlow, D.; Pick, D.; Einax, J.W.; Guthke, R.; Platzer, M.; Zarse, K.; Ristow, M. Mitochondrial hormesis links low-dose arsenite exposure to lifespan extension. *Aging Cell*. (2013), 12, 508-517.
- Scholey, A.B.; French, S.J.; Morris, P.J.; Kennedy, D.O.; Milne, A.L.; Haskell, C.F. Consumption of cocoa flavanols results in acute improvements in mood and cognitive performance during sustained mental effort. *Journal of Psychopharmacology*. (2010), 24, 1505-1514.

- Schroeter, H.; Heiss, C.; Balzer, J.; Kleinbongard, P.; Keen, C.L.; Hollenberg, N.K.; Sies, H.; Kwik-Urbe, C.; Schmitz, H.H.; Kelm, M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. (2006), 24, 103, 1024-9.
- Schulz, T.J.; Zarse, K.; Voigt, A.; Urban, N.; Birringer, M.; Ristow, M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metabolism*. (2007), 6, 280-293.
- Schuster, E.; McElwee, J.J.; Tullet, J.M.; Doonan, R.; Matthijssens, F.; Reece-Hoyes, J.S.; Hope, I.A.; Vanfleteren, J.R.; Thornton, J.M., Gems, D. DamID in *C. elegans* reveals longevity-associated targets of DAF-16/FoxO. *Molecular Systems Biology*. (2010), 6, 399.
- Selma, M.V.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2009), 57, 6485-501.
- Sheaffer, K.L.; Updike, D.L.; Mango, S.E. The target of rapamycin pathway antagonizes pha-4/FoxA to control development and aging. *Current Biology*. (2008), 18, 1355-1364.
- Shen, P.; Yue, Y.; Zheng, J.; Park, Y. *Caenorhabditis elegans*: A convenient *in vivo* model for assessing the impact of food bioactive components on obesity, aging, and alzheimer's disease. *Annual Review of Food Science and Technology*. (2018), 9, 1-22.
- Shiba, Y.; Kinoshita, T.; Chuman, H.; Taketani, Y.; Takeda, E.; Kato, Y.; Naito, M.; Kawabata, K.; Ishisaka, A.; Terao, J.; Kawai, Y. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. *Chemical Research in Toxicology*. (2008), 21, 1600-1609.
- Shih, P.H.; Yeh, C.T.; Yen, G.C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2007), 55, 9427-35.
- Shrime, M.G.; Bauer, S.R.; McDonald, A.C.; Chowdhury, N.H.; Coltart, C.E.; Ding, E.L. Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a metaanalysis of short-term studies. *The Journal of Nutrition*. (2011), 141, 1982-1988.
- Silverman, G.A.; Luke, C.J.; Bhatia, S.R.; Long, O.S.; Vetica, A.C.; Perlmutter, D.H.; Pak, S.C. Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatric Research*. (2009), 65, 10-8.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. (1965), 16, 144-158.
- Sobeh, M.; Mahmoud, M.F.; Abdelfattah, M.A.O.; Cheng, H.; El-Shazly, A.M.; Wink, M. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. (2018), 1, 213, 38-47.

- Sohal, R.S.; Orr, W.C. The redox stress hypothesis of aging. *Free Radical Biology & Medicine*. (2012), 52, 539-555.
- Solomon, A.; Bandhakavi, S.; Jabbar, S.; Shah, R.; Beitel, G.J.; Mori-moto, R.I. *Caenorhabditis elegans* OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyper osmotic environments. *Genetics*. (2004), 167, 161-170. .
- Strayer, A.; Wu, Z.; Christen, Y.; Link, C.D.; Luo, Y. Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *FASEB Journal*. (2003), 17, 2305-7.
- Sulston, J.; Hodgkin, J. Methods. En *The nematode C. elegans*. Wood, W.B. (Ed.). New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1988), 587-606.
- 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.
- Sunagawa, T.; Shimizu, T.; Kanda, T.; Tagashira, M.; Sami, M.; Shirasawa, T. Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Medica*. (2011), 77, 122-127.
- Surco-Laos, F.; Cabello, J.; Gómez-Orte, E.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M. Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*. (2011), 2, 445-56.
- Surco-Laos, F.; Dueñas, M.; González-Manzano, S.; Juan Cabello, J.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Research International*. (2012), 46, 514-521.
- Surh, Y.J.; Kundu, J.K.; Na, H.K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*. (2008), 74, 13, 1526-1539.
- Takahashi, Y.; Daitoku, H.; Hirota, K.; Tamiya, H.; Yokoyama, A.; Kako, K.; Nagashima, Y.; Nakamura, A.; Shimada, T.; Watanabe, S.; Yamagata, K.; Yasuda, K.; Ishii, N.; Fukamizu, A. Asymmetric arginine dimethylation determines life span in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16. *Cell Metabolism*. (2011), 13, 505-516.
- Tang, S.; Chen, H.; Cheng, Y.; Nasir, M.A.; Kemper, N.; Bao, E. The interactive association between heat shock factor 1 and heat shock proteins in primary myocardial cells subjected to heat stress. *International Journal of Molecular Medicine*. (2016), 37, 56-62.
- Tang, S.Y.; Halliwell, B. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*. (2010), 394, 1-5.

- Terao, J. Flavonols: metabolism, bioavailability, and health impacts. En *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*. Fraga, C.G. (Ed.). Hoboken NJ, USA: John Wiley & Sons. (2009), 185-196.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. (1998), 282, 2012-2018.
- Tissenbaum, H. A.; Guarente, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. (2001), 410, 227-230.
- Tissenbaum, H.A. Using *C. elegans* for aging research. *Invertebrate Reproduction & Development*. (2015), 59-63.
- Treml, J; Smejkal, K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. (2016), 720-78.
- Troemel, E.R.; Chu, S.W.; Reinke, V.; Lee, S.S.; Ausubel, F.M.; Kim, D.H. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genetics*. (2006), 2, e183 .
- Tullet, J.M. DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future. *Biogerontology*. (2015), 16, 221-34.
- Tullet, J.M.; Hertweck, M.; An, J.H.; Baker, J.; Hwang, J.Y.; Liu, S.; Oliveira, R.P.; Baumeister, R.; Blackwell, T.K. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell*. (2008), 132, 1025-38.
- Tullet, J.M.A.; Green, J.W.; Au, C.; Benedetto, A.; Thompson, M.A.; Clark, E.; Gilliat, A.F.; Young, A.; Schmeisser, K.; Gems, D. The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging Cell*. (2017), 16, 1191-1194.
- Turati, F.; Rossi, M.; Pelucchi, C.; Levi, F.; La Vecchia, C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *The British Journal of Nutrition*. (2015), 113 (suppl.2), 102S-105.
- Uchida, K.; Shiraishi, M.; Naito, Y.; Torii, Y.; Nakamura, Y.; Osawa, T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *The Journal of biological chemistry*. (1999), 274, 2234-2242.
- Uno, M.; Nishida, E. Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*. (2016), 2, 16010.
- Upadhyay, A.; Chompoo, J.; Taira, N.; Fukuta, M.; Tawata, S. Significant longevity-extending effects of *Alpinia zerumbet* leaf extract on the life span of *Caenorhabditis elegans*. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. (2013), 77, 217-23.

- Valdés, L.; Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; González, S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food & Function*. (2015), 6, 2424-39.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of Biochemistry & Biology*. (2007), 39, 44-84.
- Van Raamsdonk, J.M.; Hekimi, S. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Genetics*. (2009), 5, 1000361.
- Van Raamsdonk, J.M.; Hekimi, S. Recative Oxigen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Causal Relationship?. *Antioxidants & Redox*. (2010), 13, 1911-1953.
- Van Raamsdonk, J.M.; Hekimi, S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2012), 109, 5785-90.
- Van Remmen, H.; Ikeno, Y.; Hamilton, M.; Pahlavani, M.; Wolf, N.; Thorpe, S.R.; Alderson, N.L.; Baynes, J.W.; Epstein, C.J.; Huang, T.T.; Nelson, J.; Strong, R.; Richardson, A. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological Genomics*. (2003), 16, 29-37.
- Vitale, M.; Vaccaro, O.; Masulli, M.; Bonora, E.; Del Prato, S.; Giorda, C.B.; Nicolucci, A.; Squatrito, S.; Auciello, S.; Babini, A.C.; Bani, L.; Buzzetti, R.; Cannarsa, E.; Cignarelli, M.; Cigolini, M.; Clemente, G.; Coccozza, S.; Corsi, L.; D'Angelo, F.; Dall'Aglio, E.; Di Cianni, G.; Fontana, L.; Gregori, G.; Grioni, S.; Giordano, C.; Iannarelli, R.; Iovine, C.; Lapolla, A.; Lauro, D.; Laviola, L.; Mazzucchelli, C.; Signorini, S.; Tonutti, L.; Trevisan, R.; Zamboni, C.; Riccardi, G.; Rivellese, A.A. TOSCA. Polyphenol intake and cardiovascular risk factors in a population with type 2 diabetes: The TOSCA.IT study. *Clinical Nutrition*. (2017), 36, 1686-1692.
- Vogiatzoglou, A.; Mulligan, A.A.; Lentjes, M.A.; Luben, R.N.; Spencer, J.P.; Schroeter, H.; Khaw, K.T.; Kuhnle, G.G. Flavonoid intake in European adults (18 to 64 years). *PLoS One*. (2015), 26, 10, e0128132.
- Walgren, R.A.; Lin, J.T.; Kinne, R.K.; Walle, T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (2000), 294, 837-843.
- Walker, G.A.; Lithgow, G.J. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell*. (2003), 2, 131-139.
- Walker, G.A.; White, T.M.; McColl, G.; Jenkins, N.L.; Babich, S.; Candido, E.P.; Johnson, T.E.; Lithgow, G.J. Heat shock protein accumulation is upregulated in a long-lived mutant of *Caenorhabditis elegans*. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*. (2001), 56, B281-7.

- Walter, L.; Baruah, A.; Chang, H.W.; Pace, H.M.; Lee, S.S. The homeobox protein CEH-23 mediates prolonged longevity in response to impaired mitochondrial electron transport chain in *C. elegans*. *PLoS Biology*. (2011), 9, e1001084.
- Wang, H.; Joseph, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*. (1999), 27, 612-616.
- Wang, H.C.; Brumaghim, J.L. Polyphenol compounds as antioxidants for disease prevention: reactive oxygen species scavenging, enzyme regulation, and metal chelation mechanisms in *e. coli* and human cells. En *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*. Andreescu, S.; Hepel, M. (Ed.). Washington, DC: ACS Symposium Series, American Chemical Society. (2011), 5, 99–175.
- Ward, S.; Thomson, J.; White, J.; Brenner, S. Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *C. elegans*. *Journal of Comparative Neurology*. (1975), 160, 313-337.
- Wei, C.C.; Yu, C.W.; Yen, P.L.; Lin, H.Y.; Chang, S.T.; Hsu, F.L.; Liao, V.H. Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- β toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2014), 62, 10701-7.
- Willett, W.C.; Sacks, F.; Trichopoulou, A.; Drescher, G.; Ferro-Luzzi, A.; Helsing, E.; Trichopoulos, D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American Journal of Clinical Nutrition*. (1995), 61, (suppl.), 1402S-1406S.
- Williamson, G.; Clifford, M.N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?. *The British Journal of Nutrition*. (2010), 104, S48-S66.
- Williamson, G.; Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. (2005), 81, (suppl.1), 243S-255S.
- Wilson, M.A.; Shukitt-Hale, B.; Kalt, W.; Ingram, D.K.; Joseph, J.A.; Wolkow, C.A. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. (2006), 5, 59-68.
- Wolff, S.; Ma, H.; Burch, D.; Maciel, G.A.; Hunter, T.; Dillin, A. SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. *Cell*. (2006), 124, 1039-1053.
- Wong, A.; Boutis, P.; Hekimi, S. Mutations in the elk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics*. (1995), 139, 1247-1259.
- Wood, W.B. The nematode *Caenorhabditis elegans*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).
- Wormbase release WS 262. Wormbase: nematode information resource. http://www.wormbase.org/about/wormbase_release_WS262#10—10

- Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. (2006), 124, 471-484.
- Xiong, L.G.; Chen, Y.J.; Tong, J.W.; Gong, Y.S.; Huang, J.A.; Liu, Z.H. Epigallocatechin-3-gallate promotes healthy lifespan through mitohormesis during early-to-mid adulthood in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biology*. (2018), 14, 305-315.
- Xiong, L.G.; Huang, J.A.; Li, J.; Yu, P.H.; Xiong, Z.; Zhang, J.W.; Gong, Y.S.; Liu, Z.H.; Chen, J.H. Black tea increased survival of *Caenorhabditis elegans* under stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2014), 62, 11163-11169.
- Xue, Y.L.; Ahiko, T.; Miyakawa, T.; Amino, H.; Hu, F.; Furihata, K.; Kita, K.; Shirasawa, T., Sawano, Y.; Tanokura, M. Isolation and *Caenorhabditis elegans* lifespan assay of flavonoids from onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2011), 59, 5927-5934.
- Yang, J.; Xiao, X.Y. Grape phytochemicals and associated health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (2013), 53, 1202-1225.
- Yang, W.; Hekimi, S. A. Mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Biology*. (2010), 8, 12, 1000556.
- Yang, Y.C.; Lu, F.H.; Wu, J.S.; Wu, C.H.; Chang, C.J. The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Archives Internal Medicine*. (2004), 164, 1534-1540.
- Yokoyama, K.; Fukumoto, K.; Murakami, T.; Harada, S.; Hosono, R.; Wadhwa, R.; Mitsui, Y.; Ohkuma, S. Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Letters*. (2002), 516, 53-57
- Yu, C.W.; Wei, C.C.; Liao, V.H. Curcumin-mediated oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *age-1*, *akt-1*, *pdk-1*, *osr-1*, *unc-43*, *sek-1*, *skn-1*, *sir-2.1*, and *mev-1*. *Free Radical Research*. (2014), 48, 371-9.
- Yu, J.; Ahmedna, M. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*. (2013), 48, 221-237.
- Yuan, J.M.; Sun, C.; Butler, L.M. Tea and cancer prevention: epidemiological studies. *Pharmacological Research*. (2011), 64, 123-35.
- Zamora-Ros, R.; Rabassa, M.; Cherubini, A.; Urpí-Sardà, M.; Bandinelli, S.; Ferrucci, L.; Andres-Lacueva, C. High concentrations of a urinary biomarker of polyphenol intake are associated with decreased mortality in older adults. *Journal of Nutrition*. (2013), 143, 1445-1450.
- Zamora-Ros, R.; Touillaud, M.; Rothwell, J.A.; Romieu, I.; Scalbert, A. Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *The American Journal of Clinical Nutrition*. (2014), 100, 11-26.
- Zhang, J.; Lu, L.; Zhou, L. Oleanolic acid activates daf-16 to increase lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2015a), 25, 468, 843-9.

-
- Zhang, L.; Jie, G.; Zhang, J.; Zhao, B. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radical Biology and Medicine*. (2009), 46, 414-421.
- Zhang, P.; Judy, M.; Lee, S.J.; Kenyon, C. Direct and indirect gene regulation by a life-extending foxo protein in *C. elegans*: roles for gata factors and lipid gene regulators. *Cell Metabolism*. (2013), 17, 85-100.
- Zhang, X.; Dong, D.; Wang, H.; Ma, Z.; Wang, Y.; Wu, B. Stable knock-down of efflux transporters leads to reduced glucuronidation in UGT1A1-overexpressing HeLa cells: the evidence for glucuronidation-transport interplay. *Molecular Pharmaceutics*. (2015b), 12, 1268-1278.
- Zheng, S.Q.; Huang, X.B.; Xing, T.K.; Ding, A.J.; Wu, G.S.; Luo, H.R. Chlorogenic acid extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via Insulin/IGF-1 signaling pathway. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. (2017), 72, 464-472.
- Zhu, F.; Du, B.; Zheng, L.; Li, J. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*. (2015), 186, 207-212.