



## **GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES**

### **Sabina Diaz Martinez**

**ISBN: 978-84-694-0330-3**  
**Dipòsit Legal: T-209-2011**

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Sabina Díaz Martínez

## **Gens diana de les Proantocianidines**

Tesi Doctoral

Dirigida pel Prof. Lluís Arola Ferrer

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011



**Departament de Bioquímica i Biotecnologia**

Carrer Marcel·lí Domingo s/n

Campus Sant Pere Sescelades

43007 Tarragona

Telèfon: 977553521

Fax: 977558232

Lluís Arola Ferrer, Catedràtic d'Universitat del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili,

FAIG CONSTAR:

Que aquest treball, titulat **“Gens Diana de les Proantocianidines”**, que presenta Sabina Díaz Martínez per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta universitat i que aconsegueix els requeriments per poder optar a la Menció Europea.

Tarragona, 5 octubre de 2010

Lluís Arola Ferrer

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

**Als meus pares,  
i al Jordi**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

“No importa el cim, sinó el camí”

(*Catalans K2 Magic Line*)

És el moment de mirar enrere i analitzar els moments viscuts i compartits durant aquests quatre anys. Potser no he triat una frase gaire filosòfica, però crec que resumeix perfectament el que ha significat per mi fer la meva Tesi. Quan vaig començar ho veia tot massa lluny i complicat. Saps on està el cim però no saps si seràs capaç d'aconseguir-ho. Pel camí vas coneixent gent que et dóna ànims i forces per continuar, gent que acaba formant part de la teva vida i amb la que es crea un vincle molt especial.

Escriure els agraïments és potser una de les parts més complicades de la tesi. S'ha de fer amb el cor i no vols deixar-te ningú, perquè tots i cadascú de vosaltres (els que ho esteu llegint ara mateix) heu contribuït a que hagi arribat al cim de la meva muntanya: la TESI.

En primer lloc, voldria agrair al meu director de tesi, el Dr. Lluís Arola, per la confiança i el recolzament, així com la seva sinceritat en els moments bons i no tan bons. Gràcies per fer-me veure que les coses no són tan complicades com semblen i sempre hi ha una solució.

També m'agradaria donar les gràcies a la resta de membres del grup de Nutrigenòmica, en especial a les Dres. Cinta Bladé i Pepa Salvadó (les reunions de minigrup no haguessin estat el mateix sense vosaltres), així com als Dr/es Gerard Pujades, Santi García-Vallvé, Anna Ardèvol, Montse Pinent, Mayte Blay, Juan Fernández-Larrea i Miquel Mulero, gràcies pel vostre suport durant aquest temps. No vull oblidar-me d'agrair a la Dra. Isa Baiges, gràcies per contagiar-me la passió per la ciència.

El doctorat no seria el mateix sense els companys de laboratori. En primer lloc m'agradaria agrair als que em van donar la benvinguda i em van fer sentir com una més del grup, al Josep, la Isa Quesada, al Mario, la Gemma, la Ximena, la Montse Vaqué, la Marina, al Pere, l'Albert i la Lúcia. I també als que s'han anat incorporant Anna Castell, Lúcia, Víctor, Neus, Noemí, Ester, Laura, Ligia, Cris, Toni, Anna C., Anna A. i Aleix. Tots heu fet que venir a la feina no sigui només per treballar, sinó per compartir bons moments.

Vull agrair molt especialment a la Helena, per la seva energia i amicitat, al David, per la seva alegria i constància i a l'Anabel, per la seva sinceritat i el seu somriure. Els moments que hem passat junts al laboratori i fora del laboratori no tenen preu. Ja sabeu que “*con musiquilla y eso*” els dies són més entretinguts. Sé que sóc molt afortunada d'haver-vos conegut i us trobaré molt a faltar. Moltes gràcies al minigrup de Bioinformàtica, l'Esther i la Laura, parlar



amb vosaltres fa que el dia sigui més divertit, no us oblidaré mai. També agrair als companys del grup d'Enologia, gràcies pel suport mostrat en aquests anys.

I would also like to thank Dr. Jaap Keijer for giving me the opportunity to stay in his group Human and Animal Physiology in the Wageningen University of the Netherlands. Many thanks to Dr. Evert van Schothorst for your implication in this Project and your helpful scientific suggestions; to Annelies Bunschoten for the funny moments in the lab and all the members of the group to make me feel like in home.

A les tècnics de laboratori Yaiza, Vanesa i Rosa per la seva ajuda en tot moment. Al Santiago, per la seva paciència quan hem necessitat alguna cosa en últim moment. I sobretot a la Niurka, sense tu moltes vegades ens haguèssim trobat perduts al laboratori, el teu saber fer fa que les coses semblin més senzilles.

A Esther Palau per la seva organització i aconseguir que no perdem els "papers". A la Marisol i la Montse per ajudar-nos a tenir-ho tot al dia i ordenat. I també a la Mari, sempre amb un somriure al la cara i desitjant-me un bon dia.

Fer el doctorat no només es tancar-se al laboratori o al despatx, per això vull agrair a la Vanessa, la Idoia, la Miriam i la Irene pels bons moments compartits amb el nostre Recreativo de Juerga, mai el fútbol havia estat tan apassionant.

A la meva professora d'anglès Leticia, gràcies per aguantar els meus rotllos de ciència *in english* i ajudar-me a trobar les paraules per transmetre els meus coneixements.

M'agradaria donar les gràcies als meus amics Ariadna, David, Blanca, Juanvi, Neus, Carles, Eli i Marc. Amb tots vosaltres he viscut moments inoblidables i espero que en vinguin molts més. Agrair també a les meves amigues de la facultat Raquel L., Laura, Raquel R., Meri, Aïda i Noe. Encara que les nostres vides segueixen camins diferents, sé que sempre hi sereu quan us necessiti. Als meus companys de capoeira Corao, Samambaia, Gato do mato, Cenoura, Android, Chaplin i Jujuba, gràcies per ajudar-me a desconnectar. Gracias a mi maestro Bacurau, admiro el entusiasmo que demuestras en tus clases y la fuerza que nos transmites.

Vull donar les gràcies a tota la meva família i la família del Jordi, sempre pendents dels meus avenços en el món de la ciència i animant-me a continuar endavant. Un agraïment molt especial als meus sogres, Cinta i Josep, per preocupar-se per mi i donar-me ànims en tot moment. Muchas gracias a mis "nenes", Jose y Ángel, siempre seréis mis hermanitos preferidos. A mis cuñadas Rosa y Maria por los momentos compartidos, y a mi sobrino Jose y

mi ahijada Laura por la vitalidad que desprenden vuestros ojos. I també a la meva Kaly.  
GRÀCIES.

Jordi, has estat al meu costat des del començament, compartint el dia a dia i patint amb mi els maldecaps que comporta fer ciència. La teva complicitat i amor m'ha donat forces per portar a terme aquest projecte. GRÀCIES pel teu suport incondicional.

A mis padres quiero dedicarles el más sincero agradecimiento. Por estar siempre a mi lado y apoyarme en todas mis decisiones. Por dárme todo sin esperar nada a cambio. Por confiar en mí aún cuando yo no me veía capaz. Papa, gracias por creer en mí y enseñarme que el trabajo duro siempre tiene su recompensa y cuando se quiere algo hay que luchar por ello. Mama, gracias por escucharme, por hacerme reír cuando no tenía fuerzas y por enseñarme que la vida siempre guarda algo bueno para nosotros, no cambies nunca. Porque os lo debo todo:  
GRACIAS.

Un dia em van dir que les coses s'acaben, però s'acaben bé. És el moment de començar una nova etapa de la meva vida i fer-ho amb tota la il·lusió del món. Gràcies a tots per posar el vostre granet de sorra, és hora de buscar una nova muntanya per pujar.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

Proanthocyanidins are phenolic compounds that are found in many plants, constituting an important part of our diet, especially in fruits such as grapes, apples, berries and cocoa, as well as in products like juices, red wine, beer or tea. Proanthocyanidins are oligomers or polymers of flavan-3-ols, which are monomers of catechins.

As has been demonstrated by a wide range of population and intervention studies, proanthocyanidins exert many beneficial effects on health, such as reducing the risk of suffering cardiovascular diseases, cancer or aging, and improving or ameliorating risk factors such as obesity, diabetes, atherosclerosis and hypertension. Oxidative stress and inflammation are key factors in the development of these diseases, and that is why the beneficial effects of proanthocyanidins have been attributed in large part to its antioxidant ability.

The characteristics of proanthocyanidins as antioxidants do not explain the wide range of biochemical and physiological effects described for these molecules. The well-known ability of proanthocyanidins to interact with protein and to condition its denaturation, does not explain all the described effects.

Because of its health properties, nutrition research has focused on proanthocyanidins and phenolic compounds as a whole in order to understand the responsible processes and molecular mechanisms for its effects.

The research group that has carried out this thesis has found that, indeed, proanthocyanidins have a strong ability to act on the regulatory processes of the gene expression, especially by acting on the nuclear receptor system.

If molecules such as proanthocyanidins have the potential to modulate gene expression selectively conditioning a homeostatic adaptation to prevent the imbalance influenced by stress, whether metabolic, oxidative or inflammatory, we understand the multitude of positive effects reported for proanthocyanidins.

The aim of this Thesis is to demonstrate the following hypothesis: Proanthocyanidins act by modulating the differential expression of target genes so as to condition a homeostatic adaptation to prevent metabolic, oxidative or inflammatory stress.

We have used different experimental strategies using a transcriptomics tool for achieving the hypothesis.

The first strategy is based on the methodology of undirected transcriptomics analysis,

using the livers of rats that were administered an acute treatment of a proanthocyanidin extract with a dose of 250 mg/kg of body weight. This treatment will allow us to glimpse the susceptible genes to the effects of proanthocyanidins, hence the first aim arises: *Study by undirected transcriptomics of changes on the gene expression in the liver of rats treated with an acute dose of grape seed proanthocyanidins extract*. The conclusions derived from this first study shows that acute doses of grape seed proanthocyanidins extract condition major changes on the biochemical adaptation of animals in the liver of rats, modulating lipid metabolism in addition to exerting proapoptotic and anti-inflammatory actions.

The second strategy is also based on the methodology of undirected transcriptomics analysis using the livers of rats; In that case we tried to reproduce a situation closed to reality and, therefore, we used doses that are easily consumable by humans. The experiment consisted on the chronic administration of grape seed proanthocyanidins extract for three weeks using two different doses: 5 and 25 mg/kg. The first dose is at the lowest limit of normal human consumption while the second is about 2-3 times higher than a normal consumption, that is, an amount of 2 g/day of proanthocyanidins, which is assumed to be moderate. Unlike the first strategy, where the objective was to identify target genes in a short term, the aim now is to check what the biochemical adaptation of the regular consumption of these molecules is. Thus, the second aim is: *Study by undirected transcriptomics of changes on gene expression in the liver of rats chronically treated with two moderate doses of grape seed proanthocyanidins extract*. The conclusions are: Firstly, the effect is not dose-dependent. At each dose the range of genes that change is different and these changes are not particularly significant. The results indicate that the administration of chronic doses of grape seed proanthocyanidins extract of 5 mg/kg exerts a proapoptotic effect by the apoptosis extrinsic pathway in the liver. On the other hand, the administration of chronic doses of grape seed proanthocyanidins extract of 25 mg/kg induce remarkable metabolic changes such as inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation and a clear alteration of phospholipid metabolism, in addition to an induction of the synthesis pathway of arachidonic acid. Moreover, there is an obvious suppressing effect on the immune response focused on the complement system.

The first two approaches were aimed at discerning the key point of interaction of proanthocyanidins on the gene expression machinery, working with a mixture of

proanthocyanidins rich in monomers and oligomers that could be administered in a normal diet. The third strategy focuses on the study of pure molecules, using concrete proanthocyanidins such as the epicatechin monomer, a dimer of catechin and a trimer of catechin. It is shown that these molecules reach the cell 1 to 2 hours after consumption. These three treatments have been used in rat liver cells in culture and also using the undirected transcriptomics technique. This approach should allow us to identify whether different molecules induce different or equivalent effects, a key point in the theory of the potential of proanthocyanidins as signaling molecules. This strategy is set as the third aim: *Study by undirected transcriptomics of changes on gene expression in liver cells treated with epicatechin, dimer of catechin and trimer of catechin.* The results derived from this third study postulate that the administration of a dose of 50 mg/l of epicatechin modifies the expression of a few genes that mainly affect the cell cycle, thus causing a clear modulatory effect on it. Moreover, the administration of 10 mg/l of dimer of catechin and 50 mg/l of trimer of catechin exerts an obvious dual effect on these cells, inducing common changes on the anabolic metabolism in different control points of gluconeogenesis and the synthesis of fatty acids, activating them, and lipogenesis, suppressing it. In addition, these modulate the immune response repressing the expression of genes that code for signal transducer of interleukin-6 (gp130) and the transcription factor NFκB.

The fourth and last strategy focuses on the directed transcriptomics technique, which seeks the simplification of the methodology used in previous studies, providing real applicability to studies that focus on nutrient-gene interaction, as arising in this work. Although useful and innovative, undirected transcriptomics presents the problem of the complexity of its analysis, that is why it is not practical enough for studies focused on specific biochemical problems or situations of particular stress. However, as for directed transcriptomics, it is relatively easy to identify the interaction of nutrients with the process of gene expression and, thus, it leads to a more realistic applicability. This methodology requires a careful system of selection of genes of interest primarily based on an extensive literature search. These features demonstrate the ability of this methodology as a tool for searching new biomarkers, useful for designing functional ingredients used in the prevention of different pathologies. The used models have been liver cells and endothelial cells in culture treated with grape seed proanthocyanidins extract, an extract rich in oligomers purified from the generic extract, epigallocatechin gallate, dimer B2 and trimer

## SUMMARY

C1 to observe changes on the gene expression of selected genes, all of them involved in the development of cardiovascular diseases. Thus, the fourth aim is: *Study by directed transcriptomics of changes on the gene expression in liver cells and endothelial cells treated with grape seed proanthocyanidins extract, extract rich in oligomeric of proanthocyanidins, epigallocatechin gallate, dimer B2 and trimer C1.* The results derived from the latter study postulate that the grape seed proanthocyanidins extract and a fraction of this extract rich in dimeric and trimeric forms modify the expression of a number of genes in the liver HepG2 cells and endothelial HUVEC cells, changing cell function in a favorable manner to prevent or alleviate the pathological effects associated with cardiovascular diseases. On the other hand, the selected pure molecules for the used dose do not show such strong effects.

The obtained overall results allow us to progress in the hypothesis and support the potential of proanthocyanidins as regulatory molecules and its use in the functional food industry.

## Abreviacions

<b>ADP</b>	adenosin difosfat ( <i>adenosine diphosphate</i> )
<b>AMP</b>	adenosin monofosfat ( <i>adenosine monophosphate</i> )
<b>ATP</b>	adenosin trifosfat ( <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>cAMP</b>	adenosin monofosfat cíclic ( <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
<b>CRP</b>	proteïna C reactiva ( <i>C-reactive protein</i> )
<b>CVD</b>	malaltia cardiovascular ( <i>cardiovascular disease</i> )
<b>Cy3</b>	Cianina 3-CTP ( <i>cyanine-3</i> )
<b>Cy5</b>	Cianina 5-CTP ( <i>cyanine-5</i> )
<b>Cyt c</b>	citocrom c ( <i>cytochrome c</i> )
<b>DISC</b>	complejo de señalización inductor de muerte ( <i>death-inducing signalling complex</i> )
<b>DM1</b>	diabetis mellitus tipus 1
<b>DM2</b>	diabetis mellitus tipus 2
<b>DNA</b>	àcid desoxiribonucleic ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>EDTA</b>	àcid etilendiaminatetraacètic ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EGCG</b>	epical·locatequina gal·lat
<b>ELISA</b>	assaig d'immunoabsorció lligat a enzim ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>GDH</b>	glutamat deshidrogenasa
<b>GOT</b>	glutamat oxaloacetat transaminasa
<b>GPT</b>	glutamat piruvat transaminasa
<b>GS</b>	glutamina sintetasa
<b>GSPE</b>	extracte de proantocianidines de pinyol de raïm ( <i>grape seed proanthocyanidin extract</i> )
<b>GTP</b>	guanosin trifosfat ( <i>guanosine triphosphate</i> )
<b>HDL</b>	lipoproteïnes d'alta densitat ( <i>high-density lipoprotein</i> )
<b>HEPES</b>	àcid 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etansulfònic ( <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid</i> )
<b>HSP</b>	proteïna de xoc tèrmic ( <i>heat shock protein</i> )
<b>HTA</b>	hipertensió arterial
<b>LDH</b>	lactat deshidrogenasa
<b>LDL</b>	lipoproteïnes de baixa densitat ( <i>low-density lipoprotein</i> )
<b>LPS</b>	lipopolisacàrid
<b>MS</b>	espectrometria de masses ( <i>mass spectrometry</i> )
<b>NMR</b>	ressonància magnètica nuclear ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
<b>NO</b>	òxid nítric (nitric oxide)
<b>PAD</b>	pressió arterial diastòlica



<b>PAS</b>	pressió arterial sistòlica
<b>PBS</b>	tampó fosfat salí ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	reacció en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PMME</b>	permeabilització de la membrana mitocondrial externa
<b>PMSF</b>	fluorur de fenilmetilsulfonil ( <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
<b>QM</b>	quilomicrons
<b>RNA</b>	àcid ribonucleic ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>ROS</b>	espècies reactives d'oxigen ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>RT</b>	retrotranscripció
<b>SNP</b>	polimorfisme d'un sol nucleòtid ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>STZ</b>	estreptozotocina ( <i>streptozocin</i> )
<b>TG</b>	triglicèrids
<b>TLDA</b>	targeta microfluídica ( <i>Taqman Low Density Array</i> )
<b>TRAIL</b>	l·ligand de mort de la família TNA ( <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> )
<b>VLDL</b>	lipoproteïnes de molt baixa densitat ( <i>very-low-density lipoprotein</i> )

A l'Annex 1 es mostra en detall tots el gens anomenats al llarg de la tesi.

## ÍNDEX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1. Fitoquímics</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2. Compostos fenòlics</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3. Absorció i biodisponibilitat dels compostos fenòlics</b> .....	<b>20</b>
1.3.1. Absorció .....	21
1.3.2. Mecanismes de conjugació .....	22
1.3.3. Transport en plasma .....	22
1.3.4. Captació als teixits .....	23
1.3.5. Eliminació .....	23
<b>1.4. Efecte dels flavonoides sobre l'organisme</b> .....	<b>24</b>
1.4.1. Capacitat antioxidant .....	24
1.4.2. Activitat quelant de metalls .....	25
1.4.3. Malalties cardiovasculars: aterosclerosi .....	25
1.4.3.1. Hipertensió .....	26
1.4.3.2. Dislipèmia .....	27
1.4.3.3. Diabetis .....	29
1.4.3.4. Inflamació .....	30
1.4.3.5. Estrès oxidatiu .....	32
1.4.4. Apoptosi .....	33
1.4.4.1. Via intrínseca o mitocondrial .....	35
1.4.4.2. Via extrínseca o de receptors de mort .....	35
1.4.5. <i>Heat shock proteins</i> .....	36
<b>1.5. Genòmica nutricional</b> .....	<b>37</b>
1.5.1. Nutrigenètica .....	40
1.5.2. Nutrigenòmica .....	41
1.5.3. Compostos fenòlics de la dieta i genòmica nutricional .....	41
<b>1.6. Eines "òmiques"</b> .....	<b>42</b>
1.6.1. Transcriptòmica .....	42
1.6.2. Proteòmica .....	43
1.6.3. Metabolòmica .....	44
<b>1.7. Biomarcador</b> .....	<b>44</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓ i OBJECTIUS</b> .....	<b>47</b>
<b>3. MATERIALS i MÈTODES</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1. Proantocianidines</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2. Models animals</b> .....	<b>55</b>
3.2.1. Experiment Agut .....	55
3.2.2. Experiment crònic .....	56
<b>3.3. Models cel·lulars</b> .....	<b>56</b>
3.3.1. Cèl·lules endotelials <i>HUVEC</i> .....	56
3.3.1.1. Descongelació .....	57
3.3.1.2. Tripsinització i manteniment cel·lular .....	57
3.3.1.3. Tractament .....	58
3.3.2. Cèl·lules hepàtiques <i>HepG2</i> .....	58
3.3.2.1. Descongelació .....	58
3.3.2.2. Tripsinització i manteniment cel·lular .....	58
3.3.2.3. Tractament .....	59
3.3.3. Cèl·lules hepàtiques <i>FAO</i> .....	59
3.3.3.1. Descongelació .....	59
3.3.3.2. Tripsinització i manteniment cel·lular .....	59

3.3.3.3. Tractament .....	60
<b>3.4. Aïllament i quantificació de RNA .....</b>	<b>60</b>
3.4.1. Teixit: fetge .....	60
3.4.2. Cultiu cel·lular .....	60
<b>3.5. Anàlisi de RT-PCR .....</b>	<b>60</b>
3.5.1. Retrotranscripció (RT) .....	60
3.5.2. PCR quantitativa a temps real.....	61
3.5.3. Taqman® Low Density Array (TLDA) .....	61
<b>3.6. Realització de microarrays i anàlisi de resultats.....</b>	<b>62</b>
3.6.1. Microarrays experiment crònic.....	62
3.6.2. Microarrays experiment agut i experiment amb cèl·lules <i>FAO</i> .....	64
<b>3.7. Determinació de citocrom c a fetge.....</b>	<b>65</b>
<b>3.8. Determinació de Hsp70 a fetge .....</b>	<b>67</b>
<b>3.9. Determinació de l'activitat caspasa 3 a fetge.....</b>	<b>69</b>
<b>3.10. Determinació de la proteïna C reactiva a plasma.....</b>	<b>70</b>
<b>3.11. Activitats enzimàtiques.....</b>	<b>72</b>
3.11.1. Preparació de mostres i homogeneïtzació .....	72
3.11.2. Medi d'homogeneïtzació .....	72
3.11.3. Glutamat oxalacetat transaminasa (GOT) .....	73
3.11.4. Glutamat piruvat transaminasa (GPT) .....	73
3.11.5. Glutamat deshidrogenasa (GDH).....	74
3.11.6. Glutamina sintetasa (GS) .....	74
<b>3.12. Determinació de paràmetres plasmàtics .....</b>	<b>75</b>
3.12.1. Glucosa .....	75
3.12.2. Triglicèrids .....	76
3.12.3. Colesterol.....	76
3.12.4. Àcids grassos lliures .....	76
3.12.5. $\beta$ -Hidroxibutirat .....	76
3.12.6. Glicerol.....	76
3.12.7. Lactat .....	76
3.12.8. Urea .....	77
<b>3.13. Citotoxicitat .....</b>	<b>77</b>
3.13.1. Preparació de les mostres .....	77
3.13.2. Assaig Lactat deshidrogenasa .....	77
3.13.3. Resultats .....	78
<b>3.14. Determinació de la quantitat de proteïna .....</b>	<b>78</b>
3.14.1. Fonament .....	78
3.14.2. Procediment .....	79
<b>3.15. Anàlisi estadístic .....</b>	<b>79</b>
<b>4. RESULTATS i DISCUSSIÓ .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1. Resposta a un tractament agut amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm .....</b>	<b>83</b>
4.1.1. Transcriptoma hepàtic.....	83
4.1.2. Marcadors hepàtics .....	100
4.1.2.1. <i>Heat shock protein 70 kDa</i> (Hsp70) .....	100
4.1.2.2. Citocrom c (Cyt c) .....	101
4.1.2.3. Comprovació mitjançant expressió gènica de la via d'apoptosi intrínseca a la mitocòndria.....	102
4.1.2.4. Activitats enzimàtiques .....	103
4.1.3. Marcadors plasmàtics.....	104
4.1.4. Proteïna C reactiva a plasma .....	106

<b>4.2. Resposta a un tractament crònic amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm .....</b>	<b>107</b>
4.2.1. Transcriptoma hepàtic .....	107
4.2.1.1. Tractament crònic amb 5 mg/kg de GSPE .....	107
4.2.1.2. Tractament crònic amb 25 mg/kg de GSPE .....	122
4.2.2. Marcadors hepàtics .....	148
4.2.2.1. Hsp70.....	148
4.2.2.2. Caspasa 3 .....	148
4.2.2.3. Comprovació mitjançant expressió gènica de la via d'apoptosi intrínseca a la mitocondria .....	149
4.2.2.4. Activitats enzimàtiques .....	150
4.2.3. Marcadors plasmàtics .....	151
<b>4.3. Identificació de gens diana de proantocianidines a partir dels estudis <i>in vivo</i> .....</b>	<b>152</b>
<b>4.4. Identificació de les molècules responsables dels efectes de les proantocianidines en un model cel·lular .....</b>	<b>155</b>
4.4.1. Epicatequina .....	155
4.4.2. Dímer de catequina .....	164
4.4.3. Trímer de catequina.....	178
4.4.4. Identificació de gens diana de les proantocianidines a partir de molècules pures .....	192
<b>4.5. Utilització d'un model de transcriptòmica dirigida per la identificació de gens diana de les proantocianidines en diferents models cel·lulars .....</b>	<b>196</b>
4.5.1. Cèl·lules hepàtiques .....	199
4.5.1.1. Efecte sobre el metabolisme cel·lular .....	200
4.5.1.2. Efecte sobre la renovació cel·lular.....	203
4.5.1.3. Efecte sobre la homeòstasi sanguínia .....	204
4.5.1.4. Efecte sobre la resposta immunitària.....	206
4.5.1.5. Confirmació dels resultats per PCR quantitativa a temps real .....	208
4.5.2. Cèl·lules endotelials .....	209
4.5.2.1. Efecte sobre el metabolisme cel·lular .....	210
4.5.2.2. Efecte sobre la renovació cel·lular.....	211
4.5.2.3. Efecte sobre la homeòstasi sanguínia .....	212
4.5.2.4. Efecte sobre la resposta inflamatòria.....	213
4.5.2.5. Confirmació dels resultats per PCR quantitativa a temps real .....	215
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>217</b>
<b>6. ANNEX 1 .....</b>	<b>223</b>
<b>6.1. Resposta a un tractament agut de 250 mg/kg amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm.....</b>	<b>225</b>
6.1.1. Metabolisme cel·lular .....	225
6.1.2. Renovació cel·lular .....	226
6.1.3. Citoesquelet i processat de RNA.....	226
6.1.4. Senyalització .....	227
6.1.5. Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària.....	227
6.1.6. Altres.....	228
<b>6.2. Resposta a un tractament crònic de 5 i 25 mg/kg amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm .....</b>	<b>229</b>
6.2.1. Metabolisme cel·lular: 5 mg/kg .....	229
6.2.2. Renovació cel·lular: 5 mg/kg.....	231
6.2.3. Citoesquelet i processat de RNA: 5 mg/kg.....	232
6.2.4. Senyalització: 5 mg/kg .....	233

6.2.5.	Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària: 5 mg/kg .....	233
6.2.6.	Altres: 5 mg/kg.....	234
6.2.7.	Metabolisme cel·lular: 25 mg/kg .....	235
6.2.8.	Renovació cel·lular: 25 mg/kg.....	238
6.2.9.	Citoesquelet i processat de RNA: 25 mg/kg.....	240
6.2.10.	Senyalització: 25 mg/kg .....	241
6.2.11.	Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària: 25 mg/kg .....	242
6.2.12.	Altres: 25 mg/kg.....	243
<b>6.3.</b>	<b>Identificació de les molècules responsables dels efectes de les proantocianidines en un model cel·lular: epicatequina, dímer i trímer .....</b>	<b>245</b>
6.3.1.	Totes les classificacions: epicatequina.....	245
6.3.2.	Metabolisme cel·lular: Dímer .....	246
6.3.3.	Renovació cel·lular: Dímer .....	246
6.3.4.	Citoesquelet i processat de RNA: Dímer .....	247
6.3.5.	Senyalització: Dímer .....	248
6.3.6.	Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària: Dímer.....	248
6.3.7.	Altres: Dímer.....	248
6.3.8.	Metabolisme cel·lular: Trímer.....	249
6.3.9.	Renovació cel·lular: Trímer .....	250
6.3.10.	Citoesquelet i processat de RNA: Trímer.....	252
6.3.11.	Senyalització: Trímer .....	252
6.3.12.	Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària: Trímer.....	253
6.3.13.	Altres: Trímer.....	254
<b>6.4.</b>	<b>Utilització d'un model de transcriptòmica dirigida per la identificació de gens diana.....</b>	<b>254</b>
6.4.1.	Metabolisme cel·lular: HepG2 .....	254
6.4.2.	Renovació cel·lular: HepG2.....	257
6.4.3.	Homeòstasi sanguínia: HepG2 .....	258
6.4.4.	Resposta inflamatòria: HepG2.....	259
6.4.5.	Metabolisme cel·lular: HUVEC .....	260
6.4.6.	Renovació cel·lular: HUVEC.....	261
6.4.7.	Homeòstasi sanguínia: HUVEC.....	262
6.4.8.	Resposta inflamatòria: HUVEC.....	262
<b>7.</b>	<b>ANNEX 2 .....</b>	<b>263</b>
<b>8.</b>	<b>ANNEX 3 .....</b>	<b>279</b>
8.1.	Llegenda obtinguda amb el programa MetaCore .....	281
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>283</b>

## 1. INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

### 1.1. Fitoquímics

Els fitoquímics són metabòlits secundaris de les plantes biològicament actius però que no es consideren nutrients essencials. En els vegetals poden tenir un paper essencial en la fotosíntesi, en la respiració, en el creixement o en processos de defensa. Es poden arribar a acumular en gran quantitat a les plantes. Quan els animals els consumeixen exerceixen un ampli ventall d'efectes fisiològics i bioquímics. Molt sovint exerceixen efectes beneficiosos sobre la salut humana [1]. Els compostos fenòlics formen un grup important dins dels fitoquímics.

### 1.2. Compostos fenòlics

Els compostos fenòlics són metabòlits secundaris amb estructura aromàtica que és troben àmpliament distribuïts en el regne vegetal; inclouen una gran varietat de molècules que es caracteritzen per tenir grups hidroxil als seus anells aromàtics. Hi ha descrites més de 8000 substàncies, amb gran diversitat d'estructures i pesos moleculars amb un rang des de <100 Da pels compostos fenòlics simples fins a >3000 Da per les estructures altament polimeritzades [2]. Als polifenols se'ls atribueix gran varietat de funcions dins les plantes com el color de les fulles, les flors o el fruit, funció antimicrobiana, funció antifúngica, protecció contra els insectes, defensa contra la radiació UV, quelació de metalls pesants que puguin ser tòxics o protecció antioxidant contra els radicals lliures que es puguin produir durant el procés de la fotosíntesi [3].

Els compostos fenòlics es poden classificar en diferents grups en funció dels anells fenol que continguin o dels elements estructurals que connectin aquests anells [4]. Hom estableix els següents grups: flavonoides, àcids fenòlics, alcohols fenòlics, estilbens i lignans [2, 5, 6].

Polifenols	Exemples
Àcids fenòlics	Àcid hidroxibenzoic: Àcid gàl·lic
	Àcid hidroxicinnàmic: Àcid cummàric
Alcohols fenòlics	Tirosol; Hidroxitirosol
Estilbens	Resveratrol
Lignans	Secoisolariciresinol
Flavonoides	<i>Vegeu subclassificació en la Taula 2</i>

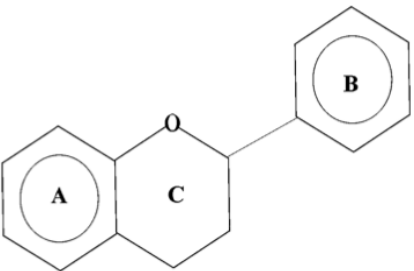
**Taula 1.** Principals grups de polifenols.

Els flavonoides comprenen el grup majoritari dels polifenols, només d'aquets es coneixen més de 5000 tipus diferents. Els flavonoides es troben principalment a les fruites, verdures, plantes medicinals, també en diversos tipus de begudes com el vi negre, els suc, el te o la cervesa



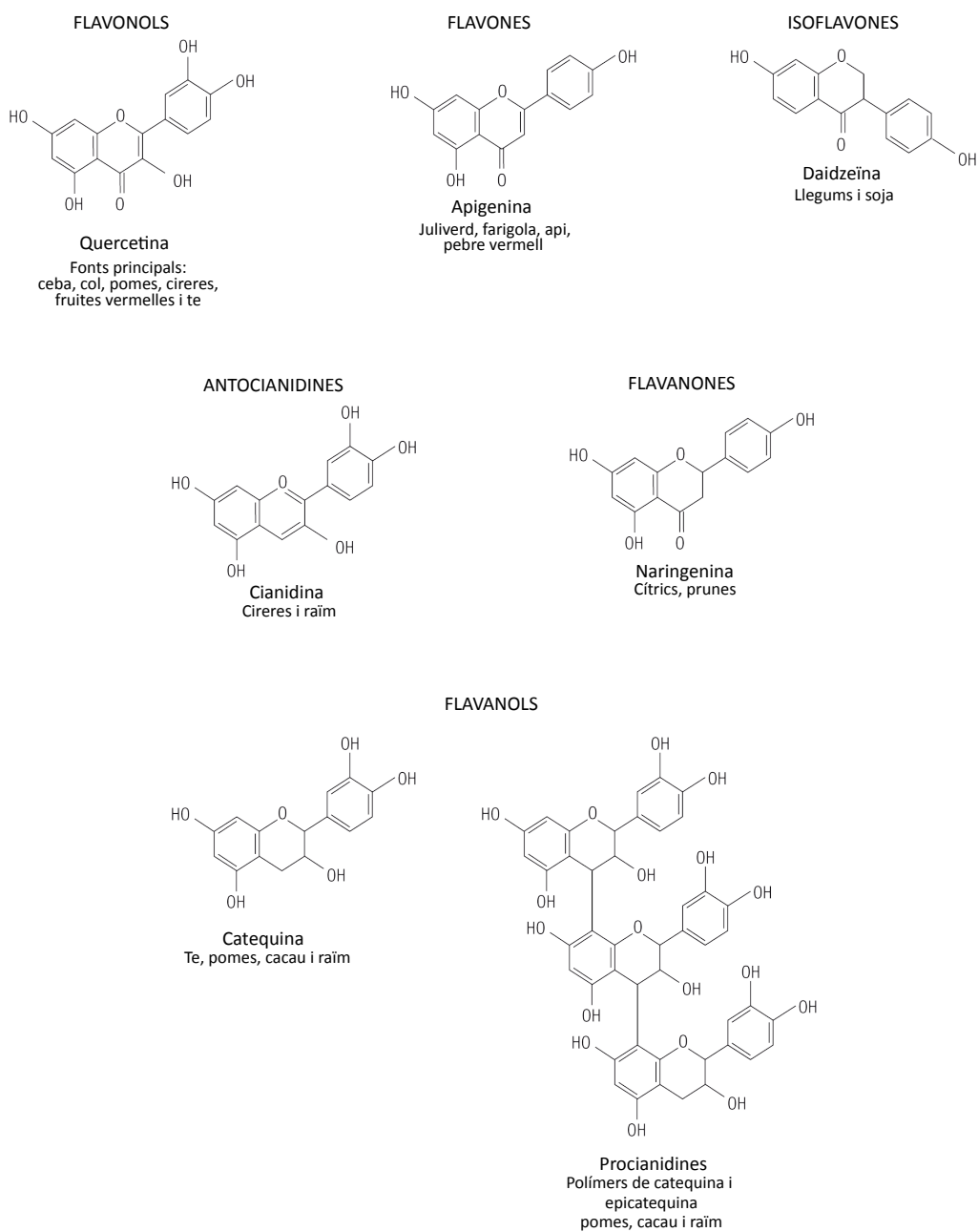
(<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>).

L'estructura bàsica dels flavonoides consisteix en un esquelet carbonat de difenilpropans (C6-C3-C6), dos anells aromàtics (A i B) units per una cadena lineal de tres carbonis (C) (vegeu Taula 2). Aquesta cadena central de tres carbonis pot formar un anell pirà amb un dels anells benzè [2, 5, 6].

Flavonoide	Exemple	Estructura bàsica
Flavonols	Quercetina	
Flavones	Apigenina	
Flavanones	Naringenina	
Isoflavones	Genisteïna	
Antocianidines	Cianidina	
Flavan-3-ols	Catequina	
	Proantocianidines	

**Taula 2.** Estructura general i classificació dels flavonoides.

Els flavonoides estan dividits en 6 subclasses, subdivisió que depèn del grau d'oxidació de l'anell central (vegeu Figura 1). Com a grups trobem els flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, antocianidines i flavanols (catequines i proantocianidines) [1, 2, 4, 6]. A més, aquestes estructures dels flavonoides poden diferir àmpliament entre elles perquè poden ser hidroxilades, glicosilades, hidrogenades, acetilades, metilades, malonitzades o sulfatades. Els flavonoides es poden trobar en forma lliure, com aglicones o units a sucres formant glicòsids, la forma més comú de trobar-los a les plantes [5, 7]. El patró de conjugació pot arribar a ser molt complex i pot modificar la seva hidrofilitat i les seves propietats biològiques, a més d'incrementar considerablement el seu pes molecular [5, 6].



**Figura 1.** Estructura química i fonts dels flavonoides. Adaptada D'Archivo et al., 2007 [6].

Els compostos més comuns dels flavonoides dins la nostra dieta són els **flavan-3-ols**, els quals són considerats ingredients funcionals i els podem trobar a les begudes, fruites, verdures, cereals, suplementes dietètics i en productes làctics. Als flavan-3-ols se'ls hi han atribuït una sèrie d'efectes beneficiosos per la salut com la seva capacitat antioxidant, anticarcinogènica, cardioprotectora, antimicrobiana, antivírica o com agents neuroprotectors [8]. Els flavan-3-ols es troben a la natura en forma de monòmers (catequina o epicatequina) i en forma de polímers (proantocianidines), a diferència d'altres flavonoides, els flavanols no es troben de

forma glicosilada als aliments [6]. Els **monòmers** de catequina i epicatequina es poden trobar en gran varietat de fruites com als préssecs (250 mg/kg fruita fresca) o a les cireres (250 mg/kg fruita fresca). De forma significativa es troben al te verd (més de 800 mg/l), a la xocolata (més de 600 mg/l), i al vi negre, però en menor quantitat (més de 300 mg/l) [6]. És molt difícil valorar el contingut de **proantocianidines** als aliments degut a la gran varietat d'estructures i els seus pesos moleculars. Les proantocianidines són les responsables del caràcter astringent de les fruites com per exemple el raïm, les pomes o les fruites vermelles, de les begudes com el vi, la sidra, el te o la cervesa, així com també són les responsables del caràcter amarg, com per exemple el de la xocolata [6, 9]. Les procianidines són el grup de proantocianidines més comuns presents als aliments, i són polímers de catequina i/o epicatequina (<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>).

Food	Monomers	Dimers	Trimers	4-6-mers	7-10-mers	>10-mers	Total	Type <sup>b)</sup>
	(mg/100 g fresh weight foods or mg/L beverages)							
Blueberries	4.0 ± 1.5	7.2 ± 1.8	5.4 ± 1.2	19.6 ± 3.4	14.5 ± 2.0	129.0 ± 47.3	179.8 ± 50.8	PC
Black-currants	0.9 ± 0.2	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.3	10.6 ± 1.7	9.9 ± 1.4	122.4 ± 28.0	147.8 ± 33.0	PC, PD
Cranberries	7.3 ± 1.5	25.9 ± 6.1	18.9 ± 3.4	70.3 ± 13.1	62.9 ± 14.7	233.5 ± 49.1	418.8 ± 75.3	A, PC
Strawberries	4.2 ± 0.7	6.5 ± 1.3	6.5 ± 1.2	28.1 ± 6.5	23.9 ± 3.5	75.8 ± 13.4	145.0 ± 24.9	PP, PC
Apples <sup>d)</sup>	9.6 ± 0.9	13.8 ± 0.6	9.3 ± 0.4	30.2 ± 1.2	25.4 ± 1.2	37.6 ± 2.6	125.8 ± 6.8	PC
Apple juice	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	4 ± 0	1 ± 0	ND	9 ± 0	PC
Pears	2.7 ± 1.5	2.8 ± 1.3	2.3 ± 0.9	6.5 ± 1.9	4.6 ± 1.0	13.1 ± 11.3	31.9 ± 7.8	PC
Plums	11.4 ± 3.4	31.5 ± 7.4	23.9 ± 5.1	58.0 ± 12.5	33.8 ± 11.9	57.3 ± 24.4	215.9 ± 50.7	A, PC
Peaches	4.7 ± 1.4	7.0 ± 2.2	5.0 ± 1.4	17.7 ± 5.5	10.9 ± 3.7	22.0 ± 7.7	67.3 ± 20.9	PC
Avocados	1.0 ± 0.8	1.5 ± 0.8	1.4 ± 0.4	3.2 ± 0.8	0.4 ± 0.7	ND	7.4 ± 4.3	A, PC
Sorghum, sumac bran	27.8 ± 1.2	78.2 ± 3.4	99.2 ± 7.7	585.5 ± 50.0	734.3 ± 69.3	2440.4 ± 271.0	3965.4 ± 402.5	PC
Barley	11.0 ± 0.3	21.4 ± 1.1	14.6 ± 1.0	27.2 ± 0.6	ND	ND	74.2 ± 3.0	PC
Pinto beans, raw	14.8 ± 0.9	32.0 ± 2.6	28.3 ± 2.1	125.9 ± 9.2	135.6 ± 10.4	459.6 ± 34.2	796.3 ± 58.7	PP, PC
Red kidney beans	21.9 ± 0.2	26.4 ± 0.7	29.1 ± 0.7	117.7 ± 2.8	105.3 ± 2.2	263.4 ± 4.1	563.8 ± 10.4	PP, PC
Hazelnuts	9.8 ± 1.6	12.5 ± 3.8	13.6 ± 3.9	67.7 ± 20.3	74.6 ± 21.9	322.4 ± 102.5	500.7 ± 152.0	PC, PD
Pistachios	10.9 ± 4.3	13.3 ± 1.8	10.5 ± 1.2	42.2 ± 5.2	37.9 ± 4.9	122.5 ± 37.1	237.3 ± 52.0	PC, PD
Almonds	7.8 ± 0.9	9.5 ± 1.6	8.8 ± 1.7	40.0 ± 8.5	37.7 ± 8.4	80.3 ± 28.1	184.0 ± 48.2	PP, PC
Walnuts	6.9 ± 3.4	5.6 ± 0.9	7.2 ± 1.2	22.1 ± 3.3	5.4 ± 0.8	20.0 ± 9.3	67.3 ± 14.7	PC
Peanuts	5.1 ± 1.0	4.1 ± 0.7	3.7 ± 0.5	2.8 ± 0.2	ND	ND	15.6 ± 2.3	A, PC
Peanut butter	2.0 ± 0.9	3.0 ± 0.7	8.1 ± 3.5	ND	ND	ND	13.2 ± 5.2	A, PC
Black chocolate	31.4 ± 0.2	31.2 ± 0.9	21.1 ± 0.8	55.5 ± 3.5	38.5 ± 3.0	68.2 ± 8.8	246.0 ± 0.3	PC
Milk chocolate	26.9 ± 3.0	26.2 ± 2.5	19.3 ± 2.6	51.4 ± 9.8	35.3 ± 7.2	32.8 ± 9.2	192.0 ± 28.8	PC
Beer	4 ± 0	11 ± 1	3 ± 0	4 ± 0	ND	ND	23 ± 2	PC, PD
White wine <sup>d)</sup>	15.1	ND	ND	-	-	-	15.1 <sup>d)</sup>	-
Rosé wine <sup>d)</sup>	17.1	ND	ND	-	-	-	17.1 <sup>d)</sup>	-
Red wine <sup>d)</sup>	190.0	274.3	93.4	-	-	-	557.7 <sup>d)</sup>	-
Red wine	20 ± 1	40 ± 1	27 ± 1	67 ± 2	50 ± 1	110 ± 2	313 ± 5	PC, PD
Grape juice	18 ± 0	34 ± 0	19 ± 0	80 ± 0	69 ± 0	303 ± 2	524 ± 2	PC, PD
Grape seed (dry)	660.3 ± 8.3	417.3 ± 4.8	290.2 ± 4.5	664.0 ± 8.2	400.3 ± 31.3	1100.1 ± 86.3	3532.3 ± 105.8	PC

Taula 3. Contingut de proantocianidines als aliments comuns. Rasmussen et al., 2005 [10].

### 1.3. Absorció i biodisponibilitat dels compostos fenòlics

El terme biodisponibilitat expressa la proporció de nutrient que és digerit, absorbit i metabolitzat a través de les vies metabòliques bàsiques. De manera que no només és important conèixer la quantitat de nutrient present a l'aliment o al suplement dietètic, sinó especialment la quantitat d'aquest que es troba de forma biodisponible [6, 11]. Per això, la biodisponibilitat dels compostos fenòlics és determinant per entendre els efectes biològics que aquests poden exercir sobre l'organisme. D'altra banda, la biodisponibilitat de cada compost

dependrà de diversos paràmetres com la seva estructura química, els processos de conjugació que tenen lloc a l'intestí, fetge i altres localitzacions, així com l'absorció intestinal i els enzims disponibles per al seu metabolisme.

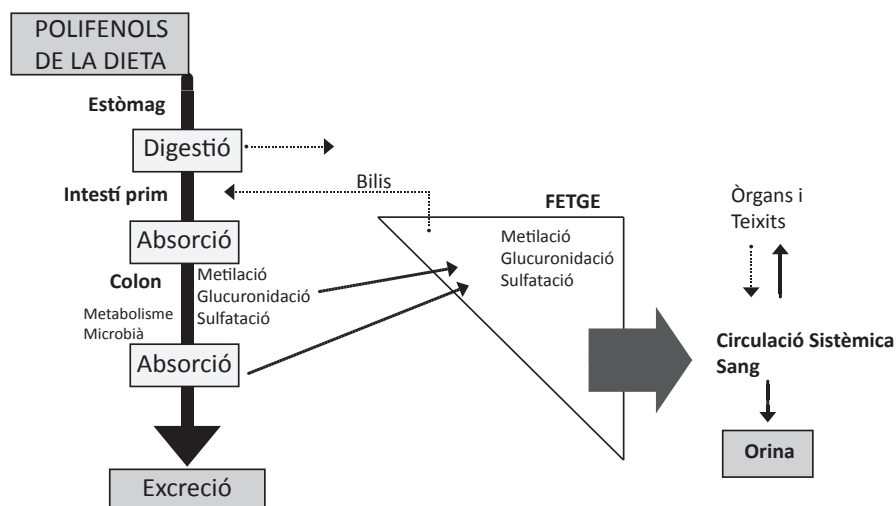


Figura 2. Esquema general del metabolisme dels polifenols. Adaptat de Scalbert et al., 2005 [12].

### 1.3.1. Absorció

L'absorció, biodisponibilitat i el metabolisme de les formes monomèriques dels polifenols ha estat àmpliament estudiada tant en humans com en animals, però se sap molt poc sobre la biodisponibilitat de les formes polimèriques [9]. Generalment, els compostos fenòlics han d'estar en forma aglicona per poder ser absorbits, encara que hi ha alguna excepció, però la majoria d'ells es troben en forma d'èsters, glicosilats o simplement polímers que no poden ser absorbits en la seva forma nativa. És per això que aquests compostos han de patir una sèrie de canvis per poder ser absorbits a l'intestí prim o a l'intestí gruixut.

Existeixen dues vies d'absorció a nivell de l'intestí prim, totes dues associades a la hidròlisi dels conjugats glicosilats i l'absorció per part de les cèl·lules intestinals de les aglicones resultants [1, 5]:

#### Via "LPH/difusió"

L'enzim hidrolasa floridzina lactasa (LPH, *lactase phloridizin hydrolase*), situada a la vora del raspall de les cèl·lules epitelials de l'intestí prim presenta una àmplia especificitat pels flavonoides-O- $\beta$ -D-glucòsids sobre els que provoca l'alliberament de l'aglicona, la qual llavors pot entrar a les cèl·lules epitelials per difusió passiva com a resultat d'un increment en la seva lipofilitat i la seva proximitat a la membrana cel·lular.

### Via "transport/CBG"

L'altre mecanisme descrit és la hidròlisi d'aquests glucòsids mitjançant les  $\beta$ -glucosidases citosòliques (CBG, *cytosolic  $\beta$ -glucosidase*). Aquesta hidròlisi té lloc dins les cèl·lules epitelials de l'intestí. Es creu que l'encarregat del transport d'aquests glucòsids dins dels enteròcits és el transportador actiu de glucosa dependent de sodi (SGLT1, *sodium-dependent glucose transporter*).

Els flavonoides i els seus metabòlits que no han estat absorbits a l'intestí prim, poden ser absorbits a nivell d'intestí gruixut, on estan subjectes a l'acció de la microbiota del colon, on seran transformats fins a la producció d'àcids fenòlics i hidroxicinamats. Aquests poden ser absorbits i en últim terme excretats en l'orina en grans quantitats [1, 11].

#### **1.3.2. Mecanismes de conjugació**

Durant el procés d'absorció, els compostos fenòlics pateixen una gran quantitat de modificacions. Són sotmesos a metabolisme de fase II i conjugats en les cèl·lules intestinals i posteriorment al fetge poden ser metilats, sulfatats i/o glucuronidats. Els responsables d'aquest processos de conjugació són les catecol-O-metil transferases, les sulfotransferases i les UDP-glucuronosiltransferases. El tipus de conjugació del substrat vindrà determinada per la naturalesa d'aquest i la dosi ingerida. Això representa un procés metabòlic de detoxificació, comú en molts xenobiòtics, que incrementa la seva hidrofilitat i per tant facilita la seva eliminació via urinària o biliar [1, 5, 6].

#### **1.3.3. Transport en plasma**

Generalment els metabòlits dels compostos fenòlics no circulen lliures al torrent sanguini sinó que ho fan units a proteïnes, principalment units a albúmina. L'afinitat dels compostos fenòlics per l'albúmina ve determinada per la seva estructura química. El grau d'unió a l'albúmina pot tenir conseqüències per al ràtio d'eliminació dels metabòlits i de la seva distribució a cèl·lules i teixits. D'altra banda, no està clar si els compostos polifenòlics han de romandre en estat lliure o si poden continuar units a albúmina per exercir la seva activitat biològica [6, 13].

La concentració plasmàtica de compostos fenòlics intactes rarament excedeix 1  $\mu$ M, i el manteniment d'elevades concentracions requereix un ingesta continuada al llarg del temps. De fet, les concentracions màximes normalment es troben entre 1 i 2 hores després de la seva ingesta, excepte pels compostos fenòlics que requereixen la seva degradació intestinal abans de ser absorbits. S'ha de tenir en compte també que les concentracions que s'assoleixen en plasma després de consumir compostos fenòlics varien molt dependent de la naturalesa del

compost i de la font de procedència. Així, després d'ingerir entre 80 i 100 mg de quercetina provinent de pomes, cebes o menjars rics en productes vegetals, s'aconsegueixen nivells plasmàtics entre 0,3 i 0,75  $\mu\text{M}$ . En canvi, quan la quercetina prové del te verd, ingerint entre 90 i 150 mg, les concentracions trobades a plasma oscil·len entre 0,1 i 0,7  $\mu\text{M}$ . Quan aquesta quercetina prové de cacau, ingerint entre 70 i 165 mg, a plasma es detecten entre 0,25 i 0,7  $\mu\text{M}$  [1].

#### **1.3.4. Captació als teixits**

Els compostos fenòlics poden entrar als teixits, particularment en aquells on es puguin metabolitzar, com l'intestí o el fetge. La determinació de la biodisponibilitat d'aquests compostos als teixits és igual o més important que el coneixement de la seva concentració a plasma, però encara hi ha poques dades al respecte [6]. Molts dels estudis de distribució tissular s'han realitzat amb polifenols marcats radioactivament. Aquesta radioactivitat es recupera principalment en sang i en teixits del sistema digestiu com són l'estómac, intestí i fetge. Però també han estat detectats en un ampli rang de teixits com el cervell, cor, ronyó, pàncrees, pròstata, úter, glàndula mamària, testicles, ossos i pell, tant en rates com en ratolins [14, 15].

#### **1.3.5. Eliminació**

Els compostos fenòlics i els seus derivats són eliminats principalment per dues vies: per la via biliar i per la via urinària. Els metabòlits d'elevat pes molecular, que estan altament conjugats, presenten una major probabilitat de ser excretats per la via biliar, mentre que els metabòlits conjugats més petits com per exemple els monosulfatats, s'excreten preferiblement per la via urinària [5, 6, 16].

La quantitat total de metabòlits excretats en la orina es correlaciona fortament amb les concentracions màximes trobades a plasma. El percentatge d'excreció urinària és força alt per les flavanones dels cítrics (4-30% de la ingesta) i també per les isoflavones (16-66% per la daizeïna i 10-24% per la genisteïna) mentre que pels flavonols la quantitat és més baixa, 0,3-1,4% per una ingesta de quercetina i els seus glucòsids. Per altres compostos fenòlics, les recuperacions per la via urinària poden ser 0,5-6% per les catequines del te, 2-10% per les catequines del vi negre, i més del 30% per l'epicatequina del cacau [6]. Quan l'excreció és per la via biliar, els compostos fenòlics passen al duodè i són metabolitzats per la microbiota intestinal que posseeix  $\beta$ -glucuronidases que són capaces d'alliberar les aglicones dels metabòlits conjugats en la bilis, podent aquestes aglicones ser reabsorbides i entrar en el cicle

enterohepàtic. Aquest reciclatge enterohepàtic prolonga la presència dels compostos fenòlics a l'organisme i allarga la seva funció [5].

#### **1.4. Efecte dels flavonoides sobre l'organisme**

Hi ha una clara evidència que els flavonoides i entre ells especialment les proantocianidines exerceixen efectes beneficiosos sobre la salut. Aquests són considerats cardioprotectors, antiinflamatoris, anticarcinògens i antimutagènics entre altres. Aquests efectes protectors són deguts principalment a la seva capacitat antioxidant, ja sigui actuant com a segrestadors de radicals lliures, quelants de metalls o la mediació o inhibició d'enzims i a la seva capacitat d'interactuar amb els sistemes de senyalització cel·lular [4, 8]. A continuació es resumeixen els principals efectes biològics descrits per a aquestes molècules.

##### **1.4.1. Capacitat antioxidant**

La capacitat antioxidant dels flavonoides depèn de la configuració i el número total de grups hidroxil presents a les seves estructures, el que farà que siguin més o menys susceptibles a ser oxidats. És l'aspecte més àmpliament estudiat de la bioactivitat dels compostos fenòlics ja que juga un paper clau en el desenvolupament de varies malalties cròniques. La generació de radicals lliures als organismes vius pot potenciar el dany oxidatiu a DNA, lípids, carbohidrats i proteïnes, amb el resultat d'una debilitació de la funció cel·lular que a la vegada causa l'envelliment i l'inici de patologies [8]. Les espècies reactives d'oxigen poden ser radicals d'oxigen o nitrogen, i no radicals oxidants o fàcilment convertibles a radicals. Els radicals més comuns són l'anió superòxid, l'hidroxil, el peroxil i l'òxid nítric. Exemples de no radicals són el peròxid d'hidrogen, el singlet d'oxigen o el peroxinitrit [3].

Hi ha força informació bibliogràfica on s'avalua la variació de diferents paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu després d'una ingesta de flavonoides. A continuació se'n destaquen els més significatius.

Pel que fa a la peroxidació lipídica, da Silva i col·laboradors [17] van demostrar que la capacitat antioxidant de les catequines i les procianidines oligomèriques varia en funció de la seva estructura. Mentre que les procianidines i l'epicatequina eliminen radicals hidroxil i anions superòxid, els monòmers de catequina eliminen específicament radicals hidroxil. L'efecte net, però, del conjunt dels processos condueix a inhibir la peroxidació lipídica [18]. D'altra banda l'epicatequina, l'àcid gàl·lic i altres polifenols del te verd posseeixen activitat eliminadora de radicals peroxil, per la capacitat de cedir protons reduint la peroxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) induïda per agents oxidants [19] i la posterior reacció en cadena, la peroxidació lipídica. La catequina posseeix activitat antioxidant en plasma humà per

retard en la degradació dels antioxidants endògens  $\alpha$ -tocoferol i  $\beta$ -carotè i per inhibició de l'oxidació dels lípids del plasma [20].

Pel que fa a l'efecte antioxidant sobre el DNA, Ohshima i col·laboradors [21] han demostrat que l'epicatequina gal·lat indueix talls en cadenes independents del DNA en presència d'òxid nítric (NO), mentre que monòmers com la catequina i l'epicatequina produeixen menys talls en cadenes del DNA que els anteriors compostos, en concret, la catequina i l'epicatequina (a concentracions de 0,5 mM) inhibeixen més del 90% de talls al DNA induïts per NO 0,5 mM.

#### **1.4.2. Activitat quelant de metalls**

L'habilitat dels flavan-3-ols per unir-se a metalls divalents redueix eficientment la concentració d'aquests cations i per tant la seva activitat oxidativa. Morel i col·laboradors [22] han demostrat que les procianidines formen forts complexos amb els cations de ferro i coure amb uns ràtios de  $\text{Fe}^{2+}$ /procianidina (2:1) i  $\text{Cu}^{2+}$ /procianidina (4:1). Altres estudis mostren que els patrons d'hidroxilació dels flavan-3-ols i el grau de polimerització sobre la capacitat quelant per l'alumini revela que els grups hidroxil són essencials per la quelació dels metalls. Es creu que els complexos metall-flavonoide juguen un paper citoprotector en el segrest de radicals superòxid degut a que el complex metall-flavonoide és més efectiu que el seu respectiu flavonoide a l'hora de segrestar radicals superòxid [8].

#### **1.4.3. Malalties cardiovasculars: aterosclerosi**

En nombrosos estudis s'ha observat que els polifenols contribueixen a la integritat cel·lular, a augmentar la capacitat antioxidant del plasma, a regular el to vascular, a reduir la reactivitat plaquetària i per tant a disminuir la possibilitat de formació de trombes, i, com a conseqüència de tots aquests efectes, a reduir el risc de patir certes malalties cardiovasculars [12, 23, 24].

Les malalties cardiovasculars són el resultat d'una complexa interacció entre factors genètics i ambientals. Són la major causa de malaltia i mortalitat a països desenvolupats com els Estats Units i la majoria dels occidentals. Degut a la significativa incidència d'aquest tipus de malalties, hi ha molts grups de recerca en aquest àmbit entre els quals destaca pel que ens interessa en aquest treball el projecte Framingham Heart Study, el qual tracta d'identificar els desencadenants de les malalties cardiovasculars, analitzant amb detall el consum d'aliments i la patologia cardiovascular [25]. Degut a la complexitat de la malaltia cardiovascular i la desconexió de tots els factors de risc que podrien donar lloc al seu desenvolupament, resulta molt difícil establir unes pautes concretes a seguir per la seva prevenció. Encara que sí que hi ha una sèrie de recomanacions per combatre els factors de risc modificables científicament establerts, com per exemple nivells plasmàtics de colesterol elevats. S'han



identificat diversos factors de risc per les malalties cardiovasculars: dislipèmia, disglucèmia, hipertensió, obesitat abdominal, inflamació, resistència a la insulina o aterosclerosi [26, 27]. Les malalties cardiovasculars tenen altres factors de risc a banda dels esmentats anteriorment, com: tabaquisme, inactivitat física, l'edat, el sexe, l'estrès o el tipus d'alimentació. Alguns dels quals poden ser modificables i per tant es poden corregir.

Els principals òrgans diana de les malalties cardiovasculars són el cor (angina de pit o isquèmia cardíaca; infart de miocardi), el cervell (infart cerebrovascular o embòlia), i el sistema vascular (aterosclerosi) [28].

#### 1.4.3.1. Hipertensió

La **hipertensió arterial** (HTA) és el factor de risc millor establert pel desenvolupament de la malaltia cardiovascular. Aquest incrementa el risc de patir aterosclerosi, un punt clau en el procés d'esdeveniments cardiovasculars [28, 29]. Hom considera una situació d'hipertensió arterial quan es dona una pressió arterial sistòlica (PAS), quan el cor està bategant, superior o igual a 140 mm de Hg constantment, o una pressió arterial diastòlica (PAD), pressió dins dels vasos sanguinis quan el cor està en repòs, superior o igual a 90 mm de Hg continuadament [30]. Hi ha molts factors que poden afectar a un augment de la pressió arterial, com la quantitat d'aigua i sal a l'organisme, l'estat del ronyons, l'estat del sistema nerviós o dels vasos sanguinis, així com el nivells de les diferents hormones del cos. En el desenvolupament d'aquesta malaltia estan implicats diversos mecanismes fisiopatològics, com canvis hemodinàmics, macro i microvasculars, causats principalment per una disfunció de l'endoteli vascular i la remodelació de les arterioles de resistència, responsables de mantenir el to vascular perifèric [29, 31]. En condicions fisiològiques, l'endoteli contribueix al manteniment de l'homeòstasi vascular de diverses maneres. Aquest s'encarrega de regular el to muscular mitjançant l'equilibri entre substàncies vasoconstrictores (endotel·lina 1 o tromboxà A2) i vasodilatadores (òxid nítric); un desequilibri entre les diferents substàncies produïdes per l'endoteli pot provocar un canvi en el flux sanguini; aquests canvis hemodinàmics poden causar un dany en l'endoteli fent que les demés funcions es trobin alterades. Altres funcions de l'endoteli són controlar la proliferació i apoptosi de les cèl·lules musculars llises, inhibir l'agregació plaquetària, regular l'adhesió de monòcits, i actuar com a barrera per les macromolècules. L'endoteli participa en la funció de defensa de l'organisme, permetent el pas de leucòcits per diapedesi al punt on s'ha generat la infecció. Si hi ha disfunció endotelial, aquest pas de substàncies (leucòcits, macromolècules, residus...) del torrent sanguini a l'interior estaria alterat, provocant una entrada incontrolada amb la conseqüent formació

d'una protuberància que podria obstruir la circulació sanguínia, amb el subsegüent augment de la pressió arterial en aquell punt. L'endoteli també és l'encarregat de mantenir l'equilibri homeostàtic, l'alteració d'aquest podria provocar que hi hagués hemorràgia o per altra banda una trombosi. L'alteració de tots aquests processos desencadenaria el desenvolupament de HTA, una factor de risc de la patologia cardiovascular [32-35].

Pel que fa als efectes dels compostos fenòlics sobre la hipertensió, s'ha vist que la disminució de la pressió arterial pot ser deguda a la modulació del sistema renina-angiotensina-aldosterona inhibint l'activitat de l'enzim conversor d'angiotensina (ACE) [36]. Estudis fets amb rates obesas Zucker que presenten la pressió sanguínia sistòlica elevada i l'expressió de la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS) reprimida en aorta, mostren com després del tractament aquests paràmetres es troben significativament millorats [37]. Altres treballs utilitzant extractes de proantocianidines de pinyol de raïm, observen una millora enfront les complicacions macrovasculars en rates a les que se'ls hi ha induït diabetis amb estreptozotocina [38]. Estudis amb altres models animals, en aquest cas conills, i utilitzant també un extracte de procianidines de raïm, s'observa que tenen un efecte vasodilatador per diferents mecanismes que provoca una disminució de la pressió sanguínia arterial [39].

#### 1.4.3.2. Dislipèmia

Molts dels estudis adreçats a trobar l'origen de les patologies cardiovasculars estan centrats en l'estudi dels lípids plasmàtics i les lipoproteïnes [40]. La **dislipèmia** es caracteritza per una elevació dels triglicèrids plasmàtics, una disminució del colesterol associat a HDL (*high-density lipoprotein*) i unes LDL (*low-density lipoprotein*) més petites i denses de l'habitual, fenòmens que estan estretament relacionats amb un augment del risc de patologia cardiovascular [41, 42].

Què provoca l'augment de triglicèrids plasmàtics? Hi ha dues fonts principals de triglicèrids plasmàtics: exògens (provinents de la dieta) els quals són transportats pels quilomicrons (QM), originats a l'intestí, per tant partícules predominants en un període postprandial; i endògens (secretats pels fetge), transportats per les VLDL (*very-low-density lipoprotein*), predominants en un període de dejuni [32, 43]. Un increment d'aquestes partícules transportadores de triglicèrids en plasma és el resultat d'un augment de la seva secreció per part de fetge o d'intestí, causat per una desregulació de les vies anabòliques o catabòliques [43]. L'augment de triglicèrids plasmàtics pot estar condicionat per factors genètics o per desordres metabòlics, aquests últims els més habituals. L'obesitat és l'estressant metabòlic més freqüent associat a la hipertrigliceridèmia. Un flux continu d'àcids grassos lliures dels teixits perifèrics a

fetge, característic d'un estat de resistència a insulina, promou també un augment de la síntesi de triglicèrids hepàtics. Aquest fet provoca l'ensamblatge i secreció de VLDL riques en triglicèrids, el que és una de les causes que fa augmentar els triglicèrids plasmàtics, encara que probablement no és l'única [41].

La capacitat protectora del colesterol HDL està associada en part a la seva funció com a transportador revers de colesterol des dels teixits perifèrics fins al fetge, on serà eliminat [44]. Nivells baixos de colesterol HDL estan associats a persones amb síndrome metabòlica, resistència a insulina, que pateixen hipertrigliceridèmia, amb una vida sedentària o fumadors, entre d'altres [44]. De la mateixa manera que la hipertrigliceridèmia, també pot ser causat per desordres metabòlics i per defectes genètics, com mutacions en els enzims clau en el metabolisme de les HDL.

Degut a l'augment de VLDLs circulants, augmenta el bescanvi de colesterol i triglicèrids entre HDL i VLDL per la proteïna CETP (*cholesteryl ester transfer protein*). Aquesta transloca el colesterol de HDL a VLDL, i triglicèrids de VLDL a HDL; és un factor clau en promoure un estat aterogènic [44]. Aquest intercanvi de lípids condiona la formació de partícules VLDL més carregades de colesterol, que a mesura que perd triglicèrids, esdevé partícules LDL més petites i denses, amb un gran poder aterogènic.

La disminució de la mida de les LDL augmenta el seu poder de penetració a l'endoteli, promovent la seva debilitació i fent-lo més susceptible a altres patologies esmentades anteriorment com la hipertensió [44-46]. Una vegada dins la íntima, les LDL són més susceptibles a ser oxidades. Els macròfags presents a l'espai endotelial, mitjançant uns receptors que tenen a la seva superfície, *scavenger receptors*, capten les LDL oxidades indiscriminadament. Aquest fet promou la formació de cèl·lules escumoses, riques en èsters de colesterol, donant lloc a la formació de l'estria grassa que és la precursora de l'aterosclerosi [32, 46]. Les LDL oxidades actuen com a factors quimiotàctics, promovent l'entrada a l'espai subendotelial de monòcits i activant per tant la resposta inflamatòria. D'aquesta manera es crea un cercle d'entrada de lípids, modificació d'aquests i resposta inflamatòria estretament lligats, provocant l'inici de patologies cardiovasculars.

Hi ha un clar efecte hipolipèmic dels compostos fenòlics en plasma. La disminució del colesterol, el colesterol-LDL i els triglicèrids plasmàtics després de la ingesta de vi negre [47], d'un extracte de pinyol de raïm [48] o de proantocianidines [49] en animals alimentats amb dietes altes en colesterol. En el nostre grup de recerca s'ha observat com l'administració de GSPE (*grape seed proanthocyanidins extract*) millora la dislipèmia associada a dietes elevades

en greixos principalment reprimint la lipogènesi i l'ensamblatge de VLDL a fetge [50]. També s'ha observat un efecte hipotrigliceridèmic de GSPE a través del receptor nuclear FXR (*farnesoid X receptor*), clarament implicat en la homeòstasi del metabolisme lipídic [51]. Un altre receptor nuclear que sembla clarament implicat en la homeòstasi lipídica és SHP (*small heterodimer partner*), el qual sembla tenir un efecte clau com a mediador de la resposta hipolipèmica de GSPE [52, 53].

#### 1.4.3.3. Diabetis

La diabetis mellitus és un desordre metabòlic caracteritzat per uns nivells elevats de glucosa a la sang de manera crònica, que són el resultat d'una reducció o absència de l'activitat de la insulina. Hi ha, bàsicament, dos estats descrits en termes de diabetis mellitus: Tipus 1 (DM1), malaltia degenerativa coneguda com diabetis mellitus dependent d'insulina, es caracteritza per la nul·la producció d'insulina degut a la destrucció autoimmune de les cèl·lules  $\beta$  dels illots de Langerhans del pàncrees mediada per les cèl·lules T [54]; Tipus 2 (DM2) o diabetis mellitus no dependent d'insulina, es caracteritza per una sèrie de desordres: disfunció de les cèl·lules  $\beta$ , increment en la producció de glucosa pel fetge i alteració de l'acció de la insulina o resistència a insulina [55]. Es coneix que hi ha una predisposició genètica de patir DM2, però també intervenen factors ambientals com la obesitat i un estil de vida sedentari [56]. La reducció del pes corporal, l'increment de l'activitat física i la incorporació d'hàbits dietètics saludables poden ajudar en la reducció del risc de desenvolupar DM2. Es pot concloure que el manteniment de la homeòstasi glucídica ens pot ajudar a prevenir patologies associades a una alteració del metabolisme de la glucosa, tals com la resistència a insulina o la diabetis.

La sensibilitat a la insulina és una funció clau per al cos humà, ja que juga un paper crucial en el desenvolupament de malalties molt comuns en la societat moderna i que influeixen de manera significativa la qualitat de vida. L'alteració de la sensibilitat a la insulina és un determinant important de la diabetis tipus 2; d'altra banda, s'ha proposat com un factor de risc independent de malaltia cardiovascular. Per tant, una reducció de la sensibilitat a la insulina s'associa fortament amb la síndrome metabòlica, que representa un conjunt d'anormalitats metabòliques i un factor de risc de la malaltia cardiovascular. La sensibilitat a la insulina pot ser modulada per diferents factors ambientals, incloent els hàbits alimentaris, per tant, la composició de la dieta habitual és clarament un important regulador d'aquesta funció. La seva rellevància per a la salut humana deriva de la seva capacitat de trobar-se en la interfase entre genètica i factors ambientals, a més de tenir un gran nombre de funcions i mecanismes de regulació que involucren el metabolisme intermediari, la deposició del greix corporal, el

sistema cardiovascular, la funció immune, el creixement cel·lular i diferenciació entre molts altres [57].

Pel que fa als efectes dels flavonoides sobre els trastorns relacionats amb la resistència a la insulina, alguns autors han demostrat que els flavonoides monomèrics ajuden a millorar la hiperglucèmia en diversos models de resistència a la insulina. Alguns d'ells actuen com a agents antihiperglucèmics en models animals resistents a insulina induïts amb estreptozotocina (STZ), tant en models genètics que reproduïxen DM1 com en DM2 [58-60]. Altres flavonoides, com la miricetina i l'epigal·locatequina gal·lat (EGCG), milloren la hiperglucèmia induïda per una dieta alta en greix o alta en fructosa en models animals de rosegadors [61, 62]. No només els monòmers sinó també extractes rics en estructures de flavonoides ajuden a prevenir la progressió de la diabetis millorant la hiperglucèmia induïda per estreptozotocina en models animals [63]. En un altre estudi on la resistència a la insulina o la diabetis és induïda per la dieta, un extracte de polifenols de te verd regula l'expressió de gens implicats en la captació de glucosa i la senyalització per insulina en el múscul de rates alimentades amb una dieta alta en fructosa [64]. Estudis previs del grup de recerca tant *in vivo* com *in vitro* amb procianidines de pinyol de raïm, suggereixen que tenen efectes beneficiosos contra els desordres metabòlics de la insulina gràcies a la seva capacitat insulinomimètica [65]. Aquests extractes de procianidines de pinyol de raïm també milloren la hiperglucèmia en models de ratolins que pateixen DM2 [66], restableixen els nivells de glucosa en rates alimentades amb dosis elevades de fructosa [67], i alleugereixen la resistència a insulina tant en ratolins com en cèl·lules *HepG2* [68].

#### 1.4.3.4. Inflamació

La resposta inflamatòria s'activa en resposta a un dany cel·lular causat bàsicament per un trauma o estrès, o una infecció i constitueix una xarxa complexa d'interaccions moleculars i cel·lulars que tenen com a objectiu el retorn a una homeòstasi fisiològica i a una reparació dels teixits afectats [45, 69]. La resposta consta tant d'events locals com l'activació sistèmica mediada per citoquines. Encara que la resposta inflamatòria és diferent en funció del tipus de malaltia, es caracteritza per la implicació d'una sèrie de gens i mediadors endògens en comú que inclou factors de creixement, citoquines inflamatòries com la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosi tumoral (TNF $\alpha$ ) o la interleuquina 6 (IL-6), metal·loproteïnases de matriu, i molècules tòxiques com espècies reactives d'oxigen (ROS) [70]. Aquesta inflamació podria esdevenir crònica si no hi ha un restabliment dels teixits o persisteix un grau estable d'irritació, fet que provoca un dany continu i per tant esdevé en un deteriorament dels teixits que pot

arribar a ser greu [71]. Les citoquines són molècules que formen part d'una xarxa complexa de senyalització i que exerceixen els seus efectes sobre cèl·lules diana.  $TNF\alpha$ , IL-1 o IL-6 són citoquines proinflamàtiques [72] i contribueixen a l'activació de les cèl·lules inflamàtiques i el seu reclutament a la zona afectada, tot això en conjunt amb les quemoquines, que són citoquines quimiotàctiques i que indueixen l'expressió de molècules d'adhesió [45, 73]. D'altra banda també existeixen citoquines antiinflamàtiques com la interleuquina 4 (IL-4) o la interleuquina 10 (IL-10), que poden bloquejar o suprimir la producció de citoquines proinflamàtiques [73].

Quan hi ha una resposta inflamàtica d'elevada intensitat, la producció de citoquines es veu incrementada fortament i són alliberades al torrent sanguini provocant el que s'anomena "resposta de fase aguda", que es caracteritza entre altres coses per la producció de proteïnes de fase aguda com la proteïna C reactiva (CRP) pel fetge, un marcador d'inflamació [74, 75]. És una resposta inflamàtica ben caracteritzada, i després de la seva inducció, la concentració de les proteïnes de fase aguda augmenta considerablement. La seva producció està controlada bàsicament per IL-1 i IL-6.

Hi ha evidències recents que indiquen que tant les citoquines com les quemoquines, així com els seus receptors, estan implicats en un gran nombre de malalties inflamàtiques [71]. Aquests estats patològics semblen ser deguts a un desequilibri de la resposta inflamàtica, fet que posa el sistema de les citoquines com a punt clau d'actuació de les drogues antiinflamàtiques. En aquest context, la possibilitat d'utilitzar compostos obtinguts de les plantes seria una alternativa en el tractament de malalties inflamàtiques. Els flavonoides són capaços d'exercir accions antiinflamàtiques. Estudis amb flavonoides com la luteolina, la quercetina o la genisteïna són capaços d'inhibir l'alliberament de  $TNF\alpha$  i IL-6 en macròfags RAW 264.7 després d'haver estat estimulats amb lipopolisacàrid (LPS) [76]. Alguns autors mostren que l'epigallocatequina gal·lat (EGCG), el major constituent del te verd, inhibeix de forma dosi-dependent l'activació de AP-1 (*activator protein 1*) i  $NF\kappa B$  (*nuclear factor kappa-B*) en cèl·lules BALB/3T3 tractades amb àcid ocaidaic, amb el resultat d'una inhibició de l'expressió gènica de  $TNF\alpha$  [77]. Tant la ciclooxigenasa 2 (COX-2) com la prostaglandina E2 (PGE2) són importants mediadors de la inflamació i de la promoció dels tumors [78]. Estudis amb quercetina posen de manifest la seva capacitat d'inhibir l'expressió de COX-2 i la producció de PGE2 en cèl·lules que han estat induïdes amb arsenit, un potent carcinogen. Estudis en el nostre grup de recerca, utilitzant GSPE com a compost bioactiu mostra la seva capacitat moduladora de la resposta inflamàtica en macròfags activats mitjançant la inhibició de la producció d'òxid nítric (NO) i

PGE2; la supressió de l'expressió de la sintasa d'òxid nítric induïble (iNOS), i la translocació de NFκB [79].

#### 1.4.3.5. Estrès oxidatiu

L'**estrès oxidatiu** és causat per un desequilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i una pèrdua de l'habilitat antioxidant de les defenses pròpies de l'organisme. Una producció incontrolada de ROS pot ser tòxica pel funcionament normal de la cèl·lula, causant danys en diferents components d'aquesta com lípids, proteïnes o en el DNA [31, 80]. S'ha de tenir en compte que la producció de ROS no és sempre tòxica, sempre que els seus nivells estiguin controlats pels sistemes antioxidants, ja que aquestes poden tenir funcions molt diverses com actuar en el sistema immune com a defensa contra patògens, utilitzats per cèl·lules com els neutròfils o els macròfags. També s'utilitzen com a senyalitzadores cel·lulars; certs tipus cel·lulars com per exemple les cèl·lules endotelials o cèl·lules musculars llises poden produir ROS a molt baixos nivells en resposta a alguns tipus de senyals, actuant en aquestes cèl·lules com a segons missatgers en la regulació de la transducció de senyals que en últim terme podrien modular l'expressió gènica o modificacions postranscripcionals de les proteïnes [31]. L'estrès oxidatiu està present en el desenvolupament de múltiples patologies com l'aterosclerosi, malalties cardiovasculars, l'Alzheimer, el Parkinson, i sobretot és molt important en l'envelliment [81]. Diversos factors de risc de l'aterosclerosi, com la hipertensió, la hiperlipidèmia, la diabetis o un estrès vascular, tenen com a resultat la generació intracel·lular de nivells elevats de ROS. Encara que el mecanisme cel·lular i molecular que uneix aquests factors de risc encara no està clarament establert, sembla ser que la regulació d'una sèrie de gens involucrats en la inflamació vascular per part de ROS podria ser el punt clau que unís el factors de risc que originen l'aterosclerosi [31]. D'aquesta manera, ROS o les seves dianes podrien modular l'expressió de gens amb capacitat aterogènica, entrant en un procés d'inflamació i disfunció endotelial; o modulant l'expressió de gens amb capacitat protectora o antiaterogènica, afavorint un estat antiinflamatori i per tant protegint el sistema vascular. Aquest procés vindrà establert pels nivells relatius de ROS, que activaran una via o l'altra [31]. Una de les dianes més susceptible a ser oxidada són les LDL, altament involucrades en la patogènesi de l'aterosclerosi, descrit anteriorment a l'apartat de Dislipèmia [32, 46].

La principal acció beneficiosa que s'ha atribuït als compostos fenòlics és a conseqüència de la seva capacitat antioxidant. Treballs que han utilitzat l'administració de vi negre com a font de compostos fenòlics en models animals, mostren una elevada protecció enfront processos oxidatius [82]. Altres treballs utilitzant models *in vitro*, s'observa una inhibició de l'oxidació de

les LDL i dels sistemes de membrana després d'un tractament amb proantocianidines purificades de cacau [83]. Estudis dins del nostre grup de recerca utilitzant un extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE), els flavanols monomèrics catequina i epicatequina, i el flavonol quercetina, produeixen efectes antígenotòxics, prevenint lesions al DNA després d'haver induït un estrès oxidatiu amb  $H_2O_2$  en cèl·lules hepàtiques *FAO* [84]. Treballs utilitzant cèl·lules *HepG2*, suggereixen que GSPE millora l'estat redox regulant els sistemes enzimàtics antioxidants, protegint la cèl·lula enfront el dany oxidatiu [80]. Utilitzant la integració de diferents models d'estudi: *in vivo*, *in vitro* i *in silico*, i després del tractament amb GSPE, s'observa un increment de l'activitat de l'enzim superòxid dismutasa depenent de coure i zinc (Cu/Zn-SOD), enzim que pot exercir un efecte protector envers el dany oxidatiu [85].

#### 1.4.4. Apoptosi

La mort cel·lular és una part important del desenvolupament. El cos humà està fet aproximadament de  $10^{14}$  cèl·lules. Cada dia bilions d'aquestes cèl·lules moren per assegurar la correcta funcionalitat de l'organisme sencer. Tot i així mantenim la mateixa mida degut a que hi ha un equilibri entre la divisió cel·lular i la mort cel·lular. Aquest procés està genèticament controlat, és vital durant el desenvolupament, pel manteniment de l'homeòstasi del teixits i també per mantenir un sistema immune efectiu [86].

La mort cel·lular està estretament lligada a l'homeòstasi dels teixits, i així no és sorprenent que la disrupció d'aquesta estigui implicada en nombroses condicions patològiques. Anormalitats en la regulació de la mort cel·lular podrien significar el desenvolupament de malalties com el càncer, síndromes autoimmunes, la SIDA, isquèmia, malalties del fetge, així com desordres neurodegeneratius com el Parkinson o l'Alzheimer [87, 88].

L'apoptosi es caracteritza per una sèrie de canvis bioquímics i morfològics com són la condensació del citoplasma i la compactació de la cromatina donant lloc a la formació d'agregats que es deslocalitzen per situar-se al voltant de la membrana nuclear. Posteriorment, sobre la cromatina actuen una sèrie d'endonucleases que tallen el DNA en fragments més petits. Una altra característica és la dilatació del reticle endoplasmàtic que origina la formació de vesícules que tenen tendència a unir-se a la membrana plasmàtica adquirint una forma característica de "bombolles". Finalment, la cèl·lula es fragmenta donant lloc als cossos apoptòtics. Aquests cossos apoptòtics, degut a la seva exposició de marcadors de fagocitosi a la superfície cel·lular, com la fosfatidilserina, són ràpidament reconeguts i fagocitats per macròfags i altres cèl·lules veïnes, impedit d'aquesta manera que la exposició del material intracel·lular al sistema immunitari, cosa que podria desencadenar una resposta



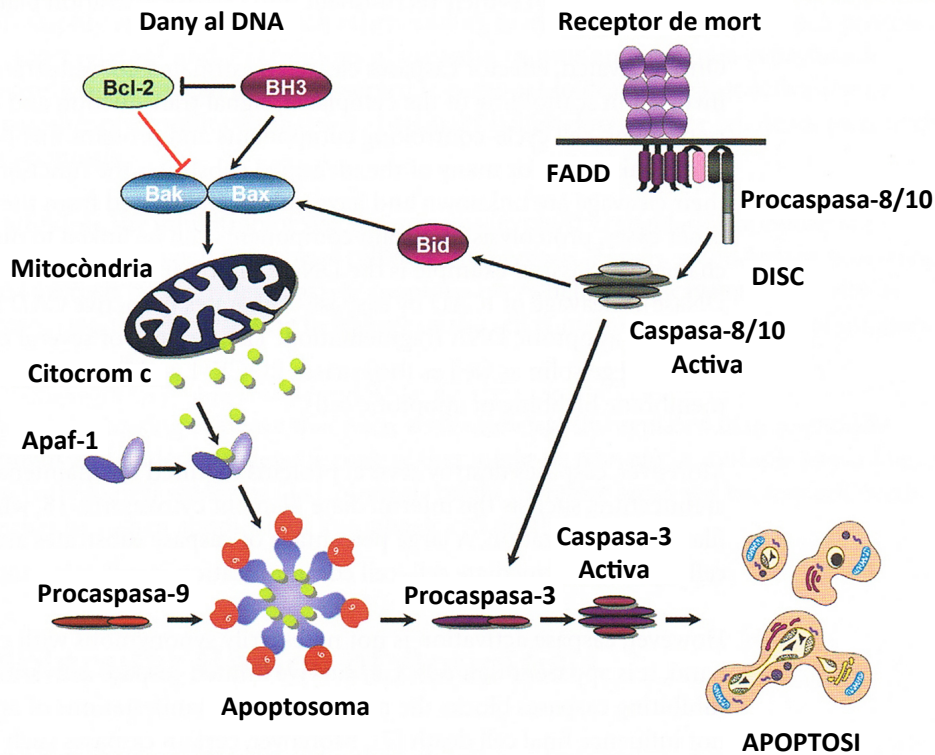
inflamatòria [87].

Les caspases són *cysteine aspartyl-specific proteases*. S'expressen constitutivament a la cèl·lula com a zimògens (procaspases), sense o amb molt poca activitat i es caracteritzen d'acord amb el tipus d'activació, de manera que trobem caspases efectores, com per exemple caspasa 3, 6 i 7, i caspases iniciadores, com per exemple caspasa 2, 8 i 9.

Les caspases efectores són homodímers constitutius que sempre són activades per les caspases iniciadores a través d'un tall proteolític a la unitat catalítica, cosa que fa augmentar la seva activitat en varis ordres de magnitud.

Les caspases iniciadores són les que primer s'activen després de l'estímul apoptòtic. Normalment es troben en forma de monòmers. La seva activació és mitjançant una homodimerització. Aquesta dimerització provoca un canvi conformacional donant lloc a l'activació del centre catalític.

L'activació de les caspases s'inicia per dues vies principals de senyalització (Figura 3) [87, 90]:



**Figura 3.** Transducció de la senyal apoptòtica. A la figura es mostren les principals vies d'apoptosi. A l'esquerra la via extrínseca mediada per receptors de mort. A la dreta la via intrínseca mediada per la mitocòndria. Adaptada de Fisher et al., 2005 [88].

#### 1.4.4.1. Via intrínseca o mitocondrial

Aquesta via està induïda per diversos tipus d'estrès com per exemple un dany en el DNA. La mitocòndria té un paper clau en la via intrínseca [88]. Està associada a una permeabilització de la membrana mitocondrial externa (PMME) i l'alliberació de proteïnes que normalment es troben a l'espai intermembrana de la mitocòndria com el citocrom c, així com l'activació de la procaspasa 9. El citocrom c funciona habitualment en processos de transport d'electrons de les cadenes respiratòries per la producció d'ATP. En canvi, al citosol de les cèl·lules apoptòtiques la seva funció és com a cofactor de la proteïna adaptadora Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*). Una vegada se li ha unit el citocrom c, Apaf-1 oligomeritza i recluta la caspasa 9, que és una caspasa iniciadora, donant lloc a la formació de l'apoptosoma. L'apoptosoma, serveix com a plataforma d'activació de les caspases, i una vegada se li ha unit la caspasa 9, aquesta passa a estar activa, fet que provoca l'activació de la cascada de les caspases.

El punt crucial per la via intrínseca, és la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (PMME), ja que normalment es defineix com el punt de no retorn. PMME està involucrada en la formació de porus que permeten l'alliberació de citocrom c [91]. Durant l'apoptosi, la PMME està essencialment controlada per proteïnes de la família Bcl-2. Nivells elevats del mateix Bcl-2 promouen el càncer degut a que inhibeixen l'apoptosi prolongant la supervivència cel·lular.

La família de Bcl-2 es pot dividir en dos subgrups: les que es consideren proteïnes antiapoptòtiques, que previndrien l'alliberament de citocrom c, i les proapoptòtiques que promourien PMME. Dins d'aquest últim podríem destacar Bax.

#### 1.4.4.2. Via extrínseca o de receptors de mort

Aquesta via juga un paper fonamental en el manteniment de l'homeòstasi dels teixits, especialment en el sistema immune [88]. Pot tenir lloc, encara que no sempre, de forma independent a qualsevol alteració de la mitocòndria. Es caracteritza per la unió de receptors de mort, que es troben a la superfície cel·lular, a lligands específics de mort, generant l'activació de la caspasa 8. Els receptors de mort pertanyen a la superfamília de receptors del factor de necrosi tumoral (TNF), com per exemple TNF-R1, CD95 (Fas/APO-1) o receptors d'unió al lligand TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) [92]. Tots els receptors de mort es caracteritzen per tenir un motiu intracel·lular, anomenat domini de mort (DD) que és important per la transmissió de la senyal apoptòtica. Una vegada se li ha unit el lligand, els receptors de mort interaccionen mitjançant el seu domini de mort, com per exemple FADD

(*FAS-associated death domain protein*), que és una proteïna adaptadora. Aquests adaptadors contenen un motiu efector que facilita la unió a la caspasa 8, una caspasa iniciadora. Tot aquest conjunt forma el complex DISC (*death-inducing signalling complex*), on una vegada ha tingut lloc la dimerització de la caspasa 8, porta a la seva activació per autocatalització i per tant la subseqüent activació de la cascada de caspases.

Totes dues vies tenen com a resultat l'activació de les caspases efectores i el trencament dels seus substrats diana, induint d'aquesta manera l'apoptosi.

Existeixen molts treballs adreçats a dilucidar els efectes de les proantocianidines sobre l'apoptosi. En estudis fets amb la línia cel·lular JB6 C141, una de les línies cel·lulars més adequada per l'estudi de la propagació de tumors, després de ser tractades amb un extracte de proantocianidines de pinyol de raïm, s'ha descrit una inducció de l'apoptosi depenent de p53 i mediat per les proteïnes diana Bcl-2 i Bax, amb una activació de la caspasa 3 per l'alliberament de citocrom c al citosol [93]. Altres estudis fets amb proantocianidines obtingudes de pomes, indiquen que la seva administració oral inhibeix la proliferació tumoral mitjançant la inducció d'apoptosi a través de la via intrínseca o mitocondrial [94].

#### **1.4.5. Heat shock proteins**

Les *heat shock proteins* (HSP) es produeixen en resposta a diferents tipus de condicions d'estrès, fent a les cèl·lules resistents al dany cel·lular induït per estrès [90]. Sota condicions normals, les HSP poden desenvolupar diferents funcions dins la cèl·lula, com la modulació de l'activitat proteica, ja sigui modificant la seva conformació, promovent l'ensamblatge/desensamblatge de complexos proteics, la regulació de la degradació proteica a través del proteasoma, la facilitació de la translocació proteica a través de les membranes dels orgànuls, i el plegament adequat de les noves cadenes de polipèptids durant la traducció. Quan hi ha estrès cel·lular, una resposta típica és la mort cel·lular, ja sigui per necrosi o per apoptosi. Recentment s'ha vist que la inducció de les HSP després d'un dany cel·lular podria prevenir l'apoptosi ja sigui per la via intrínseca o per la via extrínseca [90, 95]. Com s'ha comentat anteriorment, la via intrínseca es caracteritza per la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (PMME), l'alliberació de citocrom c, l'ensamblatge de l'apoptosoma i l'activació de les caspases. Les HSPs promourien la supervivència cel·lular mitjançant la prevenció de PMME o la formació de l'apoptosoma. En el cas de la via extrínseca que es caracteritza per l'activació de la caspasa 8 via unió de FADD, les HSPs protegrien la cèl·lula davant de l'apoptosi per la inhibició dels receptors de mort TNF.

Les HSP en els mamífers estan classificades en cinc famílies d'acord al seu pes molecular:

HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 i les HSPs petites [245]. Cada família de HSPs està formada per membres que s'expressen constitutivament o que poden ser regulables, a més de trobar-se en diferents compartiments. Així per exemple la HSP90 s'expressa constitutivament i de forma abundant en totes les cèl·lules, mentre que les HSP70 i HSP27 s'expressen després de ser induïdes per diferents tipus d'estrès com la temperatura, l'estrès oxidatiu o per drogues anticancerígenes [96, 245]. En un estat normal aquestes dues proteïnes de xoc tèrmic no es trobarien expressades o es trobarien a nivells molt baixos.

Hi ha un gran nombre de treballs on s'estudien els efectes dels flavonoides sobre les proteïnes de xoc tèrmic, i com aquests poden modular la seva expressió en un sentit favorable. En estudis fets amb quercetina, s'ha vist que inhibeixen la inducció de Hsp70, mentre que promouen la inducció de Hsp27 [96]. Altres estudis fets amb epigal·locatequina gal·lat (EGCG), demostren que tant la Hsp70 com la Hsp90, són potents dianes de EGCG, sent inhibides després de rebre un tractament amb aquest compost. La seva inhibició es correlaciona amb una menor incidència tumoral [97].

### **1.5. Genòmica nutricional**

La dieta és un factor ambiental que afecta a l'estat nutricional i que com a tal incideix sobre diverses malalties. El concepte "ambient" és molt ampli i extremadament complex, ja que engloba gran quantitat de factors com el fum del tabac, el consum de drogues, la exposició a toxines i l'estatus educacional i socioeconòmic entre d'altres. De fet, l'únic factor al que estem exposats permanentment des del nostre naixement fins a la nostra mort és el consum d'aliments, és a dir, la nostra dieta. I és per això que els hàbits alimentaris que adquirim durant la nostra vida representen un factor ambiental clau per la nostra salut [25, 27, 98].

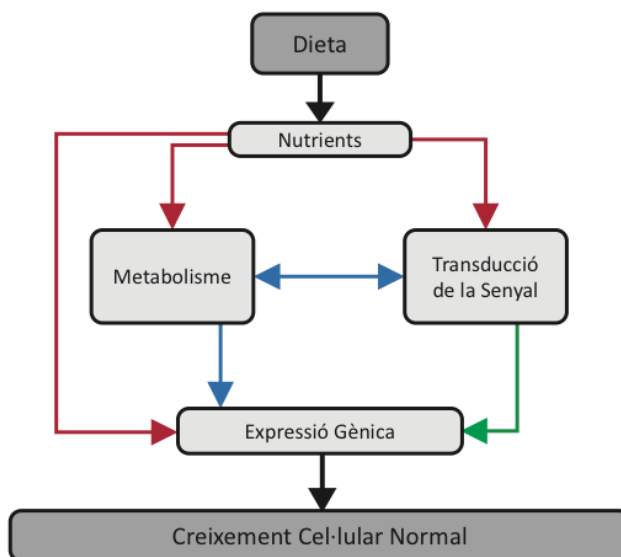
Actualment, la recerca en nutrició té com a focus la millora de la salut dels individus a través de la dieta, tenint com a objectiu promoure l'estat de salut i prevenir les malalties. Això requereix conèixer els mecanismes de prevenció i protecció, la identificació de les molècules biològicament actives i demostrar la eficàcia d'aquestes molècules [25, 99].

El reconeixement que els nutrients tenen la capacitat d'interaccionar i conseqüentment modular els mecanismes moleculars que són la base de les funcions biològiques d'un organisme ha generat una revolució en el camp de la nutrició [100]. Fins ara, la recerca en nutrició per la salut pública residia en la elaboració de guies de recomanacions dietètiques, les quals tenien com a objectiu la prevenció de malalties millorant la salut i frenant l'envelliment. Aquestes guies però, estan basades majoritàriament en estudis poblacionals, en els quals hi ha l'absència del coneixement genètic. Això dóna lloc a conclusions errònies i en molts casos a

recomanacions incompletes [98, 100]. No és fins fa relativament poc que s'han començat a examinar les interaccions gen-nutrient a nivell molecular, encara que ja va ser proposat anteriorment que les diferències en la resposta dels individus envers la dieta tenia components genètics [25, 98]. No obstant, els resultats d'aquests estudis, l'objectiu dels quals ha estat dilucidar les interaccions gen-nutrient per les malalties més comuns han estat majoritàriament controvertits i no conclusius [101].

Diversos estudis epidemiològics confirmen la existència que hi ha una certa associació entre la ingesta d'una determinada dieta i la incidència i severitat de les malalties cròniques, però no resulta tan fàcil distingir quines són les molècules bioactives del aliments responsables d'aquests efectes beneficiosos [102]. La varietat i les concentracions de les molècules bioactives presents als aliments poden tenir molts i diferents efectes sobre l'organisme ja que poden tenir un destí diferent una vegada han entrat a la cèl·lula. Així doncs, els components de la dieta podrien alterar l'expressió gènica directa o indirectament. A nivell cel·lular els nutrients poden (Figura 4):

- 1) Actuar com a lligands pels receptors dels factors de transcripció.
- 2) Ser metabolitzats per vies metabòliques primàries o secundàries, alterant d'aquesta manera la concentració de substrats o intermediaris.
- 3) Influir positiva o negativament sobre les rutes de senyalització.



**Figura 4.** Destí i activitat dels nutrients a la cèl·lula. Els nutrients poden actuar directament com a lligands dels receptors dels factors de transcripció (vermell); poden ser metabolitzats per vies metabòliques primàries o secundàries, de manera que alterin les concentracions dels substrats o intermediaris (blau) implicats en la regulació dels gens o la senyalització cel·lular; o finalment, poden alterar les vies de transducció de senyals (verd). Adaptada de Kaput et al., [105].

No hi ha cap dubte que alguns components de la dieta juguen un paper clau en la regulació de l'expressió gènica. El genoma humà és sensible al seu entorn nutricional, de manera que alguns gens poden modificar-se en resposta als components de la dieta, ja siguin d'origen animal o vegetal [103, 104].

L'aplicació de les tècniques de la biologia molecular i l'èxit del Projecte del Genoma Humà ha obert una nova era tant en medicina com en nutrició. Fins ara, un mínim de 1000 gens humans causants de malalties han estat identificats i parcialment caracteritzats. El 97% d'aquests gens són els causants de malalties monogèniques. No obstant, altres patologies com la obesitat, les malalties cardiovasculars, la diabetis, el càncer i altres malalties cròniques són degudes a un seguit de complexes interaccions entre diversos gens i factors ambientals. És per aquest motiu que les estratègies a seguir a l'hora d'identificar malalties monogèniques no donen resultats satisfactoris quan el que es vol és identificar els gens causants de les malalties cròniques [99, 100, 102].

La revolució genòmica ha promogut el desenvolupament d'un seguit de noves tècniques que poden ser aplicades a les ciències de la nutrició (Taula 4).

Nivell d'anàlisi	Definició	Mètode d'anàlisi
Genoma	Conjunt complet de gens d'un organisme o els seus òrgans	Seqüenciació sistemàtica del DNA
Transcriptoma	Conjunt complet de molècules de RNA missatger present en un cèl·lula, teixit o òrgan	<ul style="list-style-type: none"><li>- Hibridació</li><li>- SAGE (anàlisi en sèrie de l'expressió de gens)</li><li>- Microplataformes de DNA</li></ul>
Proteoma	Total de molècules proteiques presents en una cèl·lula, teixit o òrgan	<ul style="list-style-type: none"><li>- Electroforesi bidimensional</li><li>- Microplataformes de pèptids</li></ul>
Metaboloma	Conjunt complet de metabòlits (intermediaris de baix pes molecular) en una cèl·lula, teixit o òrgan	<ul style="list-style-type: none"><li>- Espectroscòpia amb llum infraroja</li><li>- Espectroscòpia de masses</li><li>- Espectroscòpia de ressonància magnètica</li></ul>

**Taula 4.** Descripció de les ciències "òmiques" que han generat un canvi quantitatiu apreciable en la genòmica nutricional [99, 106].

La utilització d'aquestes noves tècniques d'anàlisi del genoma està sent crucial pel desenvolupament de les ciències de l'alimentació i nutrició en les pròximes dècades i la seva integració en la era dels genomes funcionals [107]. Avui és clar que hi ha una interacció dinàmica i recíproca entre la nutrició i el genoma, la qual determina l'expressió gènica i la resposta metabòlica, afectant en últim terme l'estat de salut de l'individu i la seva predisposició a patir una malaltia. D'una banda, el bagatge genètic de cada individu pot determinar el seu estatus nutritiu, la seva resposta metabòlica i la seva predisposició a les

malalties depenents de la dieta. D'altra banda, els nutrients poden interactuar amb factors de transcripció per regular l'expressió gènica, reprimint o induint l'expressió de determinades proteïnes o alterar la resposta metabòlica. Aquesta relació dinàmica causa-efecte entre nutrició i genoma porta a la definició de genòmica nutricional en dos subgrups: **nutrigenètica** i **nutrigenòmica** [98-100, 104].

La genòmica nutricional es basa conceptualment en les següents consideracions [99, 102, 106, 108]:

- 1) Els components de la dieta poden actuar sobre el genoma humà, ja sigui directa o indirectament, alterant la seva expressió o estructura.
- 2) Sota determinades circumstàncies i en alguns individus, la dieta pot ser un factor de risc pel desenvolupament de determinades malalties.
- 3) El grau en el qual la dieta influeix en el balanç salut-malaltia pot dependre de la constitució genètica de l'individu.
- 4) Alguns gens regulats per la dieta (i les seves variants normals) poden jugar un paper important en l'inici, incidència, progressió i severitat de les malalties cròniques.
- 5) Qualsevol intervenció dietètica basada en el coneixement de les necessitats nutricionals, l'estat nutricional i el genotip (com per exemple la nutrició personalitzada) serà útil per la prevenció, mitigació o la curació d'una malaltia crònica.

### 1.5.1. Nutrigenètica

La nutrigenètica es refereix a l'anàlisi de les variacions genètiques entre individus i la seva resposta clínica a nutrients específics, és a dir, individus que responen de forma diferent a una mateixa dieta. Això indica en certa manera com la variació genètica determina el risc d'un individu a patir una malaltia, els seus requeriments nutritius, la seva resposta metabòlica i la seva sensibilitat als components bioactius de la dieta o a una teràpia nutritiva. Tot això inclou la identificació i caracterització de les variants gèniques associades a, o responsables de les diferències en la resposta als nutrients. Aquestes variacions individuals es donen a nivell de polimorfismes. Els polimorfismes més comuns són els denominats SNPs, que consisteix en el polimorfisme d'un sol nucleòtid, els quals s'han mostrat com una eina útil per investigar el paper de la nutrició en la salut o la malaltia i la seva integració en estudis epidemiològics, metabòlics i clínics, que poden contribuir a definir una dieta òptima en poblacions, grups o individus. La nutrigenètica pot identificar subgrups de població amb menys eficiència en vies

metabòliques específiques o individus amb grans necessitats que estan definides pel seu caràcter homozigot o heterozigot i als que se'ls hi pot proporcionar recomanacions d'ingesta adequades per al seu perfil genètic. És per això que la nutrigenètica ofereix la promesa de personalitzar la nutrició a la constitució genètica del consumidor, basant-se en els coneixement dels gens i del metabolisme dels nutrients [104, 108, 109].

### **1.5.2. Nutrigenòmica**

La nutrigenòmica fa referència al coneixement de com els components de la dieta modulen el funcionament de l'organisme regulant els nivells de l'expressió gènica. Des de la perspectiva de la nutrigenòmica, els nutrients serien senyals dietètiques que són detectades pels sistemes de sensors cel·lulars que influenciarien l'expressió gènica i la síntesi de proteïnes i subseqüentment la producció de metabòlits [104, 110]. En la patogènesi de molts desordres hi ha com a factor central l'expressió gènica. Existeixen diverses vies per les quals els components bioactius de la dieta alteren l'acció dels gens. Els factors de transcripció serien un mecanisme primari per la modulació de l'expressió gènica. L'activació d'un factor de transcripció desencadenaria una cascada de senyals dins de l'organisme, cosa que podria ser un factor crític en el desenvolupament d'una malaltia crònica. Cada vegada més, les investigacions estan prenent un enfocament cap a la identificació de components bioactius de la dieta, cosa que podrà utilitzar-se en el desenvolupament dels anomenats aliments "funcionals" per la prevenció o intervenció específica de les malalties [108]. La identificació d'aquests components comporta un gran desafiament, ja que els aliments són altament complexos i de gran variabilitat. L'organisme ha de gestionar un gran nombre de nutrients diferents i altres components de la dieta, i a més les concentracions d'aquest nutrients poden ser elevades (des de micromolar a mil·limolar) però sense arribar a la toxicitat. Cada nutrient pot tenir diferents dianes amb diferent afinitat i especificitat.

### **1.5.3. Compostos fenòlics de la dieta i genòmica nutricional**

Els compostos fenòlics entren a la dieta per la seva àmplia distribució en plantes comestibles [246]. Gran quantitat d'estudis epidemiològics han mostrat que els polifenols poden protegir enfront malalties com la obesitat, la diabetis, les malalties cardiovasculars o el càncer. Aquests mecanismes de protecció són en gran part a la seva capacitat antioxidant, com s'ha comentat anteriorment [1, 3]. La implicació dels compostos fenòlics en la senyalització cel·lular i la regulació de l'expressió gènica es considera també part de la protecció antioxidant [246]. La interacció d'aquests compostos a diferents nivells fa que siguin molècules de gran interès a l'hora de promocionar la salut des d'un punt de vista de la genòmica nutricional i la dietètica.



Estudis fets per la Universitat d'Alabama a *Birmingham's Center for Nutrient-Gene Interaction*, utilitzant tres tipus diferents de compostos fenòlics (la isoflavona genisteïna de la soja, l'estilbé trans-resveratrol del raïm i l'epigal·locatequina gal·lat del te verd) han investigat el seu paper en la prevenció del càncer de mama [246]. Els resultats d'aquest estudi posen de manifest que els efectes preventius depenen en gran part dels temps en que han estat exposats els animals a aquests compostos fenòlics. Així doncs, els efectes no eren els mateixos si els animals es trobaven en el naixement, en un període de deslletament o en la pubertat.

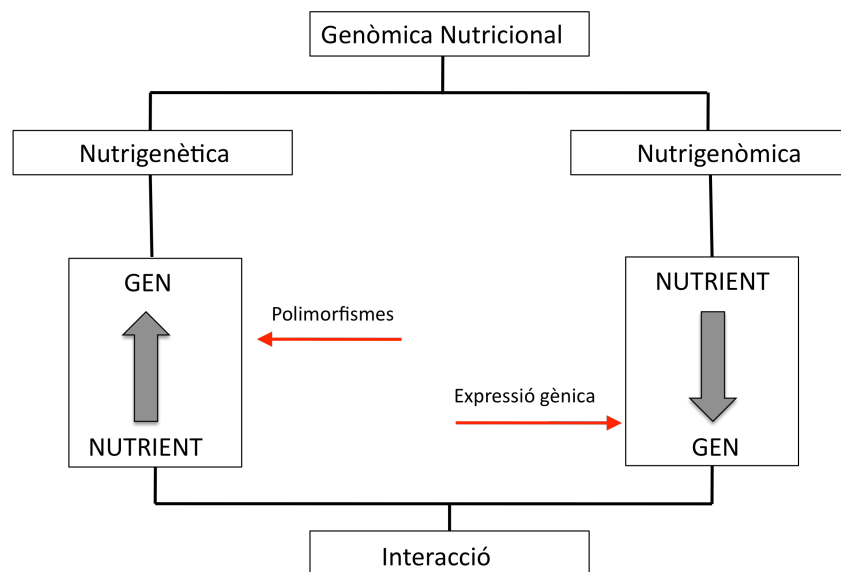


Figura 5. Esquema descriptiu de les interaccions gen-nutrient en la nutrició molecular [109].

## 1.6. Eines "òmiques"

Com s'ha comentat anteriorment, hi ha una sèrie de tecnologies genòmiques, com la transcriptòmica, proteòmica i metabolòmica, que es complementen d'acord amb la informació que proporcionen. La utilització paral·lela d'aquests mètodes ens permetrà descriure el fenotip d'un sistema biològic com l'ésser humà i tota la seva complexitat, la qual cosa és l'objectiu principal dels sistemes de nutrició biològica [111]. No hi ha dubte que no existeix una única tecnologia que ens solucioni totes les preguntes que ens puguin sorgir en el nostre treball d'investigació, és per això que s'ha de tenir molt clar quina triar tenint en compte els nostres objectius i les limitacions que pugui presentar aquesta.

### 1.6.1. Transcriptòmica

La transcriptòmica està focalitzada a l'anàlisi del RNA (el transcriptoma), i el seu objectiu és la mesura a nivell d'expressió de tots els gens basats en la quantitat de RNA present en una mostra [99]. La transcriptòmica és relativament la tècnica més evolucionada en comparació a

les altres tecnologies “òmiques”. Això és degut a que la transcriptòmica ens permet una visió virtual de l’expressió de tots els gens en un únic experiment, en canvi, encara que les tècniques de mesura de tot el proteoma i metaboloma estan avançant ràpidament [111, 112] no estan al mateix nivell que les utilitzades per la transcriptòmica.

El desenvolupament de la tecnologia de micromatrius de DNA, els anomenats microarrays està proporcionant als científics nutricionals una eina molt poderosa a l’hora d’examinar els llocs d’acció dels components de la dieta i les seves interaccions amb els processos cel·lulars. La monitorització de l’expressió gènica amb els microarrays de DNA permet l’estudi simultani de milers de gens i la seva expressió relativa entre cèl·lules normals i cèl·lules que pateixen una malaltia, o també de cèl·lules abans i després d’una intervenció dietètica. Aquesta tecnologia i la informació que proporciona és una eina clau a l’hora del descobriment de nous biomarcadors per la diagnosi i prognosi de malalties. L’ús d’una aproximació molecular a la salut i/o la malaltia ens pot ajudar a la introducció d’una medicina personalitzada i la determinació d’una estratègia clínica a seguir més acurada i apropiada a cada pacient [105, 106]. Degut a que un microarray només dona l’expressió en un punt determinat, la seva interpretació és més aviat una possibilitat que no pas una realitat. Això és per la capacitat dels sistemes biològics a adaptar-se a les condicions de l’ambient. Una altre punt a tenir en compte, és l’anàlisi de dades que es generen i la limitació de les eines (software) existents. Les eines bioinformàtiques encara no són prou efectives per l’anàlisi d’aquesta quantitat massiva de dades i la comparació de resultats obtinguts amb uns i altres programes pot donar interpretacions diferents [99, 106, 110].

### **1.6.2. Proteòmica**

Els components de la dieta també poden modificar la traducció del RNA a proteïna així com processos post-transduccionals, els quals poden afectar a l’activitat proteica [99]. Així com el genoma inclou la globalitat dels gens, el proteoma és la totalitat de les proteïnes produïdes per una espècie. A diferència del genoma, el proteoma és dinàmic i varia d’acord al tipus cel·lular i a l’estat funcional de la cèl·lula. L’estudi del proteoma és de gran interès degut als components bioactius presents a la dieta, els quals poden tenir uns efectes altament marcats sobre el proteoma, cosa que a nivell de genoma, aquests components tindrien una influència limitada. La proteòmica per tant, és l’estudi a gran escala de la concentració de proteïnes presents en un moment determinat [106]. La descripció del proteoma permet tenir una imatge dinàmica de totes les proteïnes expressades en un moment concret i sota determinades condicions de temps i ambient. L’estudi i comparació sistemàtics del proteoma en diferents situacions

metabòliques i/o patològiques permet identificar aquelles proteïnes, la presència, absència o alteració de les quals es relaciona amb determinats estats fisiològics. En el cas concret de l'anàlisi proteòmic associat a patologies concretes, és possible identificar proteïnes que ens permetran diagnosticar una malaltia o pronosticar l'evolució de la mateixa, el qual ens porta al seu reconeixement com a possibles biomarcadors [99, 106, 110].

### **1.6.3. Metabolòmica**

Aquesta és una de les tecnologies "òmiques" més nova fins al moment. Està focalitzada en l'anàlisi dels metabòlits o metaboloma [99]. La metabolòmica intenta mesurar la concentració de totes les substàncies diferents de DNA, RNA o proteïnes presents en una mostra. El metaboloma compren el conjunt complet de metabòlits sintetitzats per un sistema biològic. Així doncs, un sistema pot ser definit pel seu nivell d'organització biològica com un organisme, un òrgan, un teixit, una cèl·lula o nivells de compartimentització cel·lular. Actualment, les tècniques que s'adapten millor a l'anàlisi del metaboloma són la ressonància magnètica nuclear (NMR) i la espectrometria de masses (MS). El gran atractiu d'aquesta tècnica és l'anàlisi quantitatiu i no invasiu degut a la facilitat d'obtenció de les mostres, que poden ser sang, saliva, suor, llàgrimes, orina i femta [99, 106, 110].

### **1.7. Biomarcador**

Un biomarcador (marcador biològic), terme que es va introduir al 1989 al Medical Subject Heading (MeSH), és una característica que es pot mesurar objectivament i avaluar com indicador de processos biològics normals, processos patològics, o respostes farmacològiques a intervencions terapèutiques, definició estandarditzada per NIH al 2001 [113, 114]. Pot ser mesurat a partir d'una mostra biològica (sang, orina...), directament de la persona (pressió sanguínia), o mitjançant un test d'imatge com un ecocardiograma. Pot indicar diferents característiques d'un estat saludable o de malaltia, tals com respostes genètiques després d'una exposició o indicadors de resposta a una teràpia. Això es pot simplificar dient que un biomarcador ens indica en quina etapa de la malaltia ens trobem: indicis de malaltia (factors o marcadors de risc), estat de malaltia i progressió de la malaltia. Així per exemple en el desenvolupament de malalties cardiovasculars, es podrien identificar factors de risc tals com resistència a insulina, obesitat o hipertensió, entre d'altres. Aquests factors de risc poden induir aterosclerosi, factor desencadenant de les malalties cardiovasculars (CVD), [32, 45, 46, 113]. Així doncs, els biomarcadors es podran classificar en base a la informació que proporcionen (Taula 5) [113]:

<b>Classificació</b>	<b>Definició</b>
Biomarcadors de detecció primerenca	Identifiquen el risc de desenvolupar una malaltia
Biomarcadors d'exploració o <i>screening</i>	Exploració de malalties subclíniques
Biomarcadors de diagnòstic	Reconeixement d'una malaltia evident
Biomarcadors d'estadificació	Categorització de la severitat de la malaltia
Biomarcadors prognòstics	Informació sobre la futura evolució de la malaltia, incloent una resposta a la teràpia i monitoritzant l'eficàcia d'aquesta

**Taula 5.** Classificació de biomarcadors segons la informació que proporcionen [113].

Les característiques desitjades d'un biomarcador vindran establertes pel tipus de marcador que es busqui. Aquests permetran detectar quin tipus de pacient s'està tractant i d'aquesta manera fer un seguiment més acurat. Independentment de la seva aplicació, cada nou biomarcador ha de complir una sèrie de característiques perquè el facin clínicament útil, tals com ser precisos, obtenir-se de forma estandarditzada, han de ser fàcilment interpretables i han de tenir una elevada especificitat i sensibilitat per la característica que han d'identificar. Es podran classificar en biomarcadors destinats per fer rastreig, diagnosi i prognosi [113]. Així doncs, en el cas de fer un rastreig, on el que es pretén es identificar pacients vulnerables, es buscarà que tinguin una elevada sensibilitat (detectar malaltia), especificitat (detectar sans) i baixos costos. Per fer diagnòstic, on el que es pretén és identificar danys o isquèmia, a part de les característiques anteriors també es vol que tingui una elevada especificitat pel teixit, per trobar l'origen, que sigui proporcional a l'extensió de la malaltia i que siguin de diagnòstic immediat. Per marcadors que monitoritzen la progressió de la malaltia o la resposta a una teràpia les característiques anteriors no són tan importants [113].

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

## 2. JUSTIFICACIÓ i OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

Les proantocianidines són components d'origen vegetal presents habitualment a la dieta amb coneguts i ben descrits efectes com antioxidants. A partir d'informació obtinguda d'estudis epidemiològics, confirmada en estudis d'intervenció nutricional fets principalment amb animals d'experimentació, s'han descrit molts efectes positius de les proantocianidines millorant la sintomatologia de força patologies d'àmplia prevalença com les cardiovasculars, dislipèmia, diabetis, inflamació, càncer o envelliment.

Les característiques de les proantocianidines com antioxidants no expliquen l'ampli ventall d'efectes bioquímics i fisiològics descrits per a aquestes molècules. La ben coneguda capacitat de les proantocianidines d'interactuar amb les proteïnes condicionant la seva desnaturalització, tampoc explica el conjunt d'efectes descrits.

Les evidències experimentals apunten cap a un rol d'aquestes molècules relacionat amb la xenohormesi, teoria plantejada el 2004 [115] que postula que algunes molècules produïdes per les plantes en situacions d'estrès, com els polifenols entre els que s'hi inclouen les proantocianidines, actuen de senyals sobre els consumidors de les plantes fent possible l'adaptació del seu metabolisme a les conseqüències de l'estrès de la planta.

La hipotètica funció de molècules senyal entre espècies, comporta que les proantocianidines tinguin capacitat d'interactuar amb els processos clau de regulació del metabolisme, especialment en el procés d'expressió de la informació gènica. El grup de recerca en el qual s'ha realitzat la present tesi ha comprovat que, efectivament, les proantocianidines tenen una clara capacitat d'actuar sobre els processos de regulació de l'expressió gènica, molt especialment actuant sobre el sistema de receptors nuclears.

Si molècules com les proantocianidines tenen el potencial de modular selectivament l'expressió gènica, condicionant una adaptació homeostàtica per prevenir el desequilibri condicionat per estrès, ja sigui metabòlic, oxidatiu o inflamatori, podem comprendre la multitud d'efectes positius descrits per a les proantocianidines.

És en aquest context que es planteja demostrar la següent hipòtesi: **les proantocianidines actuen modulant l'expressió diferencial de gens diana per condicionar una adaptació homeostàtica que previngui situacions d'estrès metabòlic, oxidatiu o inflamatori.**

Per a resoldre la hipòtesi s'ha realitzat un treball sistemàtic de recerca amb els objectius que es descriuen a continuació.

Una primera aproximació ha consistit en estudiar l'efecte a curt termini de l'administració d'una dosi aguda d'un extracte de proantocianidines sobre el transcriptoma hepàtic. És una



situació experimental forçada, fora de la realitat del context de la teoria de la xenohormesi en la que es mou la nostra hipòtesi, però que ens havia de permetre visualitzar si l'expressió gènica és selectivament sensible a les proantocianidines i conèixer quins gens responien a aquesta situació. Per a aquest plantejament s'ha fet servir una dosi de 250 mg d'un extracte de proantocianidines de pinyol de raïm/kg de pes corporal, dosi i extracte prou ben coneguts per experiments previs del grup de recerca i en la qual ja s'havia realitzat una aproximació similar amb anterioritat que havia quedat com a resultats previs inicials. Aquesta primera aproximació constitueix l'**objectiu 1** de la tesi: *Estudi mitjançant transcriptòmica no dirigida dels canvis d'expressió gènica en fetge de rates tractades amb una dosi aguda d'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm.*

Una dosi de 250 mg/kg és unes 20 vegades el que podria ser un consum habitual. En humans hom estima que en condicions de dieta normal el consum de proantocianidines és d'uns 0,5-1 g/dia, el que equival en promig a uns 7-14 mg/kg. Per tal de reproduir una situació propera a la realitat i ja en el context de la teoria de la xenohormesi, la següent aproximació experimental ha consistit en treballar en unes condicions d'administració crònica d'un extracte de proantocianidines de pinyol de raïm de tres setmanes de durada i a dues dosis: 5 i 25 mg/kg. La primera, una dosi en el límit inferior del consum habitual en humans i la segona unes 2-3 vegades superior al consum habitual però que representa una dosi consumible fàcilment per humans ja que equivaldria a uns 2 g/dia de proantocianidines. En aquesta segona aproximació, no es tracta ja només d'identificar gens diana a curt termini, sinó de comprovar quina és l'adaptació bioquímica que condiciona el consum habitual d'aquestes molècules, estudi que es configura com l'**objectiu 2** de la present tesi: *Estudi mitjançant transcriptòmica no dirigida dels canvis d'expressió gènica en fetge de rates tractades crònicament amb dues dosis moderades d'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm.*

Les dues primeres aproximacions ens havien de servir per al punt clau d'interacció de les proantocianidines sobre la maquinària d'expressió gènica, treballant amb una barreja de proantocianidines rica en monòmers i oligòmers com la que es pot donar en una dieta habitual. En interessava, però, conèixer si diferents molècules induïen efectes diferents o equivalents, un punt clau en la teoria que defensa el potencial de les proantocianidines com a com a molècules senyalitzadores. Per a afrontar aquesta part s'ha utilitzat una estratègia experimental diferent, fent servir un model de cèl·lules hepàtiques en cultiu tractades amb molècules pures que està demostrat arriben a les cèl·lules entre 1 i 2 hores després del seu consum. Així podíem atribuir directament els potencials efectes diferencials sobre l'expressió gènica a una o altra molècula. S'han utilitzat tres molècules diferents: un monòmer,

epicatequina, un dímer de catequina i un trímer de catequina a dosis relativament moderades però que permeten visualitzar el seu potencial. Aquesta part és configura com l'**objectiu 3** de la tesi: *Estudi mitjançant transcriptòmica no dirigida dels canvis d'expressió gènica en cèl·lules hepàtiques tractades amb epicatequina, dímer de catequina i trímer de catequina.*

La darrera part de la tesi, cronològicament no obstant la primera que es va afrontar, pretén buscar la simplificació de la transcriptòmica dirigida de cara a l'aplicabilitat real dels estudis que es centren en la interacció nutrients-gens com els que es plantegen en el present treball. La interpretació dels resultats en els estudis de transcriptòmica no dirigida és complexa i encara que prou útil i innovadora, no és prou pràctica per a treballs focalitzats en problemes bioquímics concrets o en situacions d'estrès determinat. La transcriptòmica dirigida, que precisa d'un acurat procés de selecció dels gens d'interès, permet per contra identificar amb relativa facilitat la interacció dels nutrients amb el procés d'expressió gènica i per tant obre les portes a una aplicabilitat dels estudis més realista.

Donat que la primera part de la tesi va ser finançada en el context d'un projecte CENIT que buscava biomarcadors per a dissenyar ingredients funcionals utilitzables en prevenció de patologies cardiovasculars a través de la transcriptòmica, es va realitzar un estudi amb cèl·lules hepàtiques i amb cèl·lules endotelials en cultiu tractades amb un extracte de proantocianidines de pinyol de raïm, amb un extracte ric en oligòmers purificat a partir de l'extracte genèric, amb epigal·locatequina gal·lat, dímer B2 i trímer C1 per tal de visualitzar els canvis d'expressió en un conjunt de gens implicats en la patologia cardiovascular seleccionats a partir de la informació bibliogràfica disponible. En el context global de la tesi, aquesta aproximació experimental s'ha configurat com l'**objectiu 4**, *Estudi mitjançant transcriptòmica dirigida dels canvis d'expressió gènica en cèl·lules hepàtiques i cèl·lules endotelials tractades amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm, extracte de proantocianidines ric en oligòmers, epigal·locatequina gal·lat, dímer B2 i trímer C1*, ja que permet comprovar els canvis de la transcriptòmica no dirigida i ampliar l'estudi a cèl·lules endotelials.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

### **3. MATERIALS i MÈTODES**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

### 3.1. Proantocianidines

L'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE) ha estat proporcionat per Les Dérives Résiniques et Terpéniques (Dax, France). D'acord amb el fabricant aquest extracte conté essencialment un 21.3% d'estructures monomèriques, un 17.4% d'estructures dimèriques, un 16.3% d'estructures trimèriques, un 13.3% d'estructures tetramèriques, un 31,7% d'oligòmers de proantocianidines (5-13 unitats) i un 4,7% d'àcids fenòlics.

Els compostos purs utilitzats per l'assaig de transcriptòmica dirigida, l'epigal·locatequina gal·lat (EGCG) i la procianidina B2 (dímer) s'han obtingut de la casa comercial Sigma (Madrid, Espanya); i la procianidina C1 (trímer) i l'extracte de proantocianidines ric en oligòmers (F8) s'han obtingut a partir d'un fraccionament de l' extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE) [79].

Els compostos purs utilitzats per l'assaig de transcriptòmica no dirigida, el monòmer epicatequina, el dímer de catequina i el trímer de catequina, han estat obtinguts d'un extracte de proantocianidines de cacau, mitjançant una separació en funció del seu grau de polimerització utilitzant la tècnica de HPLC semipreparativa.

### 3.2. Models animals

Els animals d'experimentació utilitzats han estat rates Wistar mascle, pesant tots els animals aproximadament 350 g en el moment del sacrifici. Han estat obtingudes de Charles River (Barcelona, Spain). El Comitè d'Ètica Animal de la Universitat Rovira i Virgili ha aprovat tots els procediments als quals han estat sotmesos aquests animals. Els animals han estat a l'estabulari sota condicions constants de llum i temperatura, un cicle de 12 h de llum/12 h de foscor (llum 9:00h – 21:00h) i 22°C. Han estat alimentats *ad libitum* amb una dieta de pinso estàndard (Panlab, Barcelona, Spain) i aigua de l'aixeta. Tots els animals han tingut un mínim d'una setmana d'aclimatació abans de començar cada un dels diferents experiments.

#### 3.2.1. Experiment Agut

Els animals s'han dividits en 6 grups, 3 grups control i 3 grups tractats amb GSPE, 5 rates en cada grup. Tots els animals han estat sotmesos a un dejuni de 14h abans de l'experiment. Als grups control se'ls ha administrat com a vehicle llard de porc mitjançant una sonda intragàstrica a una dosi 2.5 ml/Kg pes, mentre que els grups tractats han rebut conjuntament amb el vehicle una dosi de GSPE de 250 mg/Kg pes. 1h, 3h i 5h després del tractament, els animals han estat anestesiats intraperitonealment amb ketamina (70 mg/Kg) i xilacina (5 mg/Kg) i exsanguinats per la aorta abdominal. Els teixits d'interès han estat extrets i congelats

immediatament en nitrogen líquid. El plasma s'ha obtingut per centrifugació a 2500 g durant 20 min a 4°C. Tant el plasma com els teixits s'han guardat a -80°C fins al moment de la seva anàlisi.

### 3.2.2. Experiment crònic

Els animals han estat dividits en 3 grups, 1 grup control i 2 grups tractats amb GSPE, amb 10 rates en cada grup. Cada dia al grup control se li ha administrat oralment llet condensada a una dosi de 2 ml/Kg pes com a vehicle, mentre que els grups tractats han rebut conjuntament amb el vehicle una dosi de GSPE de 5 i 25 mg/Kg pes respectivament. Tres setmanes després d'haver començat el tractament tots els animals han estat sotmesos a un dejuni de 14h abans del sacrifici. El dia de sacrifici al grup control se li ha administrat com a vehicle llard de porc mitjançant una sonda intragàstrica 2.5 ml/Kg pes, mentre que els grups tractats han rebut conjuntament amb el vehicle una dosi de GSPE de 5 i 25 mg/Kg pes. 3h després del tractament, els animals han estat anestesiats intraperitonealment amb ketamina (70 mg/Kg) i xilacina (5 mg/Kg) i exsanguinats per la aorta abdominal. Els teixits d'interès han estat extrets i congelats immediatament en nitrogen líquid. El plasma s'ha obtingut per centrifugació a 2500 g durant 20 min a 4°C. Tant el plasma com els teixits s'han guardat a -80°C fins al moment de la seva anàlisi.

### 3.3. Models cel·lulars

#### 3.3.1. Cèl·lules endotelials HUVEC

Les cèl·lules normals HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) provenen d'un pool de múltiples donants, criopreservades al final d'un cultiu primari. Han estat obtingudes de Cascade Biologics™. S'han fet créixer en medi líquid estèril (Medium 200; *phenol red-free*); aquest és un medi de cultiu basal que conté aminoàcids essencials i no-essencials, vitamines i altres compostos orgànics, a més de traces de minerals i sals inorgàniques. És un medi tamponat amb HEPES i bicarbonat, i està dissenyat per ser utilitzat en incubador amb una atmosfera al 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. S'ha suplementat amb LSGS kit (medi complet) per tal que el cultiu i la proliferació de les cèl·lules sigui òptim. Les concentracions finals dels components del medi suplementat són les següents: sèrum boví fetal (FBS), 2% v/v; hidrocortisona, 1 mg/ml; factor de creixement epidèrmic humà (EGF), 10 ng/ml; factor de creixement bàsic de fibroblast (bFGF), 3 ng/ml; heparina, 10 mg/ml; a més d'una solució d'antibiòtics (gentamicina/amfotericina B). El medi de cultiu ha d'estar protegit de la llum degut a que conté components sensibles a la llum. S'han fet créixer en un incubador a 37°C amb una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Els reactius necessaris per treballar amb aquestes cèl·lules s'han obtingut de Cascade Biologics™.

### 3.3.1.1. Descongelació

Les cèl·lules estan emmagatzemades en un criotub en fase vapor de nitrogen líquid. Per descongelar les cèl·lules, s'ha d'introduir la meitat del criotub dins d'un bany a 37°C i agitar-lo suaument; ha de ser una descongelació ràpida, inferior a 2 minuts. Una vegada descongelades s'ha de fer una dilució d'aquesta suspensió de cèl·lules en medi suplementat i sembrar-les a una densitat mínima de  $2.5 \cdot 10^3$  cèl·lules viables/cm<sup>2</sup> (Protocol Cascade Biologics per cèl·lules *HUVEC*). Es recomana no tocar el cultius fins que no hagin passat 24h després d'haver sembrat (Protocol Cascade Biologics). Quan s'ha establert el cultiu, s'ha de canviar medi cada 48h. Una vegada les cèl·lules arriben al 80% de confluència, s'ha de canviar el medi de cultiu cada 24h.

### 3.3.1.2. Tripsinització i manteniment cel·lular

Per fer el manteniment cel·lular, es segueix el protocol de la casa comercial Cascade Biologics™, amb alguna petita modificació per tal d'optimitzar el procediment. El subcultiu es realitza en flascons de 75 cm<sup>2</sup>. Es recomana realitzar el subcultiu una vegada han adquirit una confluència del 80% per no alterar el seu cicle cel·lular. El procediment que s'ha seguit és el següent. En primer lloc s'aspira tot el medi del flascó, i es renten dues vegades les cèl·lules amb PBS 1X. A continuació s'afegeixen 2 ml de tripsina i s'observen les cèl·lules sota el microscopi. Després d'uns 30 segons, les cèl·lules adquireixen una morfologia arrodonida i es comencen desenganxar de la superfície del flascó. Al cap d'un minut d'haver afegit la tripsina totes les cèl·lules han passat d'una morfologia allargada a ser rodones completament. Aquest procés té lloc a temperatura ambient. En aquest moment s'ha de neutralitzar la tripsina perquè no faci malbé les cèl·lules. Per dur a terme aquest pas, s'afegeixen 4 ml de *Trypsin Neutralizer* (Cascade Biologics™) per inactivar la tripsina, i aquesta suspensió cel·lular es posa en un tub de rosca estèril de 15 ml. S'afegeixen 4 ml més de *Trypsin Neutralizer* per acabar de recollir les cèl·lules que hagin pogut quedar al flascó. Aquest volum també es posa al tub de 15 ml. A continuació es centrifuga durant 7 minuts a 180 g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). S'aspira el sobrenedant i el pellet obtingut es ressuspén en 4 ml de medi suplementat, fins a obtenir una suspensió cel·lular homogènia. Es recomana sembrar  $2.5 \cdot 10^3$  cèls/cm<sup>2</sup>. Es mantindran en un incubador a 37°C amb una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>.



### 3.3.1.3. Tractament

Per la realització de posteriors anàlisis d'expressió gènica, les cèl·lules endotelials HUVEC van ser tractades amb l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE) i Fracció 8 (F8) a una dosi de 25 mg/l durant dues hores respectivament.

### 3.3.2. Cèl·lules hepàtiques *HepG2*

Les cèl·lules *HepG2* són una línia humana establerta de cèl·lula d'hepatocarcinoma amb una morfologia epitelial. Provenen d'un adolescent de 15 anys mascle caucàsic. Les cèl·lules hepàtiques humanes transformants *HepG2* (HB8065) s'han obtingut de l'American Type Culture Collection (ATCC).

La manera de propagar aquestes cèl·lules és amb un medi de creixement complet de l'ATCC; aquest és un medi mínim essencial (*Dubelcco's modified Eagle's medium* (DMEM), Cambrex). Es suplementa amb 2 mM de L-Glutamina (Cambrex) i 0.1 mM d'aminoàcids no essencials (Cambrex); a més de sèrum fetal boví al 10%, (Cambrex), que ha estat inactivat a 56°C durant 30 min. S'han de mantenir a l'incubador a una temperatura de 37°C amb el 5% de CO<sub>2</sub>. Al medi és important posar penicil·lina i estreptomicina per evitar contaminacions, ambdues al 1%.

#### 3.3.2.1. Descongelació

Les cèl·lules estan emmagatzemades en un criotub en fase vapor de nitrogen líquid. Per descongelar les cèl·lules, s'ha d'introduir la meitat del criotub dins d'un bany a 37°C i agitar-lo suaument; ha de ser una descongelació ràpida, inferior a 2 minuts. Una vegada descongelades s'introdueix tot el contingut del criotub,  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules, en un flascó de 25 cm<sup>2</sup>. Quan s'ha establert el cultiu, s'ha de canviar el medi cada 48h. Una vegada les cèl·lules arriben al 80% de confluència és convenient tripsinitzar i fer subcultius.

#### 3.3.2.2. Tripsinització i manteniment cel·lular

Per fer el manteniment cel·lular, es segueix el protocol de l'ATCC, amb alguna petita modificació per tal d'optimitzar el procediment. El creixement òptim és en monocapa i va lligat a com s'han sembrat les cèl·lules. El subcultiu es fa en flascons de 75 cm<sup>2</sup>. El procediment que s'ha seguit és el següent. En primer lloc s'aspira tot el medi del flascó, i es renten dues vegades les cèl·lules amb PBS 1X. A continuació s'afegeixen 2 ml de tripsina i s'introdueix el flascó durant 2 minuts a l'incubador a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Transcorregut aquest temps, s'observa la superfície del flascó a contrallum. Es distingeix un tel blanquinos que es desenganxa de la superfície del flascó. En aquest moment s'inactiva la tripsina afegint 8 ml de medi DMEM suplementat i es pipeteja suaument per disgregar completament les cèl·lules. El ràtio de

subcultiu recomanat per l'ATCC és de 1:4 o 1:6. Es mantindran en un incubador a 37°C amb una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>, canviant el medi cada 48h fins al moment de tripsinitzar una altra vegada.

### **3.3.2.3. Tractament**

Per la realització de posteriors anàlisis d'expressió gènica, les cèl·lules hepàtiques HepG2 van ser tractades amb l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE) i Fracció 8 (F8) a una dosi de 50 mg/l durant 9 hores respectivament; i amb GSPE, F8, EGCG, B2 i C1 a una dosi de 10 mg/l durant 9h respectivament.

### **3.3.3. Cèl·lules hepàtiques FAO**

Les cèl·lules FAO és un subclon de la línia cel·lular de fetge de rata H4IIEC3 obtinguda de l'hepatoma de Reuber H35 de fetge de rata.

El medi de creixement es prepara de la següent manera. Es netegen 2 ampolles de 500 ml, s'autoclaven i es deixen tota la nit a l'estufa a 65°C perquè s'assequin completament. A continuació es posen sota la llum UV durant un mínim 30 min. En 900 ml d'aigua milli-Q s'afegeix el contingut de medi en pols *F-12 Coon's Modification* (Sigma). S'afegeixen 2,68 g de bicarbonat sòdic i s'agita fins a una dissolució completa. S'ajusta el pH a 7,3 amb HCl 1M. Finalment s'enrasa a 1L amb aigua milli-Q. Aquest medi s'ha de filtrar amb un filtre de 0,22 µm de diàmetre. Les ampolles es tapen protegides de la llum amb paper d'alumini i a una temperatura de 4°C. Pel cultiu de les cèl·lules FAO el medi s'ha de suplementar amb sèrum fetal boví al 5%, (Cambrex), que ha estat inactivat a 56°C durant 30 min, 0.1% fungizona (BioWhittaker), 1% penicil·lina/estreptomicina (BioWhittaker) per evitar contaminacions. S'han de mantenir a l'incubador a una temperatura de 37°C amb el 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.3.3.1. Descongelació**

Les cèl·lules estan emmagatzemades en un criotub en fase vapor de nitrogen líquid. Per descongelar les cèl·lules, s'ha d'introduir la meitat del criotub dins d'un bany a 37°C i agitar-lo suaument; ha de ser una descongelació ràpida, inferior a 2 minuts. Una vegada descongelades s'introdueix tot el contingut del criotub,  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules, en un flascó de 25 cm<sup>2</sup>. Quan s'ha establert el cultiu, s'ha de canviar medi cada 48h. Una vegada les cèl·lules arriben al 80% de confluència és convenient tripsinitzar i fer subcultius.

#### **3.3.3.2. Tripsinització i manteniment cel·lular**

Per fer el manteniment es segueix el següent procediment. El creixement òptim és en monocapa i va lligat a com s'han sembrat les cèl·lules. El subcultiu es fa en flascons de 75 cm<sup>2</sup>.

En primer lloc s'aspira tot el medi del flascó, i es renten dues vegades les cèl·lules amb PBS 1X. A continuació s'afegeixen 2 ml de tripsina i s'introdueix el flascó durant 5 minuts a l'incubador a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Transcorregut aquest temps s'observa el flascó, s'aprecia com les cèl·lules es desenganxen de la superfície del flascó. En aquest moment s'inactiva la tripsina afegint 8 ml de medi *F-12 Coon's Modification* suplementat i es pipeteja suaument per disgregar completament les cèl·lules. Es fa un subcultiu amb una dilució 1:4. Es mantindran en un incubador a 37°C amb una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>, canviant el medi cada 48h fins al moment de tripsinitzar una altra vegada.

### 3.3.3.3. Tractament

Per la realització de microarrays d'alta densitat, les cèl·lules hepàtiques *FAO* van ser tractades amb epicatequina i amb un trímer a una dosi de 50 mg/l durant 5 hores; i amb una dosi de 10 mg/l durant 5h en el cas del dímer.

## 3.4. Aïllament i quantificació de RNA

### 3.4.1. Teixit: fetge

El fetge congelat s'homogeneïtza sota atmosfera de nitrogen líquid. Per una homogeneïtzació òptima, s'utilitza el Lysing Matrix D amb l'aparell FastPrep. El RNA total s'aïlla amb *RNeasy mini kit* (Qiagen, Germany) segons les instruccions del fabricant. Aquest RNA s'elueix amb 60 µl d'aigua *RNase-Free* (Qiagen, Germany). La integritat i qualitat del RNA es comprova espectrofotomètricament amb el *Nanodrop* (Isogen Life Science) i un gel d'agarosa. Totes les mostres de RNA tenen un ràtio OD260/280 entre 1.9 i 2.1, i un ràtio OD260/230 superior a 1.8; visualment totes les mostres presenten una excel·lent integritat. Finalment totes les mostres es guarden a -80 °C fins al moment de la seva utilització.

### 3.4.2. Cultiu cel·lular

El RNA s'aïlla utilitzant *RNeasy mini kit* (Qiagen, Germany) amb les tres línies cel·lulars: *HUVEC*, *HepG2* i *FAO*.

## 3.5. Anàlisi de RT-PCR

### 3.5.1. Retrotranscripció (RT)

La retrotranscripció es fa mitjançant *The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) seguint les instruccions del fabricant, tant a les mostres de teixit com a les mostres de cèl·lules. Aquest kit permet fer una retrotranscripció de RNA total en un volum de reacció de 20 µl. Aquest kit consta de *10x RT Buffer*; *10x RT Random Primers*; *25x dNTP Mix*,

100 mM; MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μl; RNase Inhibitor. Permet fer una retrotranscripció de fins a 2 mg de RNA total per cada 20 μl de reacció. Les condicions del termociclador (Primus 96<sup>PLUS</sup>; AWG AG Biotech) per dur a terme la retrotranscripció amb aquest kit són: 10 minuts a 25°C; 120 minuts a 37°C; 5 segons a 85°C, i finalment a 4°C fins que es tregui del termociclador. El cDNA obtingut s'ha d'emmagatzemar entre -15 i -25°C fins al moment de la seva utilització.

	PAS 1	PAS 2	PAS 3	PAS 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Temps	10 min	120 min	5 seg	∞

**Taula 6.** Programa del termociclador per dur a terme la retrotranscripció amb *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*.

### 3.5.2. PCR quantitativa a temps real

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) és un mètode que ens permet una amplificació logarítmica de fragments de DNA. Es fa una PCR Quantitativa a temps real de 20 ng de cDNA obtingut per cada una de les mostres (Applied Biosystems). S'utilitzen sondes Taqman pels diferents gens d'estudi (Applied Biosystems). La reacció té lloc al termociclador 7300 *Real-time PCR System* d'Applied Biosystems. Per determinar l'expressió relativa de cada un dels gens respecte a un gen de referència s'aplica la fórmula  $2^{-DDCt}$  [116].

Les reaccions de PCR s'han fet sota les següents condicions:

	Incubació		Nº cicles (40 cicles)	
	Activació Amperase®UNG		Desnaturalització	Unió/Extensió
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Temps	2 min	10 min	15 seg	1 min
Volum	25 μl			

**Taula 7.** Programa per dur a terme la PCR Quantitativa a Temps Real amb *TaqMan® Master Mix with Amperase* i sondes Taqman.

### 3.5.3. Taqman® Low Density Array (TLDA)

Les *Taqman® Low Density Array* són unes targetes microfluídiques de 384 pous que permeten realitzar simultàniament 384 reaccions de PCR a temps real. Aquestes targetes permeten treballar de 1 a 8 mostres diferents en paral·lel.

Les targetes *Taqman Low Density Array* (TLDA), s'han dissenyat específicament, i han estat proporcionades per Applied Biosystems. Consten de 96 gens, dos dels quals corresponen a controls endògens. Han estat dissenyades per poder treballar amb diferents línies cel·lulars.

El format escollit de TLDA és el corresponent al 96a, que permet triar 96 gens diferents, 1 dels quals correspon a un control endogen (GAPDH o  $\beta$ -Actina), que ja ve inclòs a la targeta.

Per tal d'analitzar les mostres, es segueix el mateix procediment descrit per fer la retrotranscripció, utilitzant *The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Es recomana carregar un rang de 1 a 100 ng de RNA convertit a cDNA per port. Cada port està constituït per 48 pous, de manera que cada dos ports correspon a una mostra de 96 gens. Com a mínim s'ha de carregar 1 ng de cDNA per pou, però pot passar que alguns gens no es detectin a tan baixa concentració. Segons el Protocol d'Applied Biosystems cada targeta microfluídica podria acceptar fins a 1 mg de cDNA per port. Tenint en compte això, una vegada es disposa del cDNA, es carreguen 300 ng de cDNA per port tant per la línia cel·lular *HepG2* com per la línia cel·lular *HUVEC*. Cada targeta TLDA disposa de 8 ports. En cada un d'ells es carreguen 100  $\mu$ l de la mostra corresponent. Cada mostra ha de contenir 50  $\mu$ l de cDNA a la concentració corresponent i 50  $\mu$ l de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

Una vegada s'han carregat els 100  $\mu$ l, s'ha de centrifugar (Heraeus Multifuge 3LR; Sorvall®/Heraeus custom buckets and adaptors; Applied Biosystems) la targeta microfluídica a 1200 rpm dues vegades durant 1 minut.

Per analitzar la targeta microfluídica, es fa servir l'aparell d'Applied Biosystems 7900HT *Fast Real Time PCR* i el programa ABIPRISM® 7900HT Sequence Detection System software (SDS 2.1 software), a més d'un document de text on estan detallats tots els gens que componen la targeta microfluídica. Aquest software analitza cada una de les targetes de la mateixa manera que la PCR quantitativa a temps real, detallada anteriorment, basant-se en el mètode  $2^{-DDCt}$  [116].

### 3.6. Realització de microarrays i anàlisi de resultats

#### 3.6.1. Microarrays experiment crònic

Els microarrays han estat realitzats i processats a Holanda, al grup del Dr. Jaap Keijer *Human and Animal Physiology Group*, a la Universitat de Wageningen.

Els microarrays corresponen a les mostres de RNA obtingudes dels fetges de rata de l'experiment crònic, on els animals van ser tractats durant 21 dies amb GSPE.

Les mostres de RNA van ser obtingudes com s'ha explicat anteriorment a l'apartat 3.4.1, fent el processat de fetge i el posterior aïllament de RNA amb el kit *Qiagen RNeasy Mini Kit*. Una vegada aïllat, es va quantificar amb l'espectrofotòmetre *Nanodrop* i es va mesurar la seva integritat amb un bioanalitzador Experion, (Bio-Rad), el qual permet veure les bandes de rRNA 28S i 18S. Totes les mostres estaven en bon estat i es va poder iniciar el protocol dels microarrays de Agilent Technologies.

Per analitzar l'expressió gènica diferencial a fetge, s'han utilitzat els microarrays *Rat 4x44k whole genome gene expression microarrays* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) d'acord amb el procediment descrit a [117]. Breument, cada microarray conté 45.018 punts dels quals 41.012 corresponen a sondes úniques que cobreixen tots els gens coneguts del genoma de la rata i els seus transcrits primaris. Per la seva realització es segueix el procediment descrit pel fabricant.

Totes les mostres van ser analitzades individualment utilitzant 1 µg de RNA total, que va ser utilitzat per la síntesi de cDNA mitjançant un kit d'Agilent i seguint les instruccions del fabricant. Cada mostra de cDNA es va dividir en dues alíquotes per la subsegüent amplificació linial de cRNA i marcatge utilitzant *Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit*: una (mostra) va ser marcada amb Cianina 5-CTP (Cy5), i l'altra (referència) va ser marcada amb Cianina 3-CTP (Cy3). Aquests cRNA's marcats amb Cy5 o Cy3 van ser purificats amb *RNeasy mini columns* (Qiagen), obtenint en tots els casos una puresa superior a 825 ng i una activitat específica tant per Cy5 com per Cy3 (pmol Dye/µg cRNA) superior 10. Es va generar un *pool* de referència amb una quantitat equimolar de cada una de les mostres de cRNA marcades amb Cy3. Per la hibridació de les mostres es va preparar un tub per cada una de les mostres que contenia 825 ng del *pool* marcat amb Cy3 i es van afegir a cada tub individualment 825 ng de cada una de les mostres marcades amb Cy5. D'aquesta manera es va obtenir un tub per cada una de les mostres amb la seva corresponent referència. Seguidament es va seguir el protocol d'hibridació i rentat d'Agilent. Els microarrays van ser escanejats amb un escàner d'Agilent, tan a baixa com a alta intensitat, i subsegüentment quantificats utilitzant el programa *Feature Extraction 10.5.1.1* d'Agilent Technologies. A continuació, es va realitzar un control de qualitat utilitzant el programa *LimmaGUI* en R. Tots els arrays van passar aquest control de qualitat i van ser carregats al programa *GeneMaths XT 2.1* (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). La intensitat de cada punt es va normalitzar i corregir per la intensitat del seu *background*, descartant els punts que tinguessin una intensitat mitjana de Cy5 menor de dues vegades la mitjana del *background*. Finalment es va fer un anàlisi estadístic amb el programa *GeneMaths XT 2.1* i posteriorment es van exportar els resultats al programa Microsoft Excel.

Els gens regulats significativament van ser identificats utilitzant un test t de Student ( $p < 0,05$ ) ajustat amb False Discovery Rate (FDR) amb un tall del 5% d'acord amb el procediment de Benjamin-Hochberg.

Per interpretar els canvis d'expressió es va utilitzar el programa de rutes metabòliques MetaCore (GeneGo Inc.) Donat que aquests programes no reconeixen la totalitat dels gens que tenen un canvi d'expressió, es va complementar utilitzant bases de dades i consultant el Pubmed.

### 3.6.2. Microarrays experiment agut i experiment amb cèl·lules *FAO*

Els microarrays han estat realitzats i processats a Barcelona, a la Plataforma de Transcriptòmica del Parc Científic de Barcelona. La part experimental l'ha realitzat la Dra. Lidia Sevilla, responsable de la Plataforma de Transcriptòmica del Parc Científic de Barcelona i l'anàlisi de dades ha estat realitzat pel Dr. Sergi Beltran Agulló, de la Unitat de Bioinformàtica dels Serveis Científicotècnics del Parc Científic de Barcelona.

Els microarrays corresponen a les mostres de RNA obtingudes dels fetges de rata de l'experiment agut, on els animals van ser tractats durant 3h amb GSPE, i a les mostres de RNA obtingudes de les cèl·lules hepàtiques *FAO* tractades amb epicatequina i un trímer de catequina durant 5h a una dosi de 50 mg/l, i un dímer de catequina durant 5h a una dosi de 10 mg/l.

Les mostres de RNA van ser obtingudes com s'ha explicat anteriorment als apartats 3.4.1 i 3.4.2, fent el processat de fetge o cèl·lules i el posterior aïllament de RNA amb el kit *Qiagen RNeasy Mini Kit*. Per analitzar l'expressió gènica diferencial a fetge o cèl·lules, s'han utilitzat els microarrays *Rat 4x44k whole genome gene expression microarrays* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Cada microarray conté 45.018 punts dels quals 41.012 corresponen a sondes úniques que cobreixen tots els gens coneguts del genoma de la rata i els seus transcrits primaris. Es segueix el protocol *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* (Quick Amp Labelling) de Agilent Technologies.

La quantitat, puresa i qualitat del RNA es determina espectrofotomètricament utilitzant un *NanoDrop* i posteriorment amb el *Bioanalyzer 2100 capillar electrophoresis*. Totes les mostres van ser analitzades individualment utilitzant 0,5 µg de RNA total. Aquest RNA total i els *spike-in* van ser marcats amb Cy3 utilitzant el Agilent *One-Color Quick Amp Kit*. Totes les mostres marcades amb fluorocrom van ser hibridades individualment en cada un dels microarrays. Tant la hibridació com els posteriors rentats es van realitzar d'acord amb les recomanacions del fabricant.

Per cada un dels microarrays es van obtenir una sèrie de fitxers de dades GenePix (GPR), utilitzant l'escàner Axon 4000B i el programa GenePix 6 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA). Tots els fitxers van ser analitzats amb el paquet Limma (BioConductor) [118, 119]. Es segueix un protocol de normalització de dades i correcció per un *background* determinat per considerar quins són els gens expressats, similar a l'utilitzat als microarrays realitzats per l'experiment crònic. És lleugerament diferent degut a que en aquest cas les mostres són marcades amb un únic fluorocrom, Cy3. Els gens amb una  $p < 0,05$  i un fold-change superior a 1,5 o inferior a -1,5 es van considerar significativament regulats. Es va realitzar un anàlisi amb GeneOntology tal com està descrit a [120].

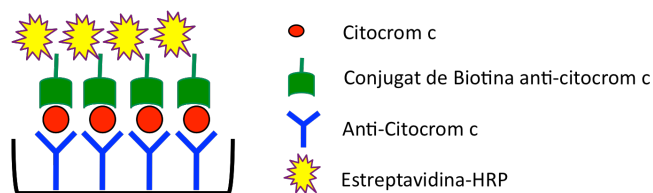
Per interpretar els canvis d'expressió es va utilitzar el programa de rutes metabòliques MetaCore (GeneGo Inc.) Donat que aquests programes no reconeixen la totalitat dels gens que tenen un canvi d'expressió, es va complementar utilitzant bases de dades i consultant el Pubmed.

### 3.7. Determinació de citocrom c a fetge

El kit de citocrom c és d'Invitrogen i es basa en la tècnica de sàndwich ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*). Aquest assaig permet detectar i quantificar el citocrom c present en mostres d'origen humà, de ratolí o de rata tant en lisats cel·lulars com en extractes tissulars.

Als pouets de la placa s'ha fixat un anticòs monoclonal específic per citocrom c. Tant patrons que contenen citocrom c, com mostres o controls es pipetegen directament sobre aquests pouets. Durant la primera incubació, l'antigen de citocrom c s'uneix o és capturat per l'anticòs immobilitzat. Després del primer rentat, un anticòs secundari conjugat amb biotina i específic per citocrom c s'afegeix a cada un dels pous. Durant la segona incubació, aquest anticòs secundari serveix per detectar el citocrom c capturat per l'anticòs primari mitjançant la seva unió. Després d'un segon rentat, s'afegeix Estreptavidina-Peroxidasa a cada un dels pous. Aquest s'uneix a l'anticòs conjugat amb biotina formant el quart membre del sàndwich. Després de la tercera incubació i la eliminació de l'excés d'Estreptavidina-Peroxidasa (enzim), s'afegeix una solució substrat que actua sobre l'enzim que s'ha unit produint una coloració blava, la intensitat de la qual és proporcional a la quantitat de citocrom c present. La reacció s'atura amb una solució Stop que canvia el color de blau a groc. La intensitat d'aquesta coloració groga es mesura a 450 nm. La concentració de citocrom c a les mostres es determina interpolant les lectures d'absorbància amb una recta patró obtinguda d'un estàndard de citocrom c.





Per la determinació de citocrom c s'ha seguit el protocol proporcionat pel fabricant (Cytochrome c Immunoassay kit, KHO1051; Invitrogen, USA).

### Procediment

Preparació de les mostres de fetge: per cada 0,2 g de teixit s'afegeixen 2 mL de **tampó d'homogeneïtzació** fred, que conté sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 i s'afegeix PMSF a concentració final de 1 mM com a inhibidor de proteases. Es segueix el procediment descrit pel fabricant amb alguna modificació. El teixit s'homogeneïtza amb homogeneïtzadors tipus Potter de vidre amb cul cilíndric i amb mandril intern rotatori de teflon. El mandril està acoblat a un motor elèctric giratori de taladradora Bosch. La homogeneïtzació de les mostres es fa en fred. Una vegada obtinguts els homogenats, es centrifuguen 10 min a 1000 g i 4°C. Es descarta el pellet. El sobrenedant obtingut es centrifuga 15 min a 13.000 g a 4°C. El sobrenedant obtingut correspon a la Fracció Citosòlica i el pellet correspon a la Fracció Mitocondrial. Aquest pellet es ressuspèn amb **tampó de ressuspensió** fred, que conté sacarosa 70 mM, manitol 220 mM, HEPES 2 mM i EDTA 1 mM. S'aliquota cada una de les fraccions i es guarden a -80°C fins al moment de la seva anàlisi. Juntament amb la determinació de citocrom c de cada una de les fraccions també es quantificarà la proteïna de cada una d'elles amb el mètode de Bradford.

1. Es porten tots els reactius a temperatura ambient. Abans de la seva utilització es barregen suaument.
2. Es prepara el **Cytochrome c Standard** i les mostres amb **Sample Diluent Buffer**. A les mostres de Fracció citosòlica se'ls ha aplicat una dilució 1/10, i a les mostres de Fracció mitocondrial se'ls ha aplicat una dilució 1/5.
3. S'afegeixen 100 µl tant dels patrons com de les mostres prèviament preparades als pouets de **Cytochrome c Antibody Coated Wells**. Als pouets que faran de blanc no se'ls afegeix res. Es colpeja la placa suaument per barrejar la mostra. Es cobreix la placa amb un film adhesiu.
4. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 2h.
5. Es renten els pouets 4 vegades amb **1x Wash Buffer** que es prepara a partir de **25x Wash Buffer** amb aigua milli-Q.

6. S'afegeixen 100 µl de **Anti-Cytochrome c (Biotin Conjugate)** a cada un dels pouets exepte als blancs. Es colpeja la placa suaument per barrejar la mostra. Es cobreix la placa amb un film adhesiu.
7. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 1h.
8. Es renten els pouets 4 vegades amb **1x Wash Buffer**.
9. S'afegeixen 100 µl de **Streptavidin-HRP Working Solution** a cada un dels pouets excepte als blancs. Es cobreix la placa amb un film adhesiu. **Streptavidin-HRP Working Solution** es prepara amb un concentrat de **Streptavidin-HRP 100x** atemperat a temperatura ambient amb **HRP Diluent**, que serà **Streptavidin-HRP 1x**.
10. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 30 min.
11. Es renten els pouets 4 vegades amb **1x Wash Buffer**.
12. S'afegeixen 100 µl de **Stabilized Chromogen** a cada un dels pouets.
13. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 30 min i a la foscor.
14. S'afegeixen 100 µl de **Stop Solution** a tots els pous.
15. Es mesura l'absorbància a 450 nm.
16. A partir de la recta patró amb les variables absorbància i concentració, es calcula la concentració de citocrom c de totes les mostres.

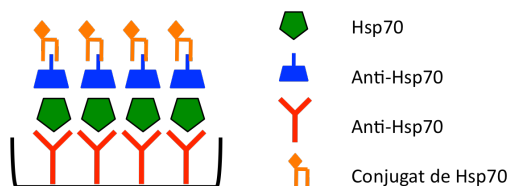
En tots els casos es corregeixen els resultats per la concentració de proteïna de cada una de les mostres.

### 3.8. Determinació de Hsp70 a fetge

El mètode utilitzat ha estat un ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*). Aquest assaig proporciona un mètode per detectar i quantificar la Hsp70 induïble en mostres d'origen humà, de ratolí o de rata i permet una determinació reproduïble, acurada i precisa de Hsp70 induïble tant en lisats cel·lulars com en extractes tissulars.

Aquest assaig ELISA per la Hsp70 es basa en la tècnica de sàndwich. Els pouets de la placa estan recoberts d'un anticòs monoclonal de ratolí específic per la Hsp70 induïble. Aquesta és atrapada per l'anticòs immobilitzat i posteriorment detectada per un anticòs policlonal de conill específic. Aquest anticòs policlonal s'uneix subsegüentment amb l'anticòs anti-IgG de conill conjugat amb peroxidasa de rave picant. L'assaig té lloc amb tetrametilbenzidina (TMB) com a substrat, donant lloc a una coloració blava que és proporcional a la quantitat de Hsp70 capturada. La reacció s'atura amb una solució àcida que canvia el color de blau a groc. La intensitat d'aquesta coloració groga es mesura a 450 nm. La concentració de Hsp70 a les

mostres es quantifica interpolant les lectures d'absorbància amb una recta patró obtinguda d'un estàndard de Hsp70.



Per la determinació de la Hsp70 s'ha seguit el protocol proporcionat pel fabricant (Hsp70 ELISA kit, EKS-700B; Assay Desings Inc, USA).

### Procediment

1. Preparació de les mostres de fetge: per cada 0,5 cm<sup>3</sup> de teixit (aprox. 0,15 – 0,2 g) s'afegeix 1 ml de **1x Extraction Reagent**, que es prepara a partir de **5x Extraction Reagent** amb aigua milli-Q. S'afegeix PMSF a concentració final de 0,1 mM com a inhibidor de proteases. Es segueix el procediment descrit pel fabricant amb alguna modificació. El teixit s'homogeneïtza en el FastPrep FP120, utilitzant *Lysing Matrix D*, MP Biomedicals, USA. Una vegada processat el teixit, es centrifuga 15 min a 20.000g a 4°C, s'aliquota i es guarda la mostra a -80°C fins al moment de la seva anàlisi. Juntament amb la determinació de la Hsp70, també es quantificarà la proteïna total amb el mètode de Bradford.
2. Es porten tots els reactius a temperatura ambient.
3. Es prepara el **Recombinant Hsp70 Standard** i les mostres amb **Sample Diluent 2**. A totes les mostres se'ls ha aplicat una dilució 1/5, que és la dilució mínima que recomana el fabricant perquè la matriu de **1x Extraction Reagent** no interfereixi en l'assaig.
4. S'afegeixen 100 µl tant dels patrons com de les mostres prèviament preparades als pouets del **Anti-Hsp70 Immunoassay Plate**. Es cobreix la placa amb un film adhesiu.
5. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 2h.
6. Es renten els pouets 4 vegades amb **1x Wash Buffer** que es prepara a partir de **20x Wash Buffer** amb aigua milli-Q.
7. S'afegeixen 100 µl de **Hsp70 Antibody** a cada un dels pouets. Es cobreix la placa amb un film adhesiu.
8. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 1h.
9. Es renten els pouets 4 vegades amb **1x Wash Buffer**.

10. S'afegeixen 100 µl de **Hsp70 Conjugate** a cada un dels pouets. Es cobreix la placa amb un film adhesiu.
11. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 1h.
12. Es renten els pouets 4 vegades amb **1x Wash Buffer**.
13. S'afegeixen 100 µl de **TMB substrate** a cada un dels pouets.
14. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 30 min i a la foscor.
15. S'afegeixen 100 µl de **Stop Solution 2** a tots els pous.
16. Es mesura l'absorbància a 450 nm, amb correcció a 570 nm.
17. A partir de la recta patró amb les variables absorbància i concentració, es calcula la concentració de Hsp70 de totes les mostres.

En tots els casos es corregeixen els resultats per la concentració de proteïna de cada una de les mostres.

### 3.9. Determinació de l'activitat caspasa 3 a fetge

L'assaig de caspasa 3 proporcionat per Sigma, és un kit colorimètric basat en la hidròlisi del pèptid acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilina (Ac-DEVD-pNA) per la caspasa 3, del que resulta l'alliberament de p-nitroanilina. (pNA). La p-nitroanilina té un màxima absorbància a 405 nm ( $\epsilon_{mM} = 10.5$ ). La concentració de pNA alliberada es calcula extrapolant els resultats d'absorbància de les mostres amb una recta patró preparada amb un estàndard de pNA.

Per la determinació de la caspasa 3 s'ha seguit el protocol proporcionat pel fabricant (Caspase 3 Assay Kit, colorimètric CASPC3; Sigma-Aldrich, USA).

#### Procediment

1. Preparació de les mostres de fetge: per cada 0,05 g s'afegeixen 400 µl de **1x Lysis Buffer**, que es prepara a partir de **5x Lysis Buffer** amb aigua 17 megohm inclosa al kit. S'afegeix PMSF a concentració final de 1 mM com a inhibidor de proteases. Es segueix el procediment descrit pel fabricant amb alguna modificació. El teixit s'homogeneïtza en el FastPrep FP120, utilitzant *Lysing Matrix D*, MP Biomedicals, USA. Una vegada processat el teixit es centrifuga 15 min a 20.000g a 4°C, s'aliqota i es guarda la mostra a -80°C fins al moment de la seva anàlisi. Juntament amb la determinació de la caspasa 3, també es quantificarà la proteïna total amb el mètode de Bradford.
2. Es porten tots els reactius a temperatura ambient.
3. Es prepara el **pNA Standard** en **1x Assay Buffer**. La concentració màxima és de 200 µM, del que es van fent dilucions seriades 1/2, fins a un total de 6 patrons. Aquest s'ha

preparat a partir de **10x Assay Buffer** amb aigua 17 megohm. Les mostres no requereixen dilució.

4. S'afegeixen 10 µl de cada una de les mostres a cada un dels pouets de placa.
5. S'afegeix la quantitat corresponent de **1x Assay Buffer**.
6. S'afegeixen 10 µl d' **inhibidor 200 µM** als pous corresponents.
7. S'inicia la reacció afegint 10 µl de substrat de caspasa 3 a 2 mM a tots els pous.
8. Es colpeja la placa suaument per barrejar tots els components.
9. Es cobreix la placa amb un film adhesiu. S'incuba durant 6h a 37°C.
10. A temps 0 i a 360 min es mesura l'absorbància a 405 nm.
11. A partir de la recta patró amb les variables absorbància i nmols de pNA, es calculen els nmols de pNA presents a cada un dels pous per calcular posteriorment l'activitat de caspasa 3 de totes les mostres.

	Lisat tissular	Caspasa 3 5 µg/mL	1x Assay Buffer	Inhibidor Caspasa 3 200 µM	Substrat Caspasa 3 2 mM
Blanc	-	-	90 µl	-	10 µl
Mostra	10 µl	-	80 µl	-	10 µl
Mostra + Inhibidor	10 µl	-	70 µl	10 µl	10 µl
Control Positiu	-	5 µl	85 µl	-	10 µl
Control Negatiu	-	5 µl	75 µl	10 µl	10 µl

**Taula 8.** Esquema de la reacció per la determinació de caspasa 3 a realitzar en placa de 96 pouets.

L'activitat de la caspasa 3 correspon als **nmols pNA/min/ml**; on el temps són 360 min (6h) i el volum de mostra són 0,01 ml. Els nmols de pNA es calculen a partir de la recta patró.

En tots els casos es corregeixen els resultats per la concentració de proteïna de cada una de les mostres. De manera que s'obté **nmols pNA/min/mg prot.**

### 3.10. Determinació de la proteïna C reactiva a plasma

El principi d'aquest assaig es basa en un sàndwich ELISA, el qual ens permet detectar la concentració de proteïna C reactiva (CRP) present al plasma dels animals d'estudi. La CRP és una proteïna de fase aguda. Aquestes proteïnes es troben al plasma i la seva concentració augmenta considerablement després d'una infecció, inflamació o trauma. La primera proteïna de fase aguda descoberta en humans va ser la CRP [121]. És sintetitzada pel fetge i els seus nivells al torrent sanguini augmenten ràpidament, de l'ordre de 1000 vegades entre 24 i 48 hores després d'un dany al teixit, però que poden disminuir també molt ràpid una vegada ha

desaparegut l'estímul. S'ha proposat que la funció de CRP pot ajudar en l'activació del complement i que també pot influenciar la funció fagocítica dels macròfags [74].

La CRP present a les mostres reacciona amb els anti-CRP dels anticossos, els quals es troben adherits a la superfície dels pous de la placa. Després de retirar les proteïnes que no s'han unit mitjançant un rentat, els anticossos de anti-CRP es conjuguen amb peroxidasa de rave (HRP). El pas següent és afegir un substrat cromogènic 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), que dona lloc a una coloració blava. La quantitat d'enzim que s'ha unit varia directament amb la concentració de CRP present a la mostra. Un cop s'atura la reacció i es llegeix l'absorbància a 450 nm tant de les mostres com de la recta patró preparada. La concentració de CRP a les mostres es quantifica interpolant les lectures d'absorbància amb una recta patró obtinguda amb un estàndard de CRP.

Per la determinació de la CRP s'ha seguit el protocol proporcionat pel fabricant (Rat CRP ELISA, E-25CRP; Immunology Consultants Laboratory, Inc. USA).

### **Procediment**

1. Es porten tots els reactius a temperatura ambient.
2. Es prepara una recta patró d'acord amb el procediment descrit en el protocol.
3. Es preparen les mostres de plasma aplicant una dilució 1/12.000 amb el diluent present al kit.
4. S'afegeixen 100 µl tant dels patrons com de les mostres prèviament preparades als pouets. Es cobreix la placa amb un film adhesiu.
5. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 10-12 minuts.
6. Passat aquest temps, es renten els pouets 4 vegades amb **1x Wash Solution** que es prepara a partir de **20x Wash Solution Concentrate** amb aigua milli-Q.
7. S'afegeixen 100 µl de **Enzyme-Antibody Conjugate** amb la dilució corresponent a cada un dels pouets. Es cobreix la placa amb un film adhesiu.
8. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 10-12 minuts.
9. Passat aquest temps, es renten els pouets 4 vegades amb **1x Wash Solution**.
10. S'afegeixen 100 µl de **TMB substrate** a cada un dels pouets.
11. S'incuba la placa a temperatura ambient durant 5 min i a la foscor.
12. S'afegeixen 100 µl de **Stop Solution** a tots els pous.
13. Es mesura l'absorbància a 450 nm.
14. A partir de la recta patró amb les variables absorbància i concentració, es calcula la concentració de CRP de totes les mostres.

En tots els casos és corregeixen els resultats per la concentració de proteïna de cada una de les mostres.

### 3.11. Activitats enzimàtiques

#### 3.11.1. Preparació de mostres i homogeneïtzació

Un cop s'han extret les mostres dels teixits, i després de pesar-les, s'homogeneïtzen per tal d'obtenir els homogenats crus, que s'utilitzaran per a la valoració de les activitats enzimàtiques.

No tots els teixits es poden homogeneïtzar directament, ja que la seva consistència ho fa molt difícil. Així, les mostres de fetge, ronyó i cervell, s'homogeneïtzen sense cap mena de dificultat, mentre que per a l'homogeneïtzació de les mostres de teixit muscular, intestí i estómac, fa falta trinxar abans les mostres amb un bisturí per tal de facilitar la seva homogeneïtzació. Un cas a part, són les mostres de pell, que degut a la seva consistència, s'han de tallar, primerament amb unes tisores, fent trossets molt petits, i a continuació trinxar-los amb el bisturí, abans d'homogeneïtzar-los.

#### 3.11.2. Medi d'homogeneïtzació

El medi utilitzat per a fer les homogeneïtzacions consisteix, en essència, en el tampó de Krebs i Ringer, al que se li afegeix: **dextrà**, per augmentar la seva viscositat; **2-mercaptoetanol**, com a protector dels grups sulfhidril; **EDTA-Na<sub>2</sub>**, com a quelador dels ions metàl·lics pesants; **albúmina bovina**, com a protector proteic genèric, i finalment **Triton X-100**, com a detergent disruptor dels orgànuls cel·lulars i subcel·lulars.

El medi d'homogeneïtzació es prepara de nou cada dia, quedant la seva composició final de la següent manera:

Reactiu	Refèrència	Concentració final
Albúmina bovina	Sigma A7888	0,05 %
Triton X-100	Sigma T8787	0,10 %
Dextrà	Sigma D1390	0,10 %
2-Mercaptoetanol	Sigma M6250	2,5 mM
NaCl	Panreac 121659.1211	118,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Panreac 131509.1211	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Carlo Erba 459667	1,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma S6014	24,9 mM
KCl	Scharlau 21209	4,7 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Sigma C3306	2,5 mM
EDTA-Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Carlo Erba 405491	5 mM

Taula 9. Composició del medi d'homogeneïtzació.

Abans de fer servir aquest medi d'homogeneïtzació s'ha d'ajustar el pH a 7,4.

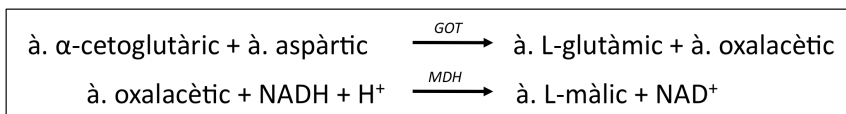
Per homogeneïtzar les mostres s'utilitzen homogeneïtzadors tipus Potter-Elvehjem de vidre i de cul cilíndric de 15 ml de capacitat i amb el mandril intern rotatori de teflon. El mandril està acoblat a un motor elèctric giratori de taladradora Bosch.

L'homogeneïtzació de les mostres es fa de la següent manera: es posa la mostra (1g) dins de l'homogeneïtzador i s'afegeixen 10 ml de medi d'homogeneïtzació fred, i s'homogeneïtza fent moure el recipient extern, de vidre, de l'homogeneïtzador amunt i avall, aplicant successives descompressions mentre el mandril intern gira, per tal d'aconseguir que es trenquin els orgànuls subcel·lulars. En tot moment s'ha de tenir cura que el medi d'homogeneïtzació no s'escalfi, si és necessari, es posa l'homogeneïtzador dins d'un bany aigua-gel. Un cop enllestida l'homogeneïtzació, s'han de filtrar les mostres a través d'una gasa o malla de nylon, de porus petit, per tal d'eliminar els fragments residuals grossos de teixit que puguin taponar les micropipetes. A aquests homogenats filtrats se'ls anomena **homogenats crus**, i són els que s'utilitzen directament per fer les determinacions de les activitats enzimàtiques.

Es poden guardar alíquotes d'aquests homogenats crus en eppendorf de 1,5 ml de capacitat per fer posteriors valoracions de proteïnes.

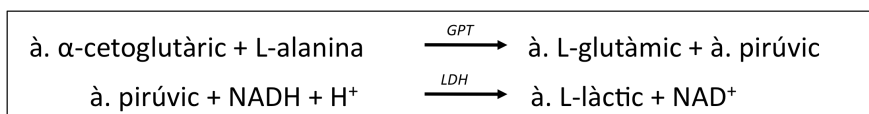
### 3.11.3. Glutamat oxalacetat transaminasa (GOT)

Per la determinació de GOT s'utilitza un kit enzimàtic (QCA, Barcelona, España), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. Es fa una dilució 1/20 a l'homogenat de fetge. Es mesura la disminució d'absorbància de NADH a la reacció.



### 3.11.4. Glutamat piruvat transaminasa (GPT)

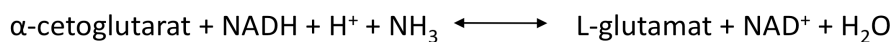
Per la determinació de GPT s'utilitza un kit enzimàtic (QCA, Barcelona, España), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. Es fa una dilució 1/20 a l'homogenat de fetge. Es mesura la disminució d'absorbància de NADH a la reacció.





### 3.11.5. Glutamat deshidrogenasa (GDH)

Aquest mètode consisteix en la mesura espectrofotomètrica dels canvis de concentració de NADH i NAD en condicions adequades, i són proporcionals a l'activitat de l'enzim present a la mostra.



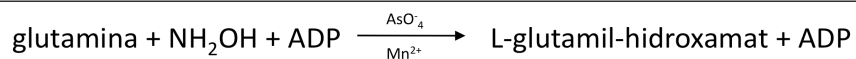
L'oxidació del NADH es segueix espectrofotomètricament a 340 nm i és directament proporcional a l'activitat de l'enzim GDH. Les condicions òptimes de pH 8,0, temperatura 25°C i concentració dels substrats i coenzim corresponen a les descrites per Schmith (1975). Es fa una dilució 1/20 a l'homogenat de fetge.

CUBETA	μl	CONCENTRACIÓ
Tampó TEA/EDTA (100 mM/6mM) pH 8	350	58,4 mM / 3,5 mM
ADP 10 mM	50	0,42 mM
H <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 1M	50	83,33 mM
NADH 6 mM	25	0,25 mM
LDH 220 U/ml	25	5,5 U
Mostra dil 1/20	50	
<b>Agitar per inversió i esperar DO estable</b>		
α-cetoglutarat	50	10 mM
<b>Registrar DO durant 3 min a 340 nm</b>		

**Taula 10.** Esquema de la reacció per la determinació de glutamat deshidrogenasa.

### 3.11.6. Glutamina sintetasa (GS)

La determinació de l'enzim Glutamina sintetasa es basa en la reacció següent:



La GS catalitza la formació de γ-glutamil-hidroxamat a partir d'hidroxilamina i glutamina, en presència d'ADP i de ions arsenat i manganès.

En les condicions de determinació l'equilibri està desplaçat cap a la formació de γ-glutamil-hidroxamat que es pot valorar colorimètricament per la formació de complexos de coloració característica amb les sals fèrriques de màxima absorció del complex fèrric-hidroxamat.

CUBETA	ml	CONCENTRACIÓ
<b>Reactiu de la GS</b>	2,05	
Tampó Tris-HCl 0,56 M pH 7,4		266 mM
Hna <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> 0,14 M		13,3 mM
MnCl <sub>2</sub> 0,14 M		0,6 mM
NaOH 2N		0,13 N
NH <sub>2</sub> OH.HCl 0,2 M		133,3 mM
ADP-Na <sub>2</sub> 3,3 mM		2,22 mM
Glutamina 0,2 M		133,3 mM
<b>Inici reacció</b>		
Mostra	1	
A 0, 10 i 20 min es treuen alíquotes de la mostra d'1 ml, i es posen en tubs que contenen:		
<b>Reactiu fèrric</b>	0,67	
Tricloroacètic 20%		8%
(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Fe.9H <sub>2</sub> O		120 mM
Centrifugar a 1500 rpm durant 30 min, separar els sobrenedants i filtrar les mostres a través d'un cotó-fluix. Llegir a DO 500 nm		
Temperatura d'icubació 37°C		

**Taula 11.** Esquema de la reacció per la determinació de glutamina sintetasa.

Es fa una recta patró per determinar la concentració de  $\gamma$ -glutamil-hidroxamat a les mostres i poder fer posteriorment els càlculs per la determinació de l'activitat GS.

Tubs	1	2	3	4	5
Reactiu GS ( $\mu$ l)	650	650	650	650	650
Medi d'homogeneïtzació ( $\mu$ l)	350	350	350	350	350
Reactiu fèrric ( $\mu$ l)	670	670	670	670	670
Patró $\gamma$ -GH 100 mM ( $\mu$ l)	0	1	2	5	7
nmols $\gamma$ -GH/tub	0	100	200	500	700

**Taula 12.** Composició de la recta patró per la determinació de glutamina sintetasa.

### 3.12. Determinació de paràmetres plasmàtics

#### 3.12.1. Glucosa

La glucosa plasmàtica ha estat mesurada amb un kit enzimàtic colorimètric (QCA, Barcelona, Espanya), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. La intensitat de la coloració rosada que es forma és proporcional a la concentració de glucosa present a la mostra.

### **3.12.2. Triglicèrids**

Els triglicèrids plasmàtics han estat mesurats amb un kit enzimàtic colorimètric (QCA, Barcelona, Espanya), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. La intensitat de la coloració rosada que es forma és proporcional a la concentració de triglicèrids presents a la mostra.

### **3.12.3. Colesterol**

El colesterol total plasmàtic ha estat mesurat amb un kit enzimàtic colorimètric (QCA, Barcelona, Espanya), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. La intensitat de la coloració rosada que es forma és proporcional a la concentració de colesterol present a la mostra.

### **3.12.4. Àcids grassos lliures**

Els àcids grassos lliures plasmàtics han estat mesurats amb un kit enzimàtic colorimètric (Wako Chemicals GmbH, Madrid, Espanya), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. La intensitat de la coloració lila que es forma és proporcional a la concentració d'àcids grassos presents a la mostra.

### **3.12.5. $\beta$ -Hidroxiabutirat**

El  $\beta$ -hidroxiabutirat plasmàtic ha estat mesurat amb un kit enzimàtic (Biotechnica 2000, Madrid, Espanya), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. L'increment d'absorbància de NADH és directament proporcional a la quantitat de  $\beta$ -hidroxiabutirat present a la mostra.

### **3.12.6. Glicerol**

El glicerol plasmàtic ha estat mesurat amb un kit enzimàtic (r-Biopharm, Madrid, Espanya), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. La disminució d'absorbància de NADH és directament proporcional a la quantitat de glicerol present a la mostra.

### **3.12.7. Lactat**

El lactat plasmàtic ha estat mesurat amb un kit enzimàtic (r-Biopharm, Madrid, Espanya), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. L'increment d'absorbància de NADH és directament proporcional a la quantitat de lactat present a la mostra.

### 3.12.8. Urea

La urea plasmàtica ha estat mesurada amb un kit enzimàtic colorimètric (QCA, Barcelona, Espanya), d'acord amb el procediment descrit pel fabricant amb alguna petita modificació per optimitzar el procés. La intensitat de la coloració verda que es forma és proporcional a la concentració de urea a la mostra.

### 3.13. Citotoxicitat

Per determinar la citotoxicitat dels compostos utilitzats als experiments *in vitro* s'utilitza l'assaig *Lactat deshidrogenasa* (LDH) amb un kit enzimàtic (QCA, Barcelona, Espanya).

Aquest assaig es basa en la interconversió de L-Lactat i Piruvat per la Lactat deshidrogenasa, i s'utilitza per evaluar els danys cel·lulars, ja que la LDH és un enzim exclusivament intracel·lular. La disminució de la seva activitat a l'interior de les cèl·lules o la presència al medi indica lisi cel·lular.

Per determinar la citotoxicitat, s'incuben les cèl·lules durant 24h amb cada un dels compostos utilitzats.

#### 3.13.1. Preparació de les mostres

Per determinar l'activitat LDH al medi, aquest s'aspira i es centrifuga a 3000 g, 5 minuts a 4°C, per eliminar possibles restes de cèl·lules o altres residus. El sobrenedant obtingut es guarda a la nevera a 4°C fins al moment de la determinació de LDH. Els pous on estan les cèl·lules es renten una vegada amb PBS 1x atemperat a 37°C. A continuació, s'afegeix solució de lisat freda, que és una solució 25 mM d'HEPES a pH 7.0 i 0.1% de Tritó X-100 (p/v) en aigua. Una vegada s'ha afegit a tots els pous la solució de lisat, la placa s'incuba 20 minuts sobre gel. Transcorregut aquest temps, es recullen les cèl·lules rasant amb la punta de la micropipeta. Aquest procediment s'ha de fer mantenint la placa sobre gel. Les mostres de cèl·lules lisades es guarden a 4°C fins al moment de la determinació de LDH. L'assaig de LDH es farà immediatament després de recollir totes les mostres, tant de medi com de lisat cel·lular.

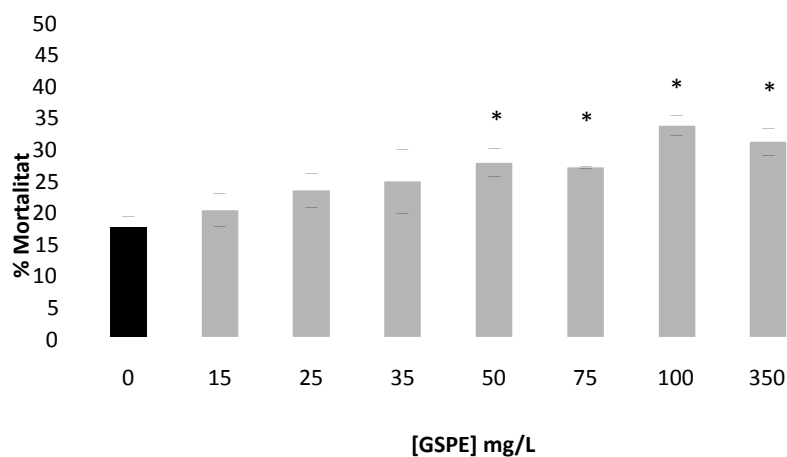
#### 3.13.2. Assaig Lactat deshidrogenasa

S'incuben 100 µl de mostra, medi o lisat de cel·lular (els µl de lisat cel·lular dependran de la línia cel·lular amb la que s'estigui treballant, en el cas de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* o *FAO* amb 10 µl, i en el cas de les cèl·lules endotelials *HUVEC* 100 µl), durant 5 minuts en un bany a 37°C. A continuació s'afegeixen 500 µl de reactiu (Tampó Tris-HCl pH 7.2, 80 mM; piruvat sòdic, 1.6 mM; NaCl, 200 mM; NADH, 0.20 mM), i es llegeix l'absorbància durant 5 minuts a una longitud d'ona de 340 nm en un espectrofotòmetre Hitachi U-2000.

### 3.13.3. Resultats

L'extracte de GSPE no presenta efectes tòxics a baixes concentracions sobre les cèl·lules endotelials *HUVEC* d'acord amb els resultats de mesura de LDH tant al medi com a l'interior de les cèl·lules. Concentracions de 50 mg/l i superiors incrementen la mortalitat cel·lular, arribant a un màxim d'un 35% a les concentracions més elevades que s'han testat. Conseqüentment, la dosi utilitzada serà de 25 mg/l a un temps de tractament de 2h.

D'acord amb els resultats descrits als treballs [80, 85], l'extracte GSPE no presenta efectes citotòxics sobre les cèl·lules hepàtiques *HepG2* i *FAO* a concentracions no superiors a 350 mg/l o 150 mg/l respectivament. D'acord amb aquests resultats, la dosi utilitzada per les cèl·lules *HepG2* serà de 50 mg/l durant 9h, i per les cèl·lules *FAO* serà de 50 mg/l durant 5h.



**Gràfic 1.** Viabilitat de les cèl·lules endotelials *HUVEC* després d'un tractament a diferents dosis de GSPE durant 24 h. Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM. Són el resultat de 3 experiments independents i cada un d'ells per triplicat. L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents comparant el grup tractat respecte al control en tots els casos, \* $p < 0,05$ .

### 3.14. Determinació de la quantitat de proteïna

#### 3.14.1. Fonament

El mètode seguit per determinar la quantitat de proteïna és el descrit per Bradford [122] i es basa en el canvi d'absorbància del colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 de 465 nm a 595 nm quan s'uneix a proteïnes. Produeix una resposta lineal amb la concentració en un ampli rang de proteïna. S'utilitza el reactiu comercial Bio-Rad (Sigma, Madrid, Espanya).

### 3.14.2. Procediment

Es prepara una recta patró d'albumina bovina (Sigma) d'1 mg/ml.

$\mu\text{l}$ patró (1 mg/ml)	$\mu\text{l}$ aigua	Concentració (mg/ml)
50	0	1
40	10	0,8
30	20	0,6
20	30	0,4
10	40	0,2
0	50	0

**Taula 13.** Composició de la recta patró per la determinació de proteïna.

Tant de mostres com de patrons es pipetegen 10  $\mu\text{l}$  en cada pou. A continuació s'afegeixen 250  $\mu\text{l}$  de reactiu Bio-Rad. S'agita suaument i s'incuba 15 min a temperatura ambient. Finalment es llegeix l'absorbància a 595 nm.

### 3.15. Anàlisi estadístic

Per analitzar les dades s'ha utilitzat el programa estadístic SPSS per Windows excepte en el cas de l'anàlisi de microarrays. Aquest permet l'anàlisi de taules de contingència (m files \* n columnes) bidimensionals. S'ha aplicat un test t de Student de variables independents o un anàlisi de la variança (ANOVA) d'un factor segons correspongui en cada cas. En tots els casos s'ha considerat un nivell de confiança del 95% ( $p < 0.05$ ). En els casos on s'ha aplicat ANOVA-1F s'apliquen els test *post hoc* de LSD si les variàncies són iguals i el de Games-Howell si les variàncies són diferents.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

## 4. RESULTATS i DISCUSSIÓ



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

#### 4.1. Resposta a un tractament agut amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm

##### 4.1.1. Transcriptoma hepàtic

En les rates Wistar sanes després del tractament de 3h amb 250 mg/kg de l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm, el transcriptoma hepàtic canvia significativament. Així, de les 41.012 sondes testades, 30.074 tenen una expressió 2 vegades superior al seu valor basal. D'aquestes, 2.891 canvien de forma significativa amb una  $p < 0,05$  després d'aplicar un test t de Student. Hem fet servir el criteri de considerar només aquells gens pels quals el canvi és com a mínim un 50% de sobreexpressió o repressió; és un criteri com hom acostuma a aplicar per tal de garantir la robustesa de les conclusions a les que es pugui arribar. Fent servir aquest criteri s'identifiquen **134 gens** dels que es pot afirmar amb seguretat que la seva expressió està modificada en condicions de tractament agut amb proantocianidines. Detallat a l'Annex 1.

Per tal de comprendre el significat metabòlic dels canvis d'expressió detectats en primer lloc s'han analitzat utilitzant un criteri propi de classificació basat en la informació que per a cada gen dóna la base de dades Gene Ontology i la informació bibliogràfica disponible en les bases de dades del Pubmed, GeneCards o Biocarta, que permet corroborar o comprendre les seves funcions a la cèl·lula. La classificació adoptada estableix els grups de gens indicats a la Figura 6.






















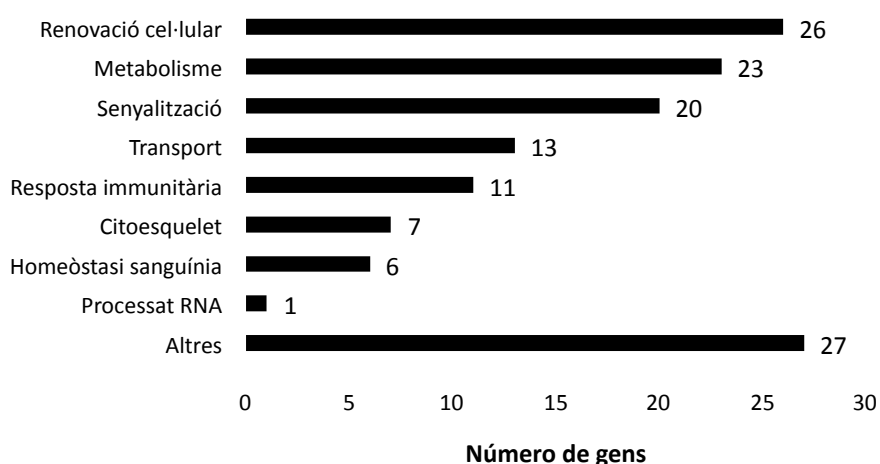
Classificació	Color
<b>Metabolisme</b>	
Metabolisme lipídic	
Metabolisme glucídic	
Metabolisme de xenobiòtics	
Metabolisme proteic	
Metabolisme de nucleòtids	
Metabolisme energètic	
<b>Renovació cel·lular</b>	
Apoptosi/Desenvolupament/Proliferació/Creixement	
Regulació del cicle cel·lular	
Processat DNA	
Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina	
Regulació de la transcripció	
<b>Citoesquelet</b>	
<b>Processat RNA</b>	
mRNA	
tRNA	
rRNA	
Helicases RNA	
<b>Senyalització</b>	
<b>Transport</b>	
<b>Homeòstasi sanguínia</b>	
<b>Resposta immunitària</b>	
<b>Altres</b>	

Figura 6. Classificació pròpia de gens i simbologia emprada.

Adicionalment a l'anàlisi individual dels canvis d'expressió observats s'ha introduït la informació al programa MetaCore, un software àmpliament utilitzat per a processar la informació derivada dels estudis de transcriptòmica i que permet, no només visualitzar els canvis individuals d'expressió, sinó la seva integració en el context de vies metabòliques i els processos cel·lulars. El programa MetaCore utilitza un sistema de classificació basat en els Go-terms i en la classificació de l'anotació del GeneGo. L'anotació GeneGo és una base de dades de xarxes gèniques basada en altres bades de dades com GO o KEGG així com en la literatura científica existent ([www.genego.com](http://www.genego.com)).

Dels 134 gens amb canvis robusts d'expressió, el programa MetaCore en reconeix 54 dins dels seus mapes de vies metabòliques i 124 els identifica com a objectes d'una xarxa que tenen un nexa en comú, el qual no té perquè ser un dels gens modificats significativament. Tant els mapes de vies metabòliques com les xarxes de processos les classifica estadísticament aplicant un test corregit amb *false discovery rate* de  $p < 0,05$  que permet rebutjar processos o objectes amb una significativitat dubtosa, assegurant que els resultats obtinguts no contenen falsos positius. D'altra banda, també dóna informació sobre com estan distribuïdes les dades. De tots els gens carregats, només el 20% es troben reprimits. A més, d'aquests 134 gens, 54 tenen un p-valor inferior o igual a 0,005, el que representa el 40% dels gens carregats.

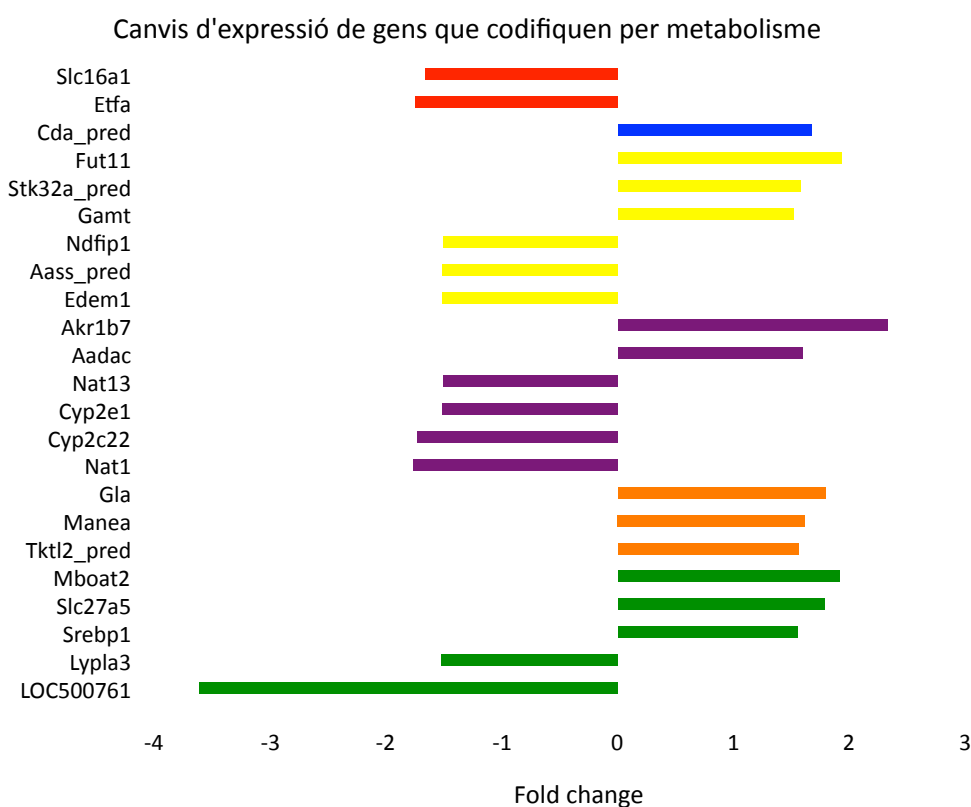
Segons el criteri propi de classificació, els processos cel·lulars que resulten afectats són els indicats a la Figura 7, on s'indiquen per a cada procés el conjunt de gens amb canvis d'expressió.



**Figura 7.** Classificació de gens afectats per un tractament agut de 250 mg GSPE/kg pes corporal, i agrupats en processos biològics segons la classificació pròpia emprada.

Tal com es pot veure a la Figura 7, el procés més afectat és el de renovació cel·lular, en el qual es troben gens involucrats en la proliferació, creixement, diferenciació i apoptosi, així com gens involucrats en el cicle cel·lular. Segueixen en importància els gens implicats en metabolisme, senyalització i transport. El detall dels gens que canvien d'expressió es representa a l'Annex 1. Tot seguit es fa una descripció dels principals canvis observats en els diferents grups.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en el metabolisme es presenten al Gràfic 2, indicant en diferents colors la tipologia de metabolisme a la que pertanyen: metabolisme lipídic (verd), metabolisme glucídic (taronja), metabolisme de xenobiòtics (lila), metabolisme proteic (groc), metabolisme de nucleòtids (blau) i metabolisme energètic (vermell).



**Gràfic 2.** Classificació de gens segons el procés metabòlic en el que estan implicats. ■ Metabolisme lipídic ■ Metabolisme glucídic ■ Metabolisme de xenobiòtics ■ Metabolisme proteic ■ Metabolisme de nucleòtids ■ Metabolisme energètic.

Del Gràfic 2 es desprèn que els principals canvis metabòlics es donen en el metabolisme lipídic, el metabolisme de xenobiòtics i el metabolisme proteic. Dins del metabolisme lipídic, els gens sobreexpressats són el factor de transcripció Srebp1 (*sterol regulatory element-binding protein 1*), implicat en la regulació del metabolisme dels lípids, els transportador d'àcids grassos Slc27a5 (*solute carrier family 27, member 5*), involucrat en l'elongació dels àcids grassos i en la

síntesi de lípids complexos, i l'acetiltransferasa Mboat2 (*membrane bound O-acyltransferase domain containing 2*), involucrada en la via de biosíntesi de fosfolípids. Pel que fa als gens que estan reprimits, cal destacar la forta repressió de LOC500761, que és una seqüència similar a la apolipoproteïna F, amb un *fold-change* de -3,618. L'apoF està relacionada amb el metabolisme del colesterol HDL. També es troba reprimida la lisofosfolipasa 3 (Lypla3), la qual hidrolitza la lisofosfatidilcolina a glicerofosforilcolina i un àcid gras.

Pel que fa al metabolisme dels glúcids, els 3 gens inclosos estan sobreexpressats. Gla (*galactosidase, alpha*) és el que té l'expressió més elevada. Les galactosidases catalitzen la hidròlisi dels galactòsids als corresponents monosacàrids. El següent en ordre d'expressió és Manea (*mannosidase, endo-alpha*). Aquest gen està implicat en el procés de glicosilació de les proteïnes a l'aparell de Golgi. Finalment el gen Tktl2 (*transketolase-like 2 (predicted)*). Les transquetolases són enzims que en els mamífers connecten la via de les pentoses amb la glicòlisi, introduint l'excès de sucres fosfatats en les principals vies metabòliques de carbohidrats.

Dins del metabolisme de xenobiòtics, els gens amb canvis estan majoritàriament reprimits. Hi ha dues N-acetiltransferases: Nat1 (*N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)*) i Nat13 (*N-acetyltransferase 13*). Nat1 s'ha descrit com a enzim que ajuda en el metabolisme de drogues i altres xenobiòtics, i que participa en la destoxificació de grans quantitats de drogues d'hidrazina i arilamina. Els altres dos gens reprimits són Cyp2c70 (*cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 70*) i Cyp2e1 (*cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1*) dos monooxigenases implicades també en el metabolisme de drogues. Només hi ha dos gens sobreexpressats, Aadac (*arylacetamide deacetylase (esterase)*) que competeix amb l'arilamina N-acetiltransferasa citosòlica per la biotransformació d'arilamines i amines heterocícliques, i Akr1b7 (*aldo-keto reductase family 1, member B7*), responsable de la destoxificació d'aldèhids reactius del menjar digerit abans que arribin als diferents òrgans.

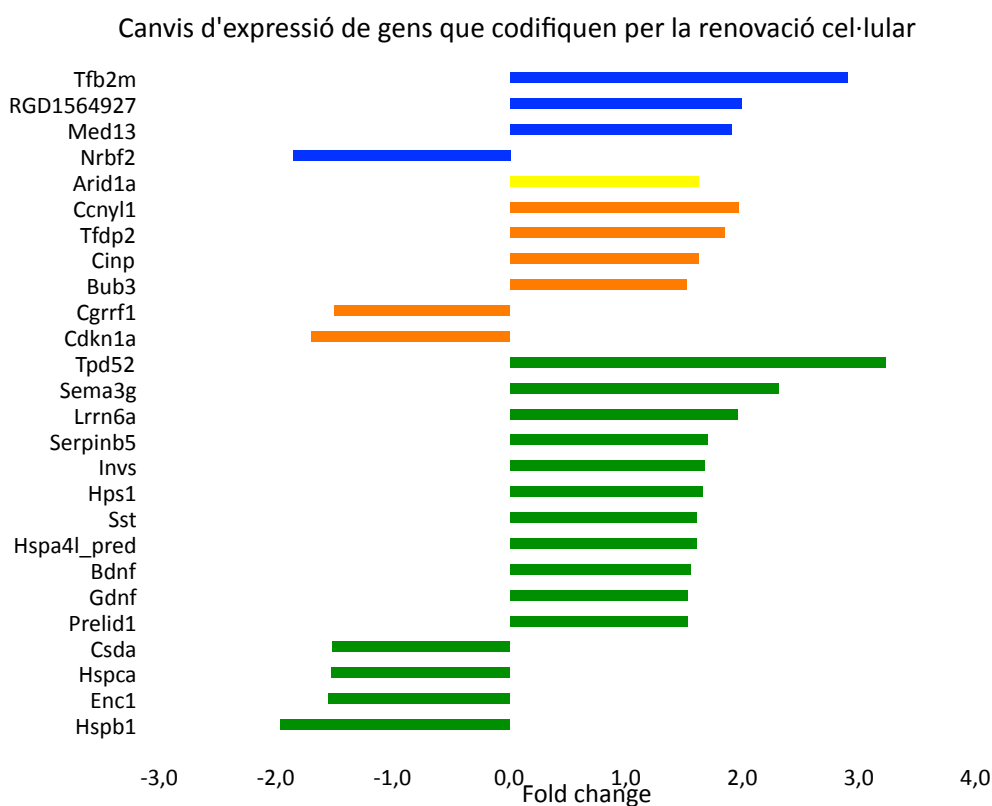
Pel que fa al grup del metabolisme proteic, hi ha 3 gens reprimits amb una repressió molt similar. Aass (*aminoadipate-semialdehyde synthase (predicted)*), que catalitza els dos primers passos en la degradació de la lisina; Ndfip1 (*Nedd4 family interacting protein 1*), implicat en la ubiquitinació; i Edem1 (*ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1*), implicat en la degradació associada a reticle endoplasmàtic (ERAD) de proteïnes amb un plegament erroni. Hi ha 3 gens sobreexpressats, Fut11 (*fucosyltransferase 11*) és el que experimenta una sobreexpressió més forta i està involucrat en la glicosilació de proteïnes. Els altres dos són Stk32a (*serine/threonine kinase 32A (predicted)*) implicat en la fosforilació de proteïnes i Gamt

(*guanidinoacetate methyltransferase*). La proteïna per la qual codifica Gamt, és una metiltransferasa que converteix el guanidoacetat en creatina, la qual constitueix una font immediata i directa per regenerar ATP i proveir d'energia a les cèl·lules musculars.

Dins del metabolisme de nucleòtids només hi ha un gen: Cda (*cytidine deaminase (predicted)*), responsable de mantenir el pool cel·lular de pirimidina.

Pel que fa al metabolisme energètic, hi ha dos gens, tots dos reprimits i amb un nivell d'expressió molt similar. Etfa (*electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide*), que participa en la catalització del primer pas de la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos en la mitocòndria; i Slc16a1 (*solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1*), que catalitza el pas de diferents monocarboxilats, com piruvat i lactat, a través de la membrana plasmàtica.

Els canvis d'expressió en els gens implicats en la renovació cel·lular es presenten al Gràfic 3, indicant en diferents colors la tipologia de metabolisme a la que pertanyen: apoptosi/diferenciació/proliferació/creixement (verd), regulació del cycle cel·lular (taronja), processat de DNA (lila), histones/helicases/remodelació de la cromatina (groc), regulació de la transcripció (blau).



**Gràfic 3.** Classificació de gens involucrats en la renovació del cycle cel·lular. ■ Apoptosi/Desenvolupament/Proliferació/Creixement ■ Regulació del cycle cel·lular ■ Processat DNA ■ Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina ■ Regulació de la transcripció.

Del Gràfic 3 es desprèn que els canvis més importants es troben en el primer grup, el corresponent a l'apoptosi/desenvolupament/proliferació/creixement. En aquest cas es troben 15 gens significativament regulats, els quals majoritàriament es troben sobreexpressats. S'hauria d'agafar aquesta subclassificació i veure detalladament a quin subgrup pertanyen i d'aquesta manera veure quin dels processos inclosos apoptosi/desenvolupament/proliferació/creixement és el que està més alterat.

De tots els gens reprimits dins del grup apoptosi/desenvolupament/proliferació/creixement, cal destacar Hspb1 (*heat shock 27kDa protein 1*). Aquest gen és el que experimenta la repressió més forta. Hi ha diversos estudis que postulen que una sobreexpressió de Hspb1 protegeix la cèl·lula de l'apoptosi induïda per diferents estímuls com la hipertermia, l'estrès oxidatiu o l'exposició a drogues citotòxiques. Amb el mateix ordre de repressió hi ha Enc1 (*ectodermal-neural cortex 1*), implicat en la regulació de processos de formació i diferenciació de les cèl·lules neuronals; Hspca (*heat shock protein 1, alpha*), implicada també en l'apoptosi; i CsdA (*cold shock domain protein A*) que podria estar implicat en la proliferació cel·lular. Pel que fa als que es troben sobreexpressats, Tpd52 (*tumor protein D52*) és el que té la sobreexpressió més elevada, podria estar implicat en la progressió de diferents tipus de tumors entre ells de prostata i mama. Sema3g (*sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G*) és el que segueix en ordre de sobreexpressió. Les semaforines són una classe de proteïnes que ajuden al creixement dels axons. A continuació hi ha Lrrn6a (*leucine rich repeat neuronal 6a*), que pot desenvolupar un paper decisiu en la reparació i regeneració del sistema nerviós. Els altres gens tenen una sobreexpressió molt similar, tots ells superior al 50%. En ordre serien Serpinb5 (*serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5*), relacionat amb la supressió de tumors; Invs (*inversin*), implicat en el desenvolupament i funció dels túbuls renals; Hps1 (*Hermansky-Pudlak syndrome 1 homolog (human)*), gen que codifica per una proteïna que juga un paper important en la biogènesi dels orgànuls associats amb els melanosomes o lisosomes; Sst (*somatostatin*) que inhibeix l'alliberament de somatotropina (hormona del creixement); Hspa4l (*heat shock 70kDa protein 4-like (predicted)*) que respon a diferents tipus d'estrès; dos factors neurotròfics: Bdnf (*brain derived neurotrophic factor*) i Gdnf (*glial cell line derived neurotrophic factor*); i finalment Prelid1 (*PRELI domain containing 1*), important pel desenvolupament d'òrgans vitals i immunocompetents.

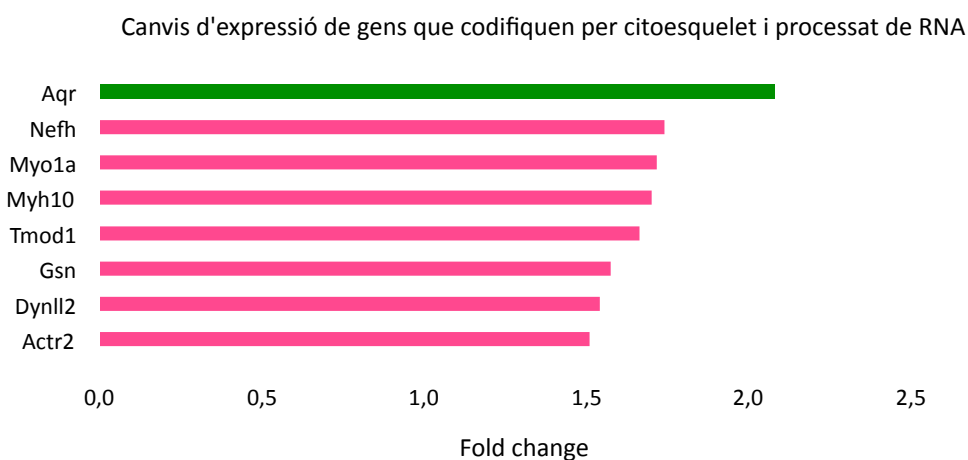
Dins del grup de la regulació del cicle cel·lular, hi ha 6 gens, majoritàriament sobreexpressats. Es troben reprimits Cdkn1a (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1a*), que funciona com a regulador de la progressió del cicle cel·lular a la fase G1, i Cgrrf1 (*cell growth regulator with*

*ring finger domain 1*) que pot estar implicat en la inhibició del creixement de diferents tipus cel·lulars. Pel que fa als gens que es troben sobreexpressats, el d'expressió més elevada és *Ccnyl1 (cyclin Y-like 1)*. Les ciclines són una família de proteïnes involucrades en la regulació del cicle cel·lular. *Tfdp2 (transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2))* està implicat en el control de la progressió del cicle cel·lular de la fase G1 a la S. *Cinp (cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (predicted))*, implicat en el procés de replicació. Finalment, *Bub3 (budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (S. cerevisiae))*, amb la sobreexpressió menys destacada.

Pel que fa al següent grup, trobem *Arid1a (AT rich interactive domain 1A (SWI-like))* que es troba sobreexpressat. Forma part d'un complex de remodelació de la cromatina requerit per l'activació de la transcripció de gens normalment reprimits per la cromatina.

A l'últim grup, implicat en la regulació de la transcripció, només hi ha un gen reprimat: *Nrbf2 (nuclear receptor binding factor 2)* que pot modular l'activació transcripcional via receptors nuclears. Pel que fa als que estan sobreexpressats, el que experimenta una sobreexpressió més elevada de gairebé 3 vegades el control és *Tfb2m (transcription factor B2, mitochondrial)* que activa la transcripció del DNA mitocondrial. Els altres dos són *Med13 (mediator complex subunit 13)* i *RGD1564927 (similar to TGFB-induced factor 2)*.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en el manteniment del citoesquelet i el processat de RNA es presenten al Gràfic 4, indicant en diferents colors la tipologia de la classificació a la que pertanyen: citoesquelet (rosa), mRNA (verd), tRNA (taronja), rRNA (lila) i helicases de RNA (groc).



**Gràfic 4.** Classificació de gens involucrats en el manteniment del citoesquelet i el processat del RNA. ■ Citoesquelet ■ mRNA.

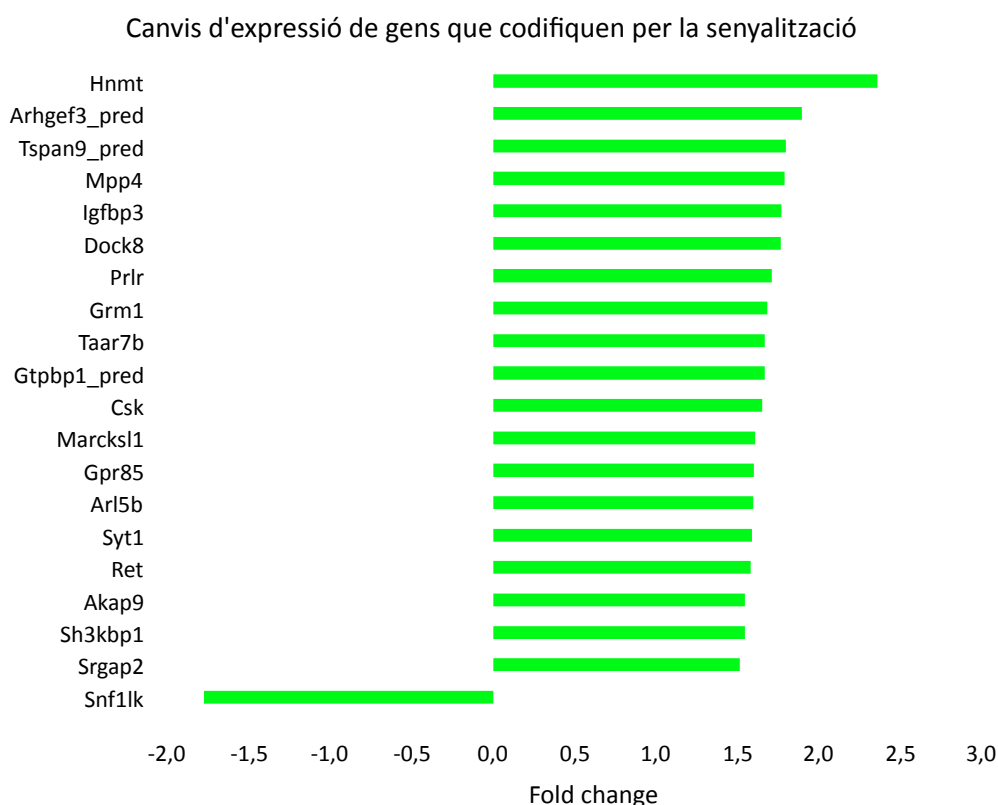


Del Gràfic 4 es desprèn que els principals canvis es troben en el manteniment del citoesquelet mentre que el processat de RNA no està pràcticament afectat.

Dins de la subclassificació de processat de RNA només es troba un gen, *Aqr (aquarius homolog (mouse))*, gen que codifica per una proteïna present al spliceosoma i que es requereix per la eliminació dels introns.

Pel que fa als gens implicats en el manteniment del citoesquelet, tots ells es troben sobreexpressats. En ordre descendent d'expressió, trobem *Nefh (neurofilament, heavy polypeptide)*. Els neurofilaments es troben en grans concentracions als teixits neuronals, principalment als axons de les neurones. La seva funció és donar rigidesa al citoesquelet dels axons. A continuació hi ha dos gens de miosina: *Myo1a (myosin IA)* i *Myo10 (myosin, heavy chain 10, non-muscle)*. Estan implicats en el moviment dels orgànuls pels filaments d'actina. Pel que fa a la organització dels filaments d'actina hi ha *Tmod1 (tropomodulin 1)*, el qual s'uneix preferencialment a la tropomiosina. *Gsn (gelsolin)* és una proteïna clau en l'ensamblatge i desensamblatge dels filaments d'actina. *Dynll2 (dynein light chain LC8-type 2)*, implicada en el transport intracel·lular relacionat amb la dineïna. La dineïna és una proteïna motriu i és la proteïna més important dels microtúbuls. Finalment, *Actr2 (ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast))*, involucrat en la regulació de la polimerització d'actina per la formació de les xarxes d'actina.

Els canvis d'expressió en els gens implicats en la senyalització es presenten al Gràfic 5. És un grup bastant heterogeni ja que inclou diferents tipus de senyalització. Principalment inclou quinases, implicades en la fosforilació/desfosforilació, encara que també es poden trobar gens implicats en la transmissió de senyals per mitjà de la sinapsi.

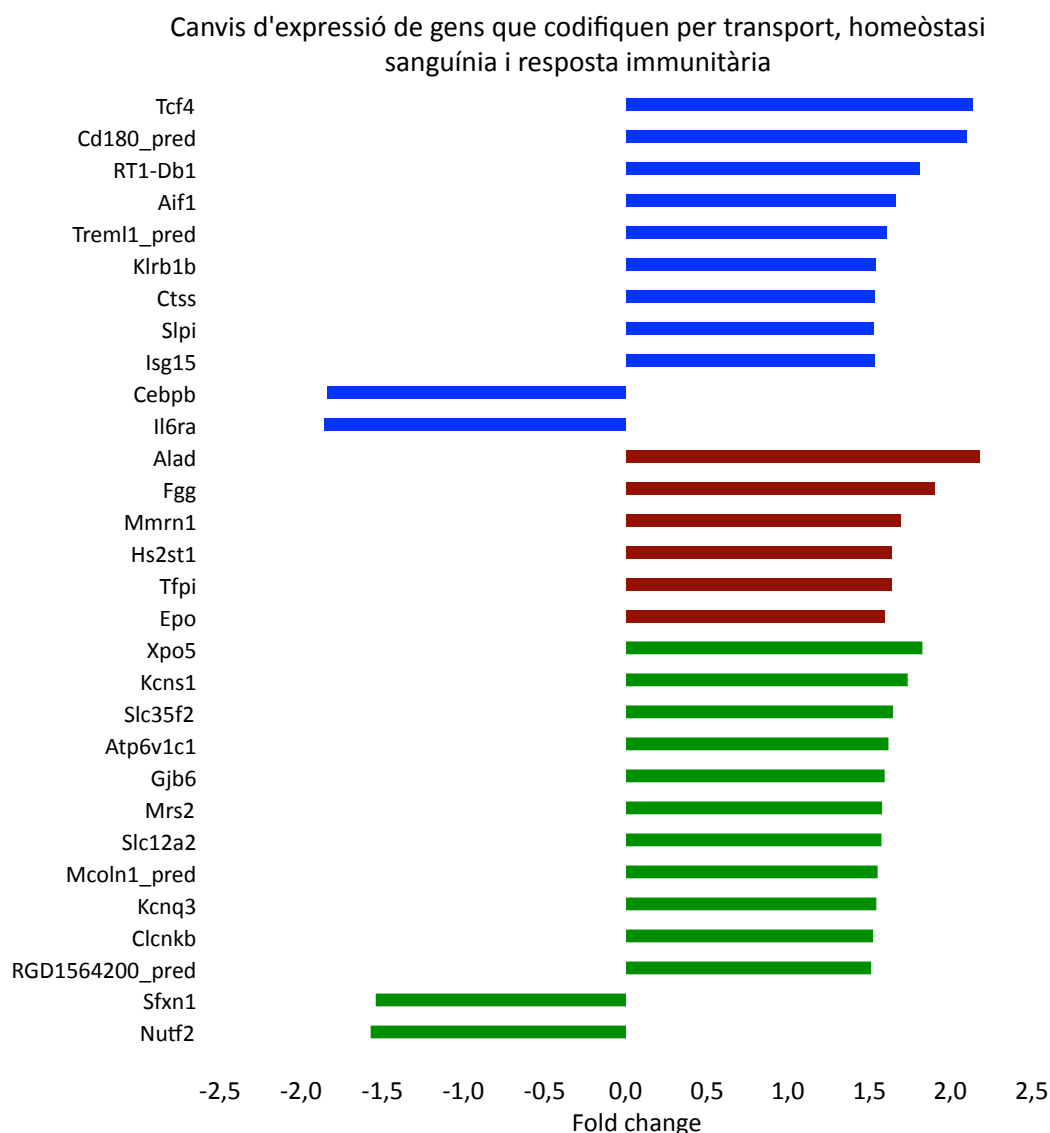


**Gràfic 5.** Classificació de gens involucrats en diferents processos de senyalització. ■ Senyalització.

Del Gràfic 5 es desprèn que hi ha una sobreexpressió generalitzada. Només hi ha un gen reprimit, *Snf1lk* (*SNF1-like kinase*), el qual actua com a sensor de  $[Na^+]_i$ , transformant aquest event en una cascada de senyalització. Amb la sobreexpressió més forta hi ha *Hnmt* (*histamine N-methyltransferase*), aquest actua metabolitzant la histamina la qual té activitat com a neurotransmissor. Hi ha diversos gens relacionats d'alguna manera amb les proteïnes G, que són una família de proteïnes transductores de senyals des d'un receptor fins a una o més proteïnes efectores. Aquests són *Arhgef3* (*Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3 (predicted)*); *Dock8* (*dedicator of cytokinesis 8*) que interacciona amb les GTPases Rho; *Grm1* (*glutamate receptor, metabotropic 1*), forma part de la família dels receptors acoblats a proteïnes G. El glutamat és un dels principals neurotransmissors del sistema nerviós central; *Gtpbp1* (*GTP binding protein 1 (predicted)*); *Gpr85* (*G protein-coupled receptor 85*); *Arl5b* (*ADP-ribosylation factor-like 5B*), que forma part de la superfamília de RAS de les GTPases reguladores i *Srgap2* (*SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2*). Altres gens dins de la categoria de senyalització són *Tspan9* (*tetraspanin 9 (predicted)*), implicat en la mediació de transducció de senyals per la regulació del desenvolupament, activació, creixement i motilitat cel·lular; *Mpp4* (*membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4)*), es creu que la proteïna per la que codifica funciona com a fotorreceptor; *Igfbp3* (*insulin-like*

*growth factor binding protein 3*), pertany a la família de les proteïnes d'unió al factor de creixement insulínic (IGFBP); Prlr (*prolactin receptor*), quan la prolactina s'uneix al seu receptor, l'activa i desencadena l'activació de les MAP quinases. La prolactina és una hormona que estimula la producció de llet per les glàndules mamàries i la síntesi de progeterona al cos luti. Els altres gens dins d'aquesta classificació tenen una sobreexpressió similiar, en ordre decreixent són: Taar7b (*trace-amine-associated receptor 7b*); Csk (*c-src tyrosine kinase*); Marcks1 (*MARCKS-like 1*), implicat en l'acoblament del sistema de senyalització proteïna quinasa c i calmodulina; Syt1 (*synaptotagmin 1*) que participa en l'alliberament de neurotransmissors durant la sinapsi; Ret (*ret proto-oncogene*), forma part de la família de les cadherines i està implicat en la transducció de senyals per la diferenciació i creixement cel·lular; Akap9 (*A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9*) i Sh3kbp1 (*SH3-domain kinase binding protein 1*) que és una proteïna adaptadora implicada en diferents vies de transducció de senyals.

Els canvis d'expressió que es presenten al Gràfic 6 engloben el transport (verd), la homeòstasi sanguínia (grana) i la resposta immunitària (blau).



**Gràfic 6.** Classificació de gens involucrats en el transport cel·lular, gens involucrats en la homeòstasi sanguínia i gens involucrats en la resposta immunitària. ■ Transport ■ Homeòstasi sanguínia ■ Resposta immunitària.

Del Gràfic 6 es desprèn que el procés més altament regulat és el de transport. En aquest apartat s'han inclòs gens que estan implicats d'una manera o d'un altre en algun tipus de transport, com per exemple transport de ions, transport de metalls, transport de metabòlits, així com el transport intracel·lular de proteïnes o la secreció de vacúols.

Pràcticament la totalitat dels gens inclosos en aquesta cinquena subclassificació a excepció de 2 gens es troben sobreexpressats. Els dos gens reprimits són *Nutf2* (*nuclear transport factor 2*), que facilita el transport de proteïnes a l'interior del nucli i *Sfxn1* (*sideroflexin 1*), es creu que pot estar implicat en el transport d'algun component per la utilització de ferro a la mitocòndria. Pel que fa als gens que estan sobreexpressats *Xpo5* (*exportin 5*) és el que té una expressió més elevada, pertany a la família de les carioferines, un grup de proteïnes

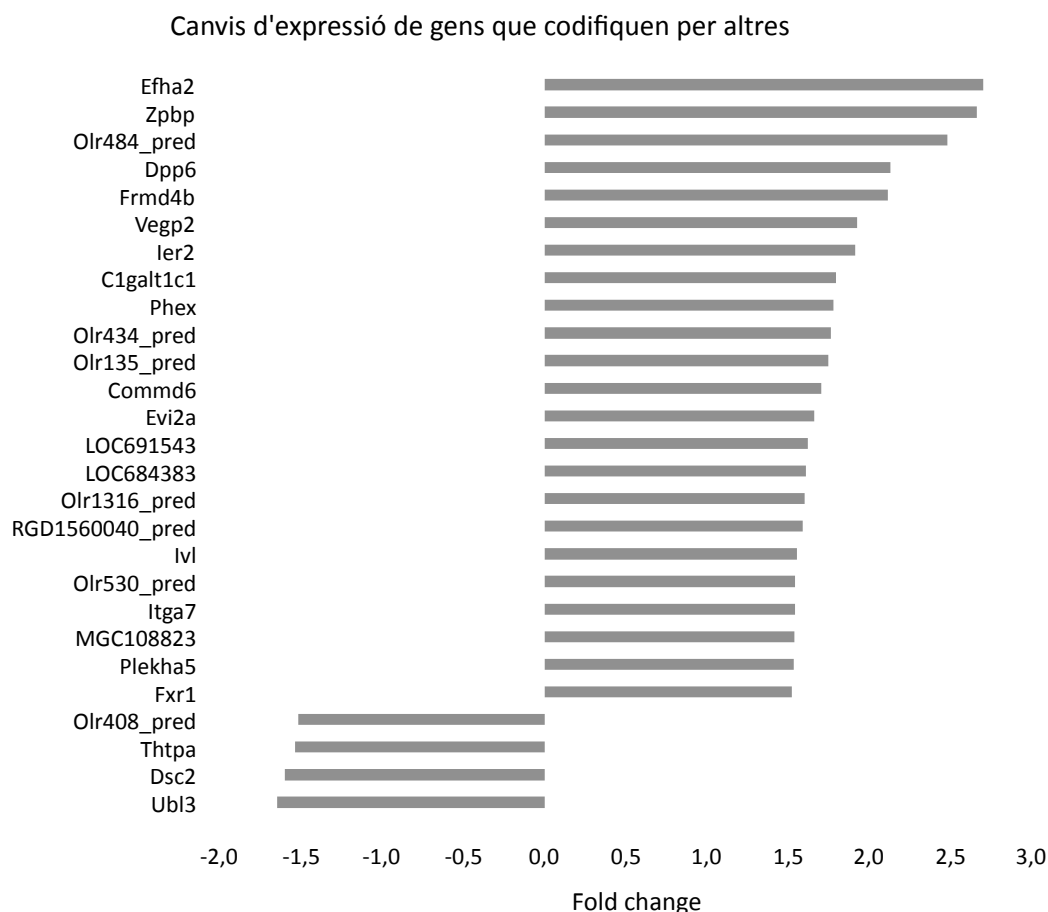
involucrades en el transport de molècules a través dels porus de l'embolcall nuclear. Hi ha diferents canals de voltatge com *Kcns1* (*K<sup>+</sup> voltage-gated channel, subfamily S, 1*); *Kcnq3* (*potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 3*) i *Clcnkb* (*chloride channel Kb*). En ordre decreixent d'expressió hi ha *Slc35f2* (*solute carrier family 35, member F2*); *Atp6v1c1* (*ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit C1*), implicat en el transport intracel·lular; *Gjb6* (*gap junction membrane channel protein beta 6*), les unions Gap permeten el transport de ions i metabòlits entre el citoplasma de cèl·lules adjacents; *Mrs2* (*MRS2 magnesium homeostasis factor homolog (S. cerevisiae)*), un transportador de magnesi que regula l'influx de magnesi a la matriu mitocondrial; *Slc12a2* (*solute carrier family 12, member 2*), és un cotransportador de sodi, potassi i clor; *Mcoln1* (*muco lipin 1 (predicted)*), implicat en la regulació de l'exocitosi als lisosomes, i finalment *RGD1564200* (*similar to hypothetical protein MGC34646 (predicted)*) que es requereix per una adequada morfologia dels endosomes i dels lisosomes.

Dins del grup d'homeòstasi sanguínia, tots els gens estan sobreexpressats. *Alad* (*aminolevulinate, delta-, dehydratase*), el d'expressió més elevada, catalitza el segon pas en la via biosintètica de la porfirina i el grup hemo. El següent és *Fgg* (*fibrinogen, gamma polypeptide*), codifica per una de les cadenes de fibrinogen, implicat en la formació del coàgul sanguini. *Mmrn1* (*multimerin 1*) és una proteïna soluble que es troba a les plaquetes i a l'endoteli dels vasos sanguinis, a les plaquetes és l'encarregada d'emmagatzemar el factor V. Els 3 últims gens tenen una sobreexpressió similar, són: *Hs2st1* (*heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1*); *Epo* (*erythropoietin*), encarregada de regular la producció de glòbuls vermells i per últim *Tfpi* (*tissue factor pathway inhibitor*), el qual regula el factor tissular depenent de la via de coagulació sanguínia.

L'últim grup d'aquesta classificació pertany a la resposta immunitària. S'observa una sobreexpressió generalitzada, només hi ha dos gens reprimits, que són *Il6ra* (*interleukin 6 receptor, alpha*), una de les subunitats del receptor d'interleuquina 6 (IL-6) molt important en la resposta inflamatòria; i *Cebpb* (*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta*) que és un factor de transcripció que juga un paper important en la regulació de gens implicats en la resposta immunitària i inflamatòria. Pel que fa als gens que es troben sobreexpressats, destacar el dos gens amb una sobreexpressió de més del doble respecte al control. Aquests són *Tcf4* (*transcription factor 4*), expressat majoritàriament a les cèl·lules pre-B; i *Cd180* (*CD180 antigen (predicted)*) implicat en la resposta immunitària innata. En ordre decreixent d'expressió hi ha *Rt1-Db1* (*RT1 class II, locus Db1*); *Aif1* (*allograft inflammatory factor 1*), aquest juga un paper en la inflamació vascular; *Trem11* (*similar to triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1 (predicted)*), implicat tant en la resposta immunitària innata com

adaptativa; *Klr1b* (*killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1B*), involucrat en la regulació de la funció de les cèl·lules NK (*natural killer*); *Ctss* (*cathepsin S*), que participa en la degradació de proteïnes antigèniques a pèptids per la presentació en molècules MCH classe II; *Slpi* (*secretory leukocyte peptidase inhibitor*), el seu efecte inhibidor protegeix les cèl·lules epitelials d'enzims endògens proteolítics; i finalment *Isg15* (*interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K) (predicted)*), implicat en la resposta innata.

La última subclassificació, mostrada al Gràfic 7, són els gens que no han estat associats a cap de les anteriors subclassificacions degut a que encara no es coneix la funció que desenvolupa cada un d'ell dins la cèl·lula. Tots ells colorejats en gris.



**Gràfic 7.** Classificació de gens que no han estat associats a cap de les classificacions anteriors. ■ Altres.

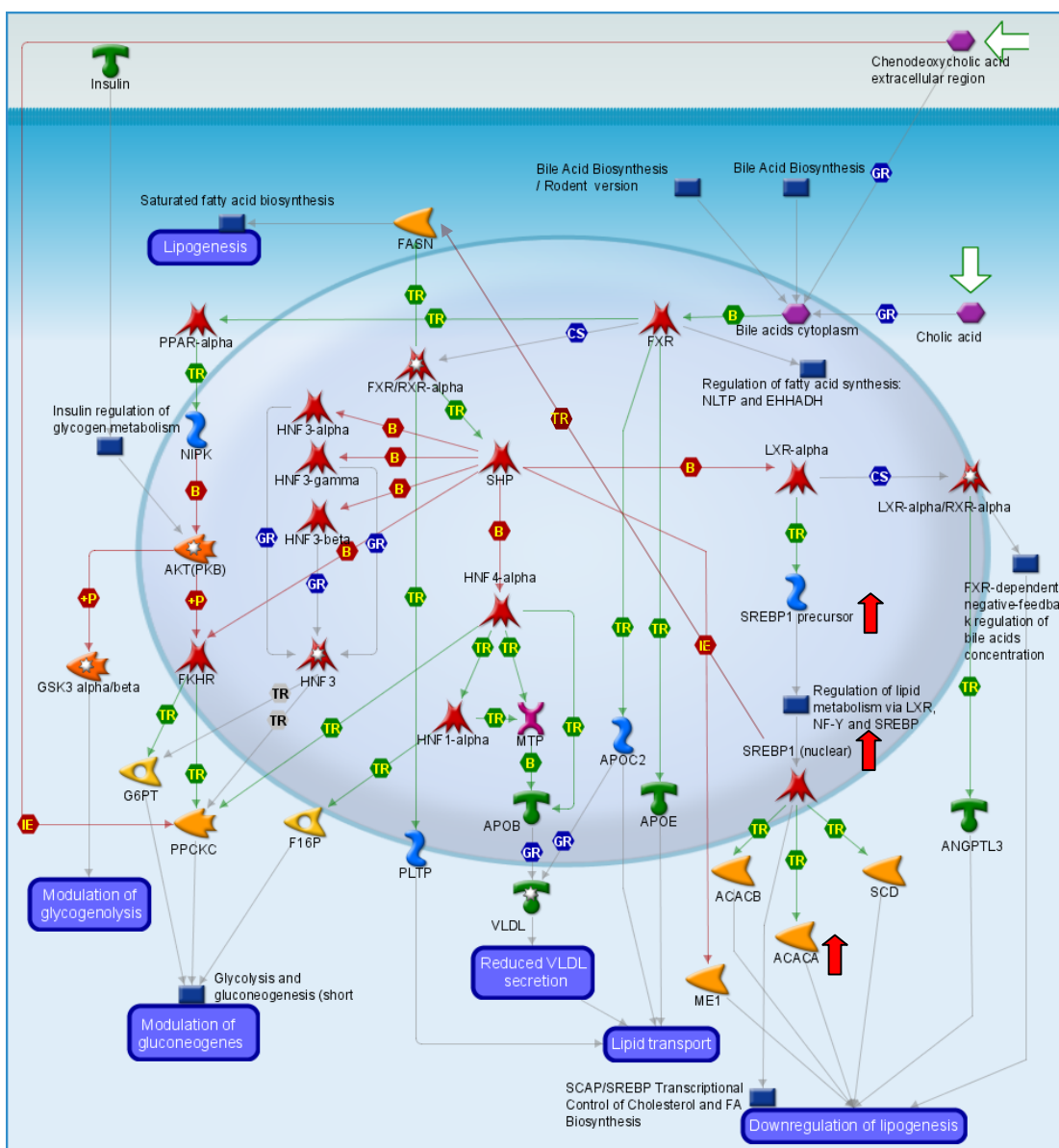
Per tal d'integrar la informació dels canvis d'expressió que s'han descrit fins ara, com ja s'ha dit, s'ha fet servir el programa MetaCore. Com a resultats ens indica en primer lloc que les 10 vies metabòliques i els 10 processos cel·lulars més afectats pel tractament agut són els indicats a la Taula 14. Els símbols que apareixen a les figures del MetaCore estan detallats a l'Annex 3.

Vies metabòliques	Processos cel·lulars
Regulation of lipid metabolism_Regulation of fatty acid synthase activity in hepatocytes	Protein folding_Response to unfolded proteins
Development_MAG-dependent inhibition of neurite outgrowth	Proliferation_Negative regulation of cell proliferation
Regulation of lipid metabolism_Regulation of lipid metabolism via LXR, NF-Y and SREBP	Signal transduction_ESR1-nuclear pathway
CFTR folding and maturation (norm and CF)	Cytoskeleton_Actin filaments
Thiamine metabolism	Signal transduction_Androgen receptor nuclear signaling
Development_Role of IL-8 in angiogenesis	Signal transduction_Leptin signalig
Development_Glucocorticoid receptor signaling	Inflammation_IL-6 signaling
Development_SSTR1 in regulation of cell proliferation and migration	Immune_Antigen presentation
Immune response_IL-6 signaling pathway	Neurophysiological process_Adrenergic and melatonin receptors participation
Transcription_Ligand-dependent activation of the ESR1/SP pathway	Reproduction_Feeding and Neurohormones signaling

**Taula 14.** Vies metabòliques i processos cel·lulars més afectats pel tractament agut de 250 mg GSPE/kg pes corporal

Pel que fa a les vies metabòliques, interpretant els resultats del MetaCore, hom pot concloure que les vies més afectades són les que tenen relació amb el metabolisme dels lípids. En la Figura 8, obtinguda també amb el programa MetaCore, es visualitzen els principals canvis en el metabolisme dels lípids. En aquesta figura s'observa la sobreexpressió de SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) i ACACA (*acetyl-CoA carboxylase alpha*). SREBP1 és un factor de transcripció de la família SREBPs que controla la homeòstasi lipídica, un dels principals reguladors de la biogènesi de triglicèrids i colesterol. Quan es troba inactiu, està associat a les membranes del reticle endoplasmàtic i del nucli. Uns nivells baixos d'esterols provoquen l'alliberament proteolític d'aquest factor de transcripció i la seva mobilització des del citoplasma al nucli.

Al nucli, SREBP1 s'uneix a seqüències específiques del DNA (SREs) trobades a regions controladores de gens que codifiquen per enzims que es necessiten per la síntesi de lípids. Aquesta unió al DNA porta a l'increment de la transcripció d'aquests gens [123]. Una vegada s'han recuperat els nivells òptims d'esterols, aquest procés s'atura inactivant SREBPs.



**Figura 8.** Canvis en el metabolisme dels lípids segons el programa MetaCore en rates tractades amb dosi aguda de proantocianidines.

Pel que fa al metabolisme dels lípids, els canvis d'expressió ens indiquen que les proantocianidines podrien induir una situació d'increment de la lipogènesi. La Taula 16 mostra com les rates que han estat tractades amb GSPE tenen uns nivells de triglicèrids inferiors a les rates que no han rebut tractament al llarg del temps, mentre que el colesterol es manté inalterat. Resultats previs del grup de recerca, coincidents amb la major part de la informació bibliogràfica [49], indiquen clarament que el tractament agut de proantocianidines produeix una situació de repressió de la lipogènesi que es tradueix en uns menors nivells de triglicèrids circulants, tal com passa amb els animals tractats en el present estudi en resultats que es mostren a l'apartat marcadors plasmàtics. Per una banda, els resultats d'expressió gènica indicarien un augment de la lipogènesi, fet que no es veu reflectit en els nivells de lípids



circulants. Cal remarcar que les rates han estat sota un dejuni de 14h i en aquest punt totes han rebut una càrrega oral lipídica. Aquest fet podria explicar la necessitat d'activar la lipogènesi mitjançant l'activació del factor de transcripció SREBP1, encarregat de mantenir la homeòstasi lipídica. Hi ha diferents treballs en ratolins que mostren una sobreexpressió de SREBP1a i SREBP1c, fet que incrementa la síntesi de triglicèrids a fetge [124-129].

Dins d'aquest mapa, és interessant destacar com el receptor nuclear FXR (*farnesoid X receptor*) pot modular processos lipogènics [130] via el factor nuclear orfe SHP (*small heterodimer partner*), que a la seva vegada previndria que LXRA (*liver X receptor alpha*) activés la transcripció de SREBP1. Una vegada activat, SREBP1 modula diferents gens del programa de síntesi de triglicèrids com FASN (*fatty acid synthase*), ACACA (*acetyl-CoA carboxylase alpha*), ACACB (*acetyl-CoA carboxylase beta*), SCD (*stearoyl-CoA desaturase*) entre altres [131].

Els autors que han revisat els canvis d'expressió en tractaments aguts suggereixen que el conjunt de canvis poden explicar-se per la interacció de les proantocianidines amb FXR [51] un receptor nuclear sensible a àcids biliars com l'àcid còlic o l'àcid quenodeoxicòlic, i que podria regular el conjunt del metabolisme dels lípids. En el present estudi no es detecta una variació significativa en l'expressió de FXR. No obstant si es produeix una sobreexpressió de SREBP1 com s'ha comentat anteriorment. És cert que els canvis de l'actual estudi no són, en general, els mateixos que els obtinguts per altres autors, tot i que les conseqüències dels canvis, des de la perspectiva de la regulació del metabolisme, són coincidents: les proantocianidines modulen la lipogènesi, reprimint els nivells de triglicèrids circulants.

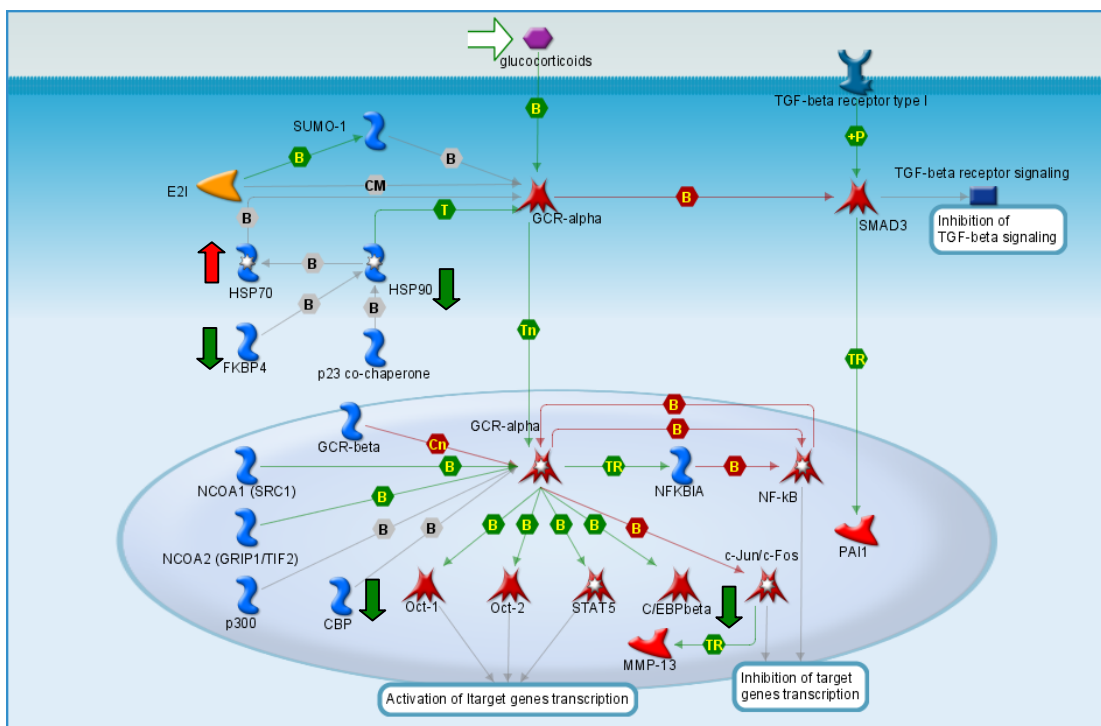
Les condicions experimentals són determinants a l'hora de detectar canvis d'expressió, especialment el temps d'estudi després del tractament. En el present estudi el temps de tractament són 3 hores, altres autors fan el tractament durant 5h [52] la qual cosa pot explicar la diferència en els canvis observats.

El que és important a destacar és el rol que exerceixen les proantocianidines. Quan són proantocianidines de pinyol de raïm, sempre indueixen una repressió de la lipogènesi, tot i que segons el moment d'estudi es detectin uns canvis o altres que no són més que el reflex del moment en que s'obté la informació de la seqüència d'esdeveniments que tenen lloc a la cèl·lula.

Altres processos destacats pel programa MetaCore són diferents vies de senyalització. La Figura 9 mostra la via de senyalització depenent de glucocorticoides. En ells s'observa la repressió de HSP90 (*heat shock protein 90*), CBP (*CREB binding protein*) i C/EBPbeta

(CCAAT/enhancer binding protein beta), conjuntament amb la sobreexpressió de HSP70 (*heat shock protein 70*).

Els glucocorticoides contribueixen tant al manteniment de l'homeòstasi basal com en un estat d'estrès. Les seves funcions principals són mantenir la glucèmia i evitar la hipotensió arterial, així com modular la resposta immune i inflamatòria, i els mecanismes d'adaptació a l'estrès [132]. Els glucocorticoides i els seus derivats sintètics actuen a través del seu receptor nuclear GRC (*glucocorticoid receptor*). GRC forma part de la superfamília de factors transcripcionals activats per un lligand, alterant d'aquesta manera per diversos mecanismes la transcripció gènica [133, 134]. Aquesta activació de gens diana es produeix per la unió a elements de resposta a glucocorticoides (GRE) a la regió promotora dels gens. GRC es troba al citoplasma formant complexos heteromèrics com per exemple amb proteïnes de xoc tèrmic (HSP) o immunofilines com FKBP4 (*FK506 binding protein 4*), que actuen impedit el seu transport al nucli i la interacció amb altres factors transcripcionals [135]. Quan el receptor s'uneix a la hormona, pateix un canvi anomenat activació, fet que li provoca un canvi conformacional i una hiperfosforilació, es separen les proteïnes i d'aquesta manera el receptor queda lliure. Tal com mostra la Figura 9, tant HSP90 com HSP70 podrien regular el transport de GCR des del citoplasma al nucli [136].



**Figura 9.** Canvis en vies de senyalització segons el programa MetaCore en rates tractades amb dosi aguda de proantocianidines.

Si GCR està activat pot incrementar la capacitat d'unió de C/EBPbeta al DNA [137]. La proteïna codificada per aquest gen és important en la regulació de gens implicats en la resposta inflamatòria i immunitària. Estudis fets amb rates hiperinsulinèmiques mostren com un increment de C/EBPbeta pot induir l'expressió de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), proteïna relacionada amb la inflamació, fet que podria iniciar el procés d'aterosclerosi [138]. Finalment, GCR interacciona amb CBP i p300 (*E1A binding protein p300*) de manera que pot competir amb els seus factors de transcripció [139]. Tots dos gens tenen activitat histona acetiltransferasa i poden regular la transcripció mitjançant la remodelació de la cromatina, actuant d'aquesta manera en processos importants com la proliferació i el desenvolupament cel·lular.

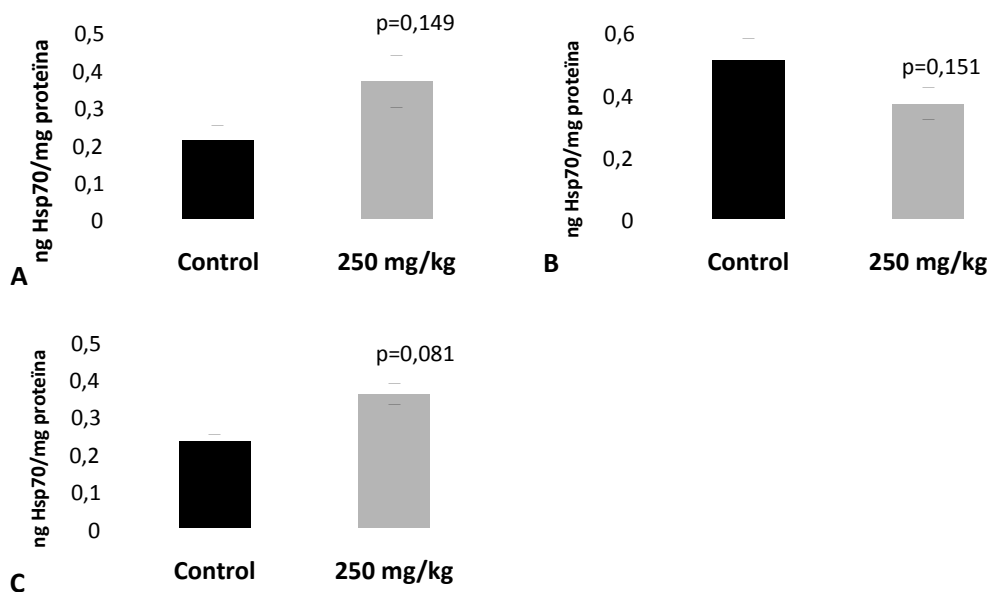
Estudis amb flavonoides [140] mostren com aquests poden actuar com a potents agonistes dels receptors de glucocorticoides. En aquest treball es mostra com els glucocorticoides s'uneixen al receptor nuclear i acceleren la transcripció de gens que codifiquen per proteïnes com la lipocortina-1, la qual inhibeix fortament la fosfolipasa-2, proteïna que s'encarrega de proveir l'àcid araquidònic, substrat de les ciclooxigenases. Aquest fet és un efecte indirecte que pot ser esperat de la interacció dels flavonoides amb el receptor de glucocorticoides.

#### 4.1.2. Marcadors hepàtics

##### 4.1.2.1. *Heat shock protein 70 kDa (Hsp70)*

La proteïna induïble *heat shock protein 70* (Hsp70) és una proteïna d'estrès, l'expressió de la qual es troba sobreexpressada quan la cèl·lula o l'organisme es troben sota condicions d'estrès. Donat que a l'array (tractament de 3 hores amb 250 mg GSPE/kg pes corporal) l'expressió del gen que codifica per aquesta proteïna es troba sobreexpressat gairebé un 50% i amb una  $p=0,022$ , es procedeix a la detecció d'aquesta proteïna a fetge després del tractament agut de 250 mg GSPE/kg pes corporal durant 1, 3 i 5 hores.

El Gràfic 8 mostra els resultats obtinguts mitjançant un kit ELISA detallat a l'apartat de materials i mètodes. S'observa com l'expressió de la proteïna és diferent al llarg del temps. Mentre que a 1 i 5 hores es troba més quantitat de Hsp70, a les 3 hores, temps en el que s'ha realitzat l'array, hi ha menys quantitat d'aquesta proteïna respecte al control. S'ha de destacar però que en cap dels 3 casos els resultats són significatius amb una  $p<0,05$ .



**Gràfic 8.** Efecte del tractament agut amb GSPE (250 mg/kg) sobre la concentració de Hsp70 a fetge. **A.** 1 hora de tractament. **B.** 3 hores de tractament. **C.** 5 hores de tractament. Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM (n=5). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents, \*p<0,05.

És interessant destacar l'augment, pràcticament significatiu a les 5 hores, coincident amb la lògica de la seqüència, primer activació de l'expressió, tal com mostra l'array, i després augment de la proteïna, tal com mostren els resultats del kit ELISA. Els ajustaments dels temps donen els resultats actuals però sembla clar que GSPE provoca un augment de la proteïna via augment de l'expressió del gen. Aquest resultat indica que GSPE pot provocar una situació d'estrès cel·lular.

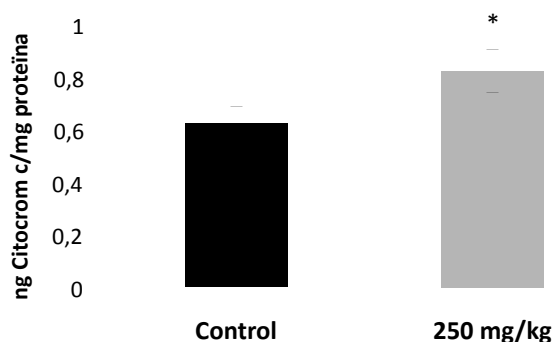
Altrament, aquesta proteïna té com a funció primària actuar de xaperona. L'augment de la seva concentració podria indicar una activació dels processos de remodelatge de l'estructura tridimensional de les proteïnes cel·lulars, potencialment afectats per la presència de proantocianidines a les cèl·lules, és només una hipòtesi però més coherent amb el conjunt de resultats obtinguts ja que un augment d'estrès com apunta l'explicació convencional no es detecta amb el conjunt de paràmetres estudiats que ens donen idea de l'estrès cel·lular.

#### 4.1.2.2. Citocrom c (Cyt c)

La mort cel·lular per apoptosi és fonamental i indispensable pel correcte funcionament cel·lular. La mitocondria juga un paper molt important en l'execució de l'apoptosi per la via intrínseca. El citocrom c ha estat identificat com un dels components requerits pels passos crucials en l'apoptosi, l'activació de la caspasa 3 i la fragmentació del DNA. Aquest, es redistribueix des de la mitocondria al citosol durant l'apoptosi, de manera que la seva quantificació és un indicador dels primers passos en l'inici de l'apoptosi.

Diferents autors [141] relacionen una inducció de Hsp70 amb una supressió de l'alliberament de citocrom c al citosol per part de la mitocòndria. El fet que són processos que ocorren en forma de cascada de senyals, es va quantificar el citocrom c a les 5 hores. En tots dos casos es va mirar a fetge.

El Gràfic 8 mostra els nivells de citocrom c citosòlic d'un homogenat de fetge. El resultat obtingut és l'esperable, un augment del citocrom c citosòlic, indicador d'una inducció de l'apoptosi. El resultat té un nivell de significativitat de  $p=0,024$ .



**Gràfic 9.** Efecte del tractament agut durant 5h amb GSPE (250 mg/kg) sobre la concentració de citocrom c a la fracció citosòlica d'un homogenat de fetge. Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM (n=7). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents, \* $p<0,05$ .

#### 4.1.2.3. Comprovació mitjançant expressió gènica de la via d'apoptosi intrínseca a la mitocòndria

Els resultats anteriors podrien ser indicadors d'una inducció de l'apoptosi per la via intrínseca a la mitocòndria. És per això que es va comprovar per PCR quantitativa a temps real l'expressió gènica d'alguns dels gens que codifiquen per les proteïnes implicades. Aquests gens són Apaf1 (*apoptosis protease-activating factor-1*), Casp3 (*caspase 3*), Bcl2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) i Bax (*Bcl2-associated X protein*). La Taula 15 mostra els resultats d'expressió gènica a fetge d'aquests gens.

A 1 hora, es troben reprimits Apaf1, necessari per portar la procaspasa 9 a l'apoptosoma i d'aquesta manera ser activada, Bcl2, una proteïna antiapoptòtica i Bax, una proteïna proapoptòtica, aquests dos últims de manera significativa. Casp 3 no està alterada la seva expressió. Que Bcl2 i Bax és trobin tots dos reprimits a la vegada és un resultat una mica estrany, donat que tenen funcions oposades.

A les 3 hores, només hi ha un canvi significatiu, una lleugera sobreexpressió d'Apaf1.

Finalment, a les 5 hores l'únic canvi significatiu és la repressió de Bcl2. Hi ha una sobreexpressió de Casp3 però té una  $p=0,138$ . Aquest dos resultats podrien ser indicatius d'un increment de l'apoptosi. Aquest resultat concorda amb l'obtingut a l'apartat anterior on es s'observava un augment de la quantitat de citocrom c citosòlic, marcador de les primeres fases de l'apoptosi. Està descrit que un augment de Bcl2 bloquejaria l'alliberament de citocrom c al citosol. Els resultats obtinguts indiquen una possible acció proapoptòtica de les proantocianidines de pinyol de raïm que seria dependent del temps.

Gens	1h		3h		5h	
	Control	Tractat	Control	Tractat	Control	Tractat
Apaf1	1,001 ± 0,021	0,877 ± 0,060	1,001 ± 0,027	<b>1,125 ±</b> <b>0,041*</b>	1,007 ± 0,054	0,869 ± 0,096
Casp3	1,003 ± 0,040	1,096 ± 0,065	1,019 ± 0,098	1,063 ± 0,027	1,004 ± 0,040	1,222 ± 0,121
Bcl2	1,004 ± 0,042	<b>0,864 ±</b> <b>0,031*</b>	1,011 ± 0,077	1,046 ± 0,063	1,002 ± 0,025	<b>0,772 ±</b> <b>0,076*</b>
Bax	1,002 ± 0,039	<b>0,725 ±</b> <b>0,018*</b>	1,004 ± 0,045	0,965 ± 0,028	1,002 ± 0,031	0,989 ± 0,090

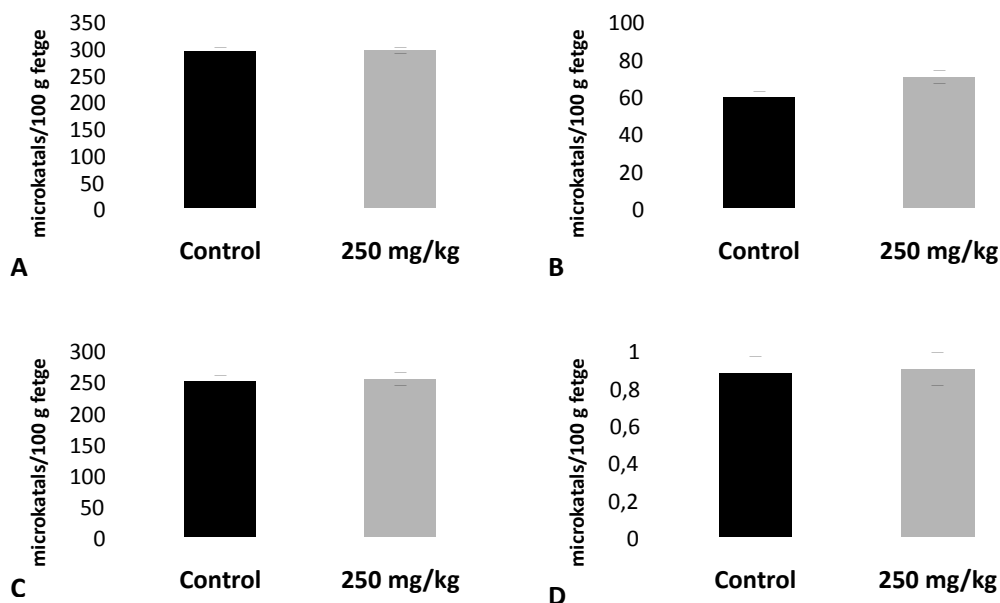
**Taula 15.** Efecte del tractament agut durant 1h, 3h i 5h amb GSPE (250 mg/kg) sobre els nivells de mRNA a fetge de diferents gens. Els resultats mostren la mitjana ± SEM (n=5). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents, \* $p<0,05$ .

#### 4.1.2.4. Activitats enzimàtiques

Dins dels diferents paràmetres a tenir en compte quan s'està estudiant l'efecte de les proantocianidines de pinyol de raïm sobre el fetge, està el metabolisme nitrogenat, clarament afectat segons els resultats descrits pels arrays. Per això, s'ha mesurat l'activitat de 4 enzims clau d'aquest metabolisme. Aquests són la glutamat oxalacetat transaminasa (GOT), la glutamat piruvat transaminasa (GPT), la glutamat deshidrogenasa (GDH) i la glutamina sintetasa (GS).

La determinació de l'activitat enzimàtica es va fer a les 5 hores de tractament.

Tal com mostra el Gràfic 10, en cap de les activitats mesurades s'observen canvis significatius, indicant que aquests enzims no són sensibles a l'administració de GSPE, si més no a les 5 hores després del tractament.



**Gràfic 10.** Efecte del tractament agut durant 5h amb GSPE (250 mg/kg) sobre diferents activitats enzimàtiques. **A.** Glutamat oxalacetat transaminasa (GOT). **B.** Glutamat piruvat transaminasa (GPT). **C.** Glutamat deshidrogenasa (GDH). **D.** Glutamina sintetasa (GS). Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM (n=10). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents, \*p<0,05.

#### 4.1.3. Marcadors plasmàtics

L'últim apartat correspon a marcadors plasmàtics, útils en la caracterització dels animals utilitzats en els diferents experiments. La Taula 16 mostra els resultats obtinguts.

El grup on hi ha més canvis significatius és el que ha estat tractat durant 5 hores amb l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm. Encara que els resultats dels altres dos grups, 1 i 3 hores, és interessant remarcar que el comportament segueix la mateixa tendència amb alguna excepció.

El resultat potser més interessant és la disminució dels triglicèrids en tots 3 grups, sent realment important a les 3 i 5 hores de tractament. Aquest resultat estaria indicant l'efecte de les proantocianidines sobre el metabolisme lipídic de la mateixa manera com quedava remarcat a l'anàlisi dels arrays.

La glucosa no es veu alterada significativament en cap dels 3 casos. Potser s'hauria de destacar que a les 5 hores els nivells del grup tractat són superiors als altres dos grups, 1 i 3 hores, encara que no siguin significatius.

Pel que fa al colesterol, sembla que les proantocianidines no afecten als nivells plasmàtics d'aquest.

Els àcids grassos es troben en els tres casos per sota dels nivells del control, encara que només de forma significativa a les 5 hores de tractament.

El nivells de  $\beta$ -hidroxibutirat no es troben alterats significativament en cap dels 3 casos, si que s'observa però un suau augment a les 5 hores de tractament. Degut a la elevada variabilitat del grup tractat, no s'arriba a resultats significatius.

Els nivells de glicerol plasmàtics són inferiors de manera significativa després de 1 i 5 hores de tractament.

Pel que fa al lactat plasmàtic, hi ha una disminució generalitzada, només significativa a les 5 hores de tractament.

Finalment, hi ha una disminució d'urea en plasma després del tractament durant 3 i 5 hores, només significativa a les 5 hores.

Paràmetres plasmàtics	1h		3h		5h	
	Control	Tractat	Control	Tractat	Control	Tractat
Glucosa (mg/dl)	92,81 ± 5,56	86,78 ± 3,95	102,33 ± 9,38	87,69 ± 5,49	76,45 ± 6,19	86,78 ± 7,08
Triglicèrids (mg/dl)	99,40 ± 5,38	80,98 ± 9,37	122,38 ± 11,21	<b>84,42 ± 10,11*</b>	84,26 ± 8,95	<b>60,23 ± 7,10*</b>
Colesterol (mg/dl)	15,25 ± 0,88	16,62 ± 2,44	32,93 ± 5,08	26,02 ± 2,64	30,76 ± 4,89	30,22 ± 6,20
Àcids Grassos Lliures (mg/dl)	22,20 ± 1,62	20,04 ± 1,35	27,44 ± 0,95	25,18 ± 1,60	22,71 ± 1,31	<b>15,17 ± 1,36*</b>
$\beta$ -Hidroxibutirat (mg/dl)	21,67 ± 3,25	21,62 ± 0,36	25,30 ± 5,59	24,48 ± 1,53	26,83 ± 3,97	34,45 ± 10,76
Glicerol (mg/l)	12,95 ± 1,75	<b>6,33 ± 1,52*</b>	8,20 ± 0,38	10,51 ± 1,73	21,96 ± 3,97	<b>12,79 ± 0,40*</b>
Lactat (mM)	3,28 ± 0,82	1,77 ± 0,11	1,47 ± 0,26	1,25 ± 0,11	2,38 ± 0,40	<b>1,27 ± 0,10*</b>
Urea (mg/dl)	28,48 ± 0,57	28,42 ± 1,31	28,62 ± 2,21	23,61 ± 1,18	31,94 ± 1,99	<b>24,11 ± 1,38*</b>

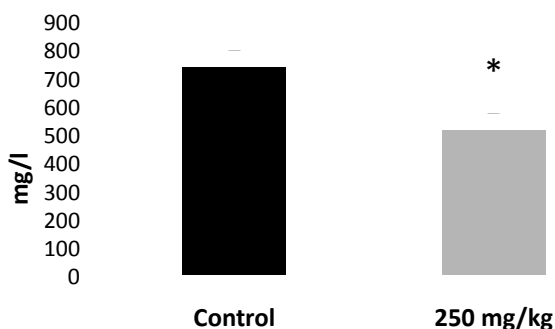
**Taula 16.** Efecte del tractament agut amb GSPE (250 mg/kg) sobre paràmetres plasmàtics. Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM (n=5). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents, \*p<0,05.



#### 4.1.4. Proteïna C reactiva a plasma

La proteïna C reactiva (CRP) és una proteïna de fase aguda que augmenta ràpidament la seva expressió després d'un procés d'inflamació o infecció. Donat que a l'array (tractament de 3 hores amb 250 mg GSPE/kg pes corporal) sembla haver un efecte de les proantocianidines sobre la inflamació i resultats previs al nostre grup [142] mostren com GSPE inhibeix tant l'expressió a fetge i teixit adipós mesentèric, com la concentració a plasma, es procedeix a la determinació d'aquesta proteïna a plasma després del tractament agut de 250 mg/kg de GSPE durant 5 hores.

El Gràfic 11 mostra els resultats obtinguts mitjançant un kit ELISA detallat a l'apartat de materials i mètodes. S'observa com la concentració de CRP és inferior de forma significativa a les rates que han rebut el tractament.



**Gràfic 11.** Efecte del tractament agut durant 5h amb GSPE (250 mg/kg) sobre la concentració plasmàtica de CRP. Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM (n=7). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents, \*p<0,05.

L'increment de la proteïna de fase aguda CRP és indicatiu d'una resposta inflamatòria crònica, per tant és un marcador òptim d'inflamació tant en humans com en rates. Estudis previs indiquen que una inflamació crònica està implicada en la patogènesi de l'aterosclerosi i que uns nivells elevats de CRP són un factor de risc de les malalties cardiovasculars [143]. A més, nivells de CRP elevats a plasma estan associats fortament amb la obesitat i malalties relacionades com la resistència a insulina, la diabetis mellitus o la hiperlipidèmia [144]. El que s'observa en aquest estudi és que GSPE disminueix els nivells plasmàtics de CRP en rates sanes, posant de manifest el poder antiinflamatori de les proantocianidines de pinyol de raïm com agent preventiu del processos inflamatoris.

## 4.2. Resposta a un tractament crònic amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm

### 4.2.1. Transcriptoma hepàtic

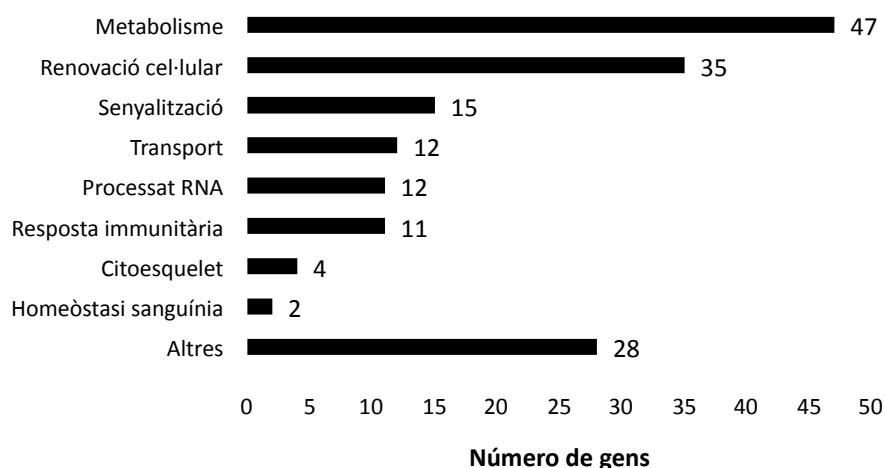
#### 4.2.1.1. Tractament crònic amb 5 mg/kg de GSPE

En les rates Wistar sanes després del tractament crònic durant 21 dies amb 5 mg/kg de l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm, el transcriptoma hepàtic canvia significativament. Així, de les 41.012 sondes testades, 19.884 tenen una expressió 2 vegades superior al seu valor basal. D'aquestes, 3.537 canvien de forma significativa amb una  $p < 0,05$  i 1.350 canvien de forma significativa amb una  $p < 0,01$  després d'aplicar un test de la *t* de Student. En aquest cas el criteri seguit per assegurar els canvis realment significatius és aplicar un test de *false discovery rate* de Benjamin-Hochberg amb una  $p < 0,05$ . D'aquesta manera, 233 seqüències reuneixen aquestes condicions, i ens garanteix la robustesa de les conclusions a les que es pugui arribar. D'aquestes, **165** corresponen a gens coneguts. Detallat a l'Annex 1.

Per tal de comprendre el significat metabòlic dels canvis d'expressió detectats, s'analitza com anteriorment segons el criteri propi de classificació (Figura 6). Addicionalment a l'anàlisi individual dels canvis d'expressió observats s'ha introduït la informació al programa MetaCore per poder integrar els canvis individuals d'expressió en el context de vies metabòliques i processos cel·lulars.

Dels 165 gens amb canvis robusts d'expressió, el programa MetaCore reconeix 59 dins dels seus mapes de vies metabòliques i 154 els reconeix com a objectes d'una xarxa que tenen un nexa en comú, el qual no té perquè ser un dels gens modificats significativament. Tant els mapes de vies metabòliques com les xarxes de processos les classifica estadísticament aplicant un test corregit amb *false discovery rate*  $p < 0,05$  que permet rebutjar processos o objectes amb una significativitat dubtosa, assegurant que els resultats obtinguts no contenen falsos positius. D'aquests, el 62% es troben sobreexpressats, i la distribució envers el p-valor és bastant homogènia entre 0 i 0,05.

Segons el criteri propi de classificació, els processos cel·lulars que resulten afectats són els indicats a la Figura 10, on s'indiquen per a cada procés el conjunt de gens amb canvis d'expressió.



**Figura 10.** Classificació de gens afectats per un tractament crònic de 5 mg GSPE/kg pes corporal, i agrupats en processos biològics segons la classificació pròpia emprada.

Tal com es pot veure a la Figura 10, el procés més afectat és el de metabolisme cel·lular. S'ha de destacar que la majoria de gens afectats estan inclosos en la subclassificació de metabolisme proteic que inclou la síntesi i degradació d'aminoàcids, processos de traducció, així com la síntesi i degradació de proteïnes. Segueixen en importància els gens involucrats en la renovació cel·lular i la senyalització. El detall dels gens que canvien d'expressió es presenta a l'Annex 1. Tot seguit es fa una descripció dels principals canvis observats en els diferents grups.

Els canvis d'expressió en els gens involucrats en el metabolisme es presenten al Gràfic 12, indicant en diferents colors la tipologia de metabolisme a la que pertanyen: metabolisme lipídic (verd), metabolisme glucídic (taronja), metabolisme de xenobiòtics (lila), metabolisme proteic (groc), metabolisme de nucleòtids (blau) i metabolisme energètic (vermell).

Canvis d'expressió de gens que codifiquen per metabolisme



**Gràfic 12.** Classificació de gens segons el metabolisme cel·lular en el qual estan implicats. ■ Metabolisme lipídic ■ Metabolisme glucídic ■ Metabolisme de xenobiòtics ■ Metabolisme proteic ■ Metabolisme de nucleòtids ■ Metabolisme energètic.

Del Gràfic 12 es desprèn que els principals canvis metabòlics es donen en el metabolisme lipídic, el metabolisme energètic i el metabolisme proteic. Donat que són els 3 més afectats, són els que s'explicaran amb més detall a continuació.

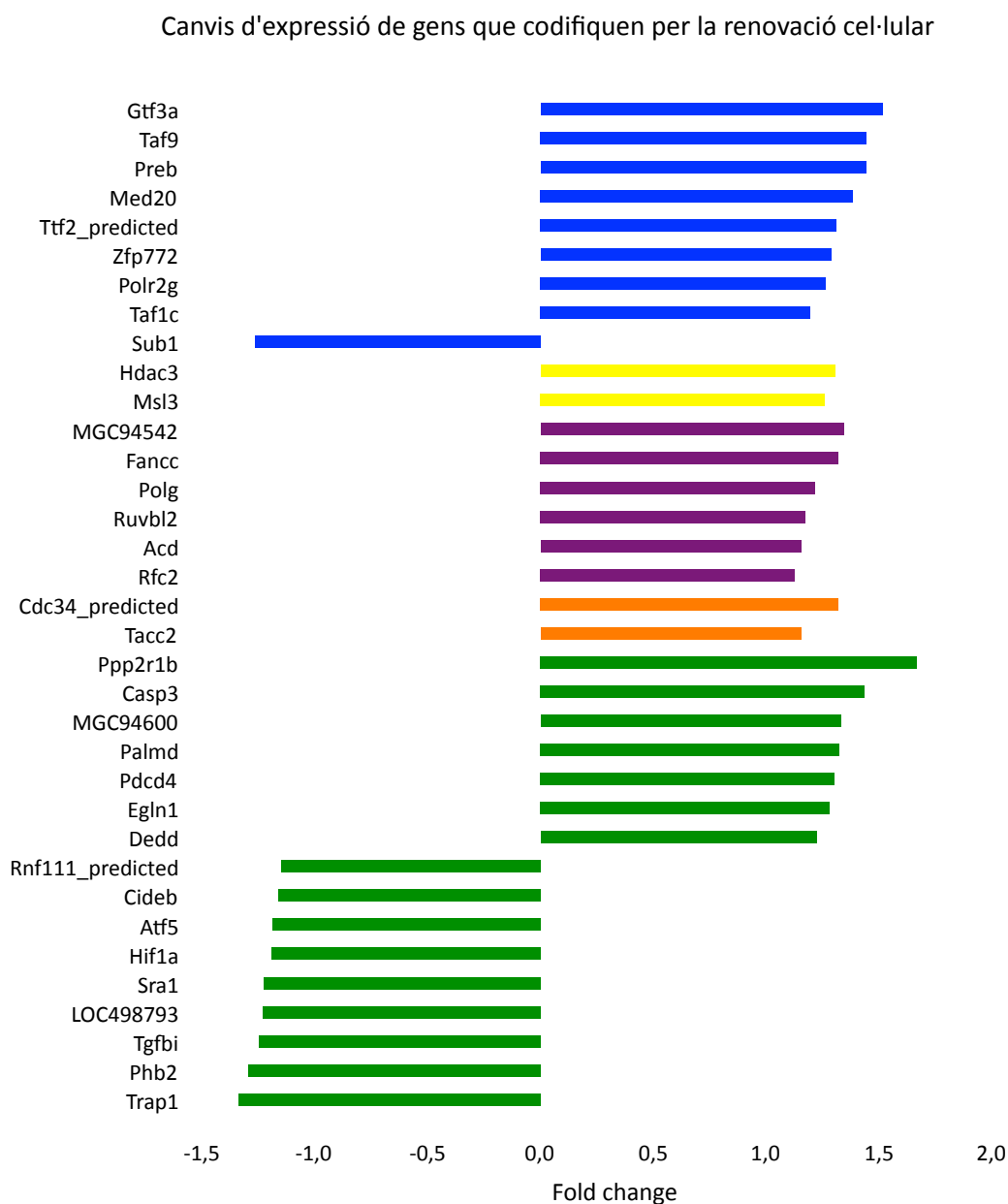
Dins del metabolisme lipídic, els gens sobreexpressats són la serina palmitoiltransferasa (Sptlc1), enzim clau en la biosíntesi d'esfingolípid, l'estradiol 17-beta-dehidrogenasa 8 (Hsd17b8), regulador de les concentracions d'estrògens i andrògens, la fosfolipasa 3 (Pld3), la diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (Dgat1), que codifica per l'enzim catalitzador del pas final en la síntesi de triglicèrids, la peroxirredoxina 3 (Prdx3) implicada en la protecció del dany oxidatiu i per últim l'albumina (Alb), que desenvolupa una funció important en el transport de lípids. Només hi ha tres gens reprimits. El primer d'ells i el que experimenta una repressió més forta és l'acil-Coenzim A oxidasa 2 (Acox2), involucrat en la degradació dels àcids grassos de cadena llarga i dels intermediaris dels àcids biliars als peroxisomes. Els altres dos són la peroxirredoxina 6 (Prdx6) que actua en la regulació de la producció de fosfolípids així com en la protecció envers el dany oxidatiu, i finalment el receptor nuclear d'àcid retinoic (Rxra), involucrat en el metabolisme lipídic.

Dins del metabolisme energètic, cal destacar la marcada sobreexpressió de l'ATP sintasa Atp5a1, involucrat en la síntesi d'ATP, sent gairebé un 50% respecte al control. Els altres gens sobreexpressats en ordre d'intensitat d'expressió són el citocrom b-561 (Cyb561), implicat en la generació de metabòlits a partir dels quals obtenir energia, RGD1562079 predit per un dels factors d'ensamblatge de la succinat deshidrogenasa (Sdhaf1) i finalment dihidrolipoamida S-acetiltransferasa (Dlat), que forma part del complex piruvat deshidrogenasa que catalitza la conversió de piruvat a acetil-Coa i CO<sub>2</sub>. Per ordre de repressió hi ha la subunitat c de la succinat deshidrogenasa (Sdhc), que es troba a la cadena de transport d'electrons de la mitocondria, l'Atp sintasa Atp5b, i la piruvat deshidrogenasa beta (Pdhb), que també forma part del complex piruvat deshidrogenasa igual que Dlat, aquest complex és el nexa entre la glicòlisi i el cicle dels àcids tricarboxílics (TCA).

Finalment, dins del metabolisme proteic, només es comentaran els gens que tenen com a mínim un 30% de repressió o sobreexpressió, donat que dins d'aquest grup hi ha molts gens modificats. El gen que es troba més altament reprimat és F-bxo 7 (Fbxo7), involucrat en la degradació de proteïnes mitjançant la ubiquitinació. També destacar dins dels gens que es troben reprimits, encara que inferior al 30%, les proteïnes ribosomals Rps11, Rpl37, Rpl23 i Mrps16, que és una proteïna ribosomal mitocondrial, totes elles implicades en la síntesi de proteïnes. Dins dels gens que es troben sobreexpressats, majoritàriament són gens involucrats en la traducció de proteïnes, són els factors d'elongació Eef1a1, Eif4e2, LOC315661 i LOC499224, aquests dos últims similars a Eef1a2. També es troben sobreexpressats la glutamat oxalacetat transaminasa 2, mitocondrial (Got2) que juga un paper important dins del metabolisme dels aminoàcids, la distonia 1 (Dyt1) que ajuda al correcte plegament de les

proteïnes, i per últim la 3-hidroxi-isobutirat deshidrogenasa (Hibadh), implicada en el catabolisme de la valina.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en la renovació cel·lular es presenten al Gràfic 13, indicant en diferents colors la tipologia de la classificació a la que pertanyen: apoptosi/desenvolupament/proliferació/creixement (verd), regulació del cycle cel·lular (taronja), processat del DNA (lila), histones/helicases/remodelació de la cromatina (groc) i regulació de la transcripció (blau).



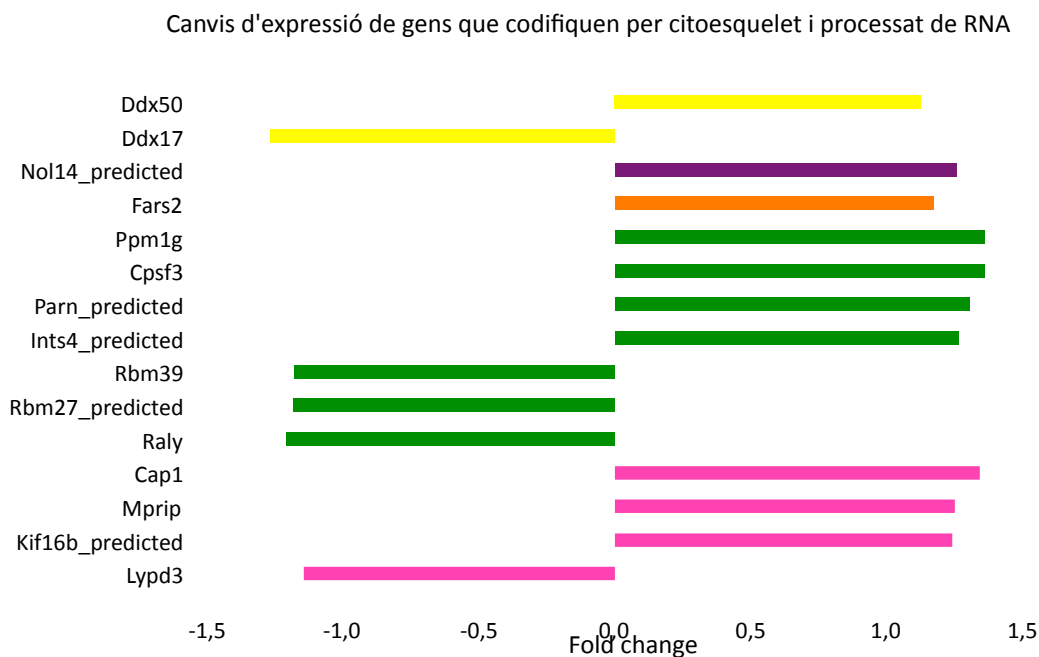
**Gràfic 13.** Classificació de gens involucrats en la renovació del cycle cel·lular. ■ Apoptosi/Desenvolupament/Proliferació/Creixement ■ Regulació del cycle cel·lular ■ Processat DNA ■ Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina ■ Regulació de la transcripció.

Del Gràfic 13 es desprèn que els principals canvis es troben en la regulació de l'apoptosi/desenvolupament/proliferació/creixement, seguit per la regulació de la transcripció i el processat de DNA, que són bàsicament els que es detallaran a continuació.

Dins de l'apoptosi/desenvolupament/proliferació/creixement, hi ha una distribució equitativa dels gens que es troben sobreexpressats i els que es troben reprimits. Els que es troben sobreexpressats en ordre d'expressió són la proteïna fosfatasa 2, subunitat reguladora A (Ppp2r1b), aquest gen codifica per la subunitat reguladora de la proteïna fosfatasa 2 que és una de les principals serina/treonina fosfatases, i està implicat en el control negatiu del creixement i divisió cel·lular. La caspasa 3 (Casp3) experimenta més d'un 40% de sobreexpressió, la qual juga un paper clau en l'execució de la mort cel·lular programada i relacionat amb ella està el domini efector de mort Dedd encara que amb una sobreexpressió més suau. MGC94600 o scotin, pot induir l'apoptosi de manera depenent a l'activació de les caspases i també està implicada en l'apoptosi de forma dependent a p53. Dins dels gens que es troben sobreexpressats, destacar Trap1, inclosa en la família de les *heat shock proteins* Hsp90, i en aquest cas correspon a una proteïna mitocondrial i Hif1a, el factor induïble d'hipòxia 1, que juga un paper essencial en respostes homeostàtiques cel·lulars i sistèmiques a la hipòxia.

Pel que fa a la regulació de la transcripció, els gens inclosos majoritàriament es troben sobreexpressats. Només hi ha un gen reprimat, Sub1, un coactivador transcripcional. Respecte als gens que es troben sobreexpressats, hi ha dos TATA box, Taf1c i Taf9, implicades en el procés de transcripció per la RNA polimerasa. Els dos gens més altament sobreexpressats són l'element regulador de prolactina (Preb), que és un factor de transcripció, i un factor de transcripció general Gtf3a.

Els canvis d'expressió en els gens implicats en el manteniment del citoesquelet i el processat de RNA es presenten al Gràfic 14, indicant en diferents colors la tipologia de la classificació a la que pertanyen: citoesquelet (rosa), mRNA (verd), tRNA (taronja), rRNA (lila) i helicases de RNA (groc).



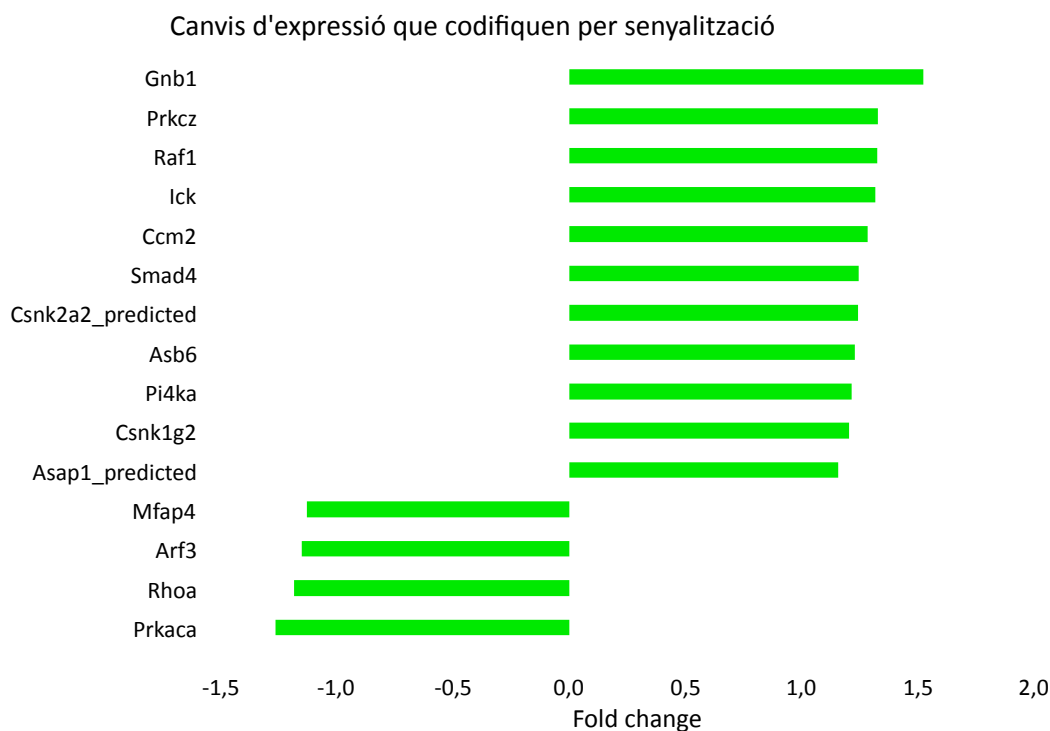
**Gràfic 14.** Classificació de gens involucrats en el manteniment del citoesquelet i el processat del RNA. ■ Citoesquelet ■ mRNA ■ tRNA ■ rRNA ■ Helicases RNA.

Del Gràfic 14 es desprèn que els principals canvis es troben en el processat de RNA missatger (mRNA), mentre que pel processat de tRNA i rRNA gairebé no hi ha cap gen afectat. Dins del processat de mRNA és interessant que els gens sobreexpressats ho fan de manera més marcada que els que es troben reprimits. Els més sobreexpressats són Ppm1g (*protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoforma*), Cpsf3 (*cleavage and polyadenylation specificity factor 3*) i Parn (*poly(A)-specific ribonuclease (deadenylation nuclease)\_predicted*), amb més d'un 30%.

Els gens involucrats en el manteniment del citoesquelet tampoc es troben gaire afectats. Destacar que hi ha una sobreexpressió generalitzada, encara que en general el canvis no són gaire importants. El gen més afectat és la proteïna associada adenilat-ciclasa 1 (Cap1) que experimenta un 35% de sobreexpressió. Aquesta regula la organització del citoesquelet a través dels filaments d'actina i proteïnes associades.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en la senyalització es presenten al Gràfic 15. És un grup bastant heterogeni ja que inclou diferents tipus de senyalització. Principalment inclou quinases, implicades en la fosforilació/desfosforilació, encara que també es poden trobar gens implicats en la transmissió de senyals per mitjà de la sinapsi.



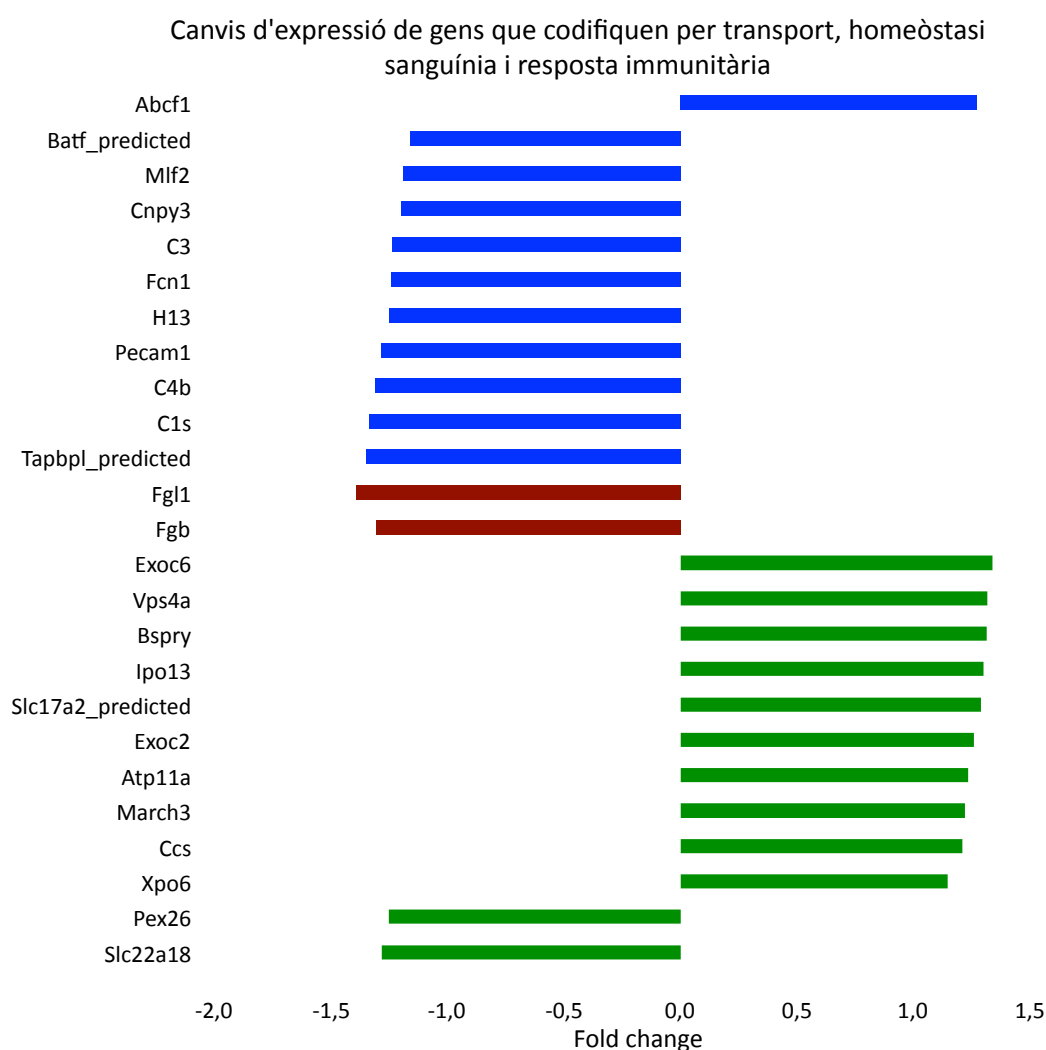


**Gràfic 15.** Classificació de gens involucrats en diferents processos de senyalització. ■ Senyalització.

Del Gràfic 15 es pot concloure que hi ha una sobreexpressió generalitzada, encara que només un dels gens inclosos en aquesta subclassificació supera el 50% de sobreexpressió. Aquest gen és Gnb1 (*guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1*), és una proteïna G. Les proteïnes G, conegudes amb aquest nom degut a la seva interacció amb GTP, són transductores de senyals que porten la informació des d'un receptor fins a una o més proteïnes efectores. Gnb1 pertany a les proteïnes G heterotrimèriques o grans i es situa anclada a la membrana tant en repòs com quan transmet la senyal. Hi ha dues proteïnes G reprimides, Rhoa (*Ras homolog gene family, member A*) i Arf3 (*ADP-ribosylation factor 3*), totes dues lleugerament reprimides. En aquest cas són proteïnes G monomèriques o petites. A diferència de l'anterior, les monomèriques es troben lliures al citosol i al nucleoplasma. Destacar la sobreexpressió de Raf1 (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*), un oncogen, implicat en la transducció de senyals mitogèniques des de la membrana al nucli. Forma part de la via de senyalització dependent de Ras des dels receptors al nucli. Dins d'aquest grup es troben dues proteïnes quinases, Prkaca (*protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha*) i Prkcz (*protein kinase C, zeta*). Prkaca, gen que experimenta la màxima repressió dins d'aquest grup, és la subunitat catalítica de la proteïna quinasa A (Pka) i fosforila i activa factors de transcripció en resposta a nivells elevats de AMP cíclic. D'altra banda, Prkcz, el segon gen més sobreexpressat, pertany a la família de les proteïnes quinasa C amb la diferència que no

requereix ni  $Ca^{2+}$  ni diacilglicerols per activar-se com les demés pertayents a aquest grup. Dos gens que també es troben sobreexpressats són dues caseïna quinases, Csnk1g2 i Csnk2a2, responsables de la fosforilació de la caseïna. Aquestes estan implicades en gran varietat de processos de senyalització com la proliferació i diferenciació cel·lular, a més de participar en la via de senyalització de Wnt. Finalment, cal destacar dins d'aquest grup SMAD4 (*SMAD family member 4*), que es troba clarament sobreexpressat. Pertany a la família de les proteïnes transductores de senyal SMAD, les quals són fosforilades i activades pels receptors transmembrana serina-treonina quinases en resposta a la senyalització del factor de creixement transformant beta ( $Tgf\beta$ ). SMAD4 està implicat en gran varietat de processos, tals com la diferenciació, apoptosi o el cicle cel·lular.

Els canvis d'expressió que es presenten al Gràfic 16 engloben el transport (verd), la homeòstasi sanguínia (grana) i la resposta immunitària (blau).



**Gràfic 16.** Classificació de gens involucrats en el transport cel·lular, gens involucrats en la homeòstasi sanguínia i gens involucrats en la resposta immunitària. ■ Transport ■ Homeòstasi sanguínia ■ Resposta immunitària.

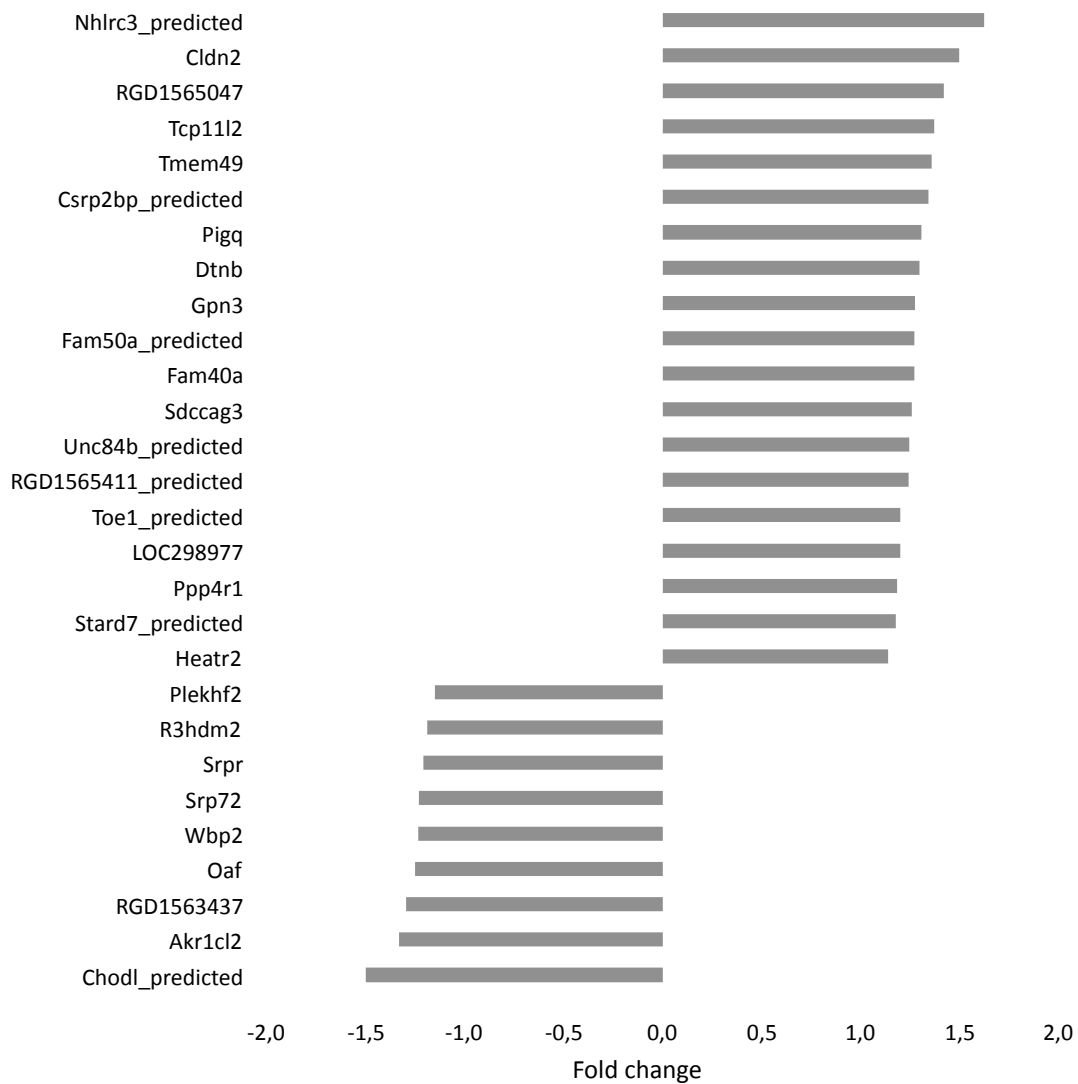
Dins del transport, es troben inclosos gens implicats en el transport de ions, transport de proteïnes així com el transport entre nucli i citoplasma. Hi ha una clara activació del transport, encara que els canvis no són molt marcats. Dels que estan reprimits, destacar Pex26 (*peroxisome biogenesis factor 26*), que es requereix per l'import de proteïnes als peroxisomes. Dels gens que es troben sobreexpressats, es destaquen els que ho fan amb més d'un 30% d'expressió. En ordre ascendent es troba Ipo13 (*importin 13*), implicat en el transport de proteïnes del citoplasma al nucli, Bspry (*B-box and SPRY domain containing*), implicat en el transport de calci, Vps4a (*vacuolar protein sorting 4 homolog A (S. cerevisiae)*), involucrat en el tràfic intracel·lular de proteïnes i finalment Exoc6 (*exocyst complex component 6*), imprescindible pel tràfic vesicular des de l'aparell de Golgi fins a la superfície cel·lular.

Pel que fa a l'homeòstasi sanguínia, només hi ha dos gens alterats i tots dos estan reprimits. Són Fgb (*fibrinogen beta*) i Fgl1 (*fibrinogen like-1*). Fgb, és el component beta del fibrinogen, precursor de la fibrina que és el component més abundant dels coàguls. Fgl1, no conté la regió sensible a la trombina i per tant no hi hauria formació del coàgul.

Finalment, es troben els gens relacionats amb la resposta immunitària. Hi ha una repressió generalitzada. El més interessant a destacar, és la repressió de 3 gens implicats en l'activació de la via del complement: C1s, C3 i C4. També es troba reprimat Pecam (*platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), molècula d'adhesió cel·lular que es requereix per la migració transendotelial dels leucòcits sota condicions d'inflamació. Només hi ha un gen sobreexpressat, Abcf1 (*ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1*) que podria estar regulat pel factor de necrosi tumoral alfa (Tnf $\alpha$ ).

L'última subclassificació es mostra al Gràfic 17, són els gens que no han estat associats a cap de les anteriors subclassificacions degut a que encara no es coneix la funció que desenvolupa cada un d'ells dins la cèl·lula. Tots ells colorejats en gris.

Canvis d'expressió de gens que codifiquen per altres



**Gràfic 17.** Classificació de gens que no han estat associats a cap de les classificacions anteriors. ■ Altres.

Per tal d'integrar la informació dels canvis d'expressió que s'ha descrit fins ara, com ja s'ha dit anteriorment, s'ha fet servir el programa MetaCore. Com a resultats ens indica en primer lloc que les 10 vies metabòliques i els 10 processos cel·lulars més afectats pel tractament crònic amb 5 mg/kg de GSPE són els indicats a la Taula 17. Els símbols que apareixen a les figures del MetaCore estan detallats a l'Annex 3.

Vies metabòliques	Processos cel·lulars
Immune response_Classical complement pathway	Inflammation_Complement system
Immune response_Lectin induced complement pathway	Translation_Translation initiation
Immune response_Alternative complement pathway	Transcription_Nuclear receptors transcriptional regulation
Immune response_MIF - the neuroendocrine-macrophage connector	Signal transduction_WNT signaling
Apoptosis and survival_HTR1A signaling	Protein folding_ER and cytoplasm
Regulation of CFTR activity (norm and CF)	DNA damage_DBS repair
Development_Activation of ERK by Kappa-type opioid receptor	Cell adhesion_Cell junctions
G-protein signaling_G-Protein alpha-12 signaling pathway	Response to hypoxia and oxidative stress
Apoptosis and survival_Ceramides signaling pathway	Signal transduction_ESR1-nuclear pathway
Signal transduction_cAMP signaling	Inflammation_MIF signaling

**Taula 17.** Vies metabòliques i processos cel·lulars més afectats pel tractament crònic de 5 mg GSPE/kg pes corporal.

Pel que fa a les vies metabòliques, interpretant els resultats del MetaCore, hom pot concloure que les vies més afectades són les que tenen relació amb la resposta immunitària.

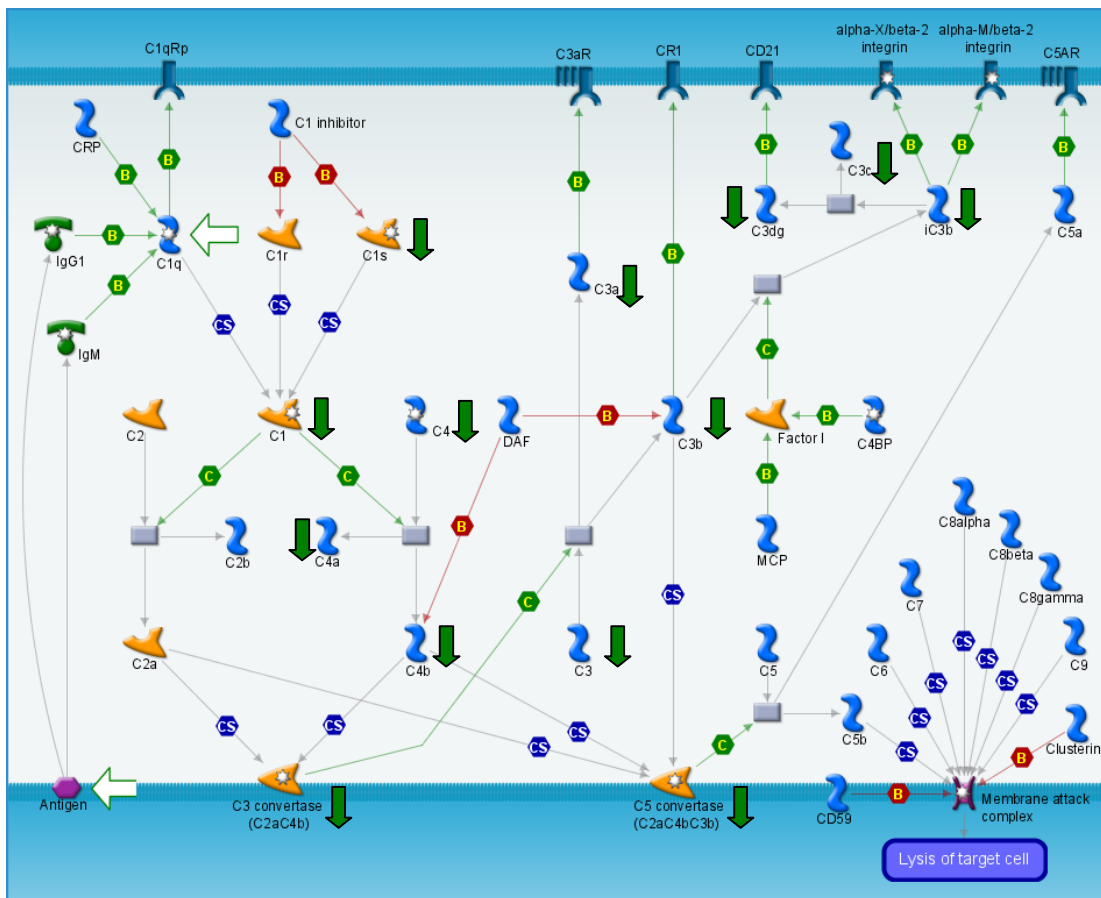
La Figura 11 mostra la via clàssica del complement. El sistema del complement és el major efector de la resposta immunitària innata humoral, protegint a l'hoste de microorganismes tals com les bacteries. Els components de la via del complement estan designats numèricament: C1 – C9. Els pèptids formats durant l'activació es designen mitjançant lletres en minúscula [145, 146]. Normalment, el fragment petit resultant del tall o escisió s'anomena "a", i el fragment més gran s'anomena "b", ex. C3a C3b.

L'activació de la via clàssica del complement comença comunament amb la formació de complexos solubles antigen-anticòs, anomenats immunocomplexos, o amb la unió dels anticossos (immunoglobulines tals com IgG1 i IgM) a antigens diana com cèl·lules bacterianes.

El pas inicial implica els components del complement C1, C2, C3 i C4, els quals es troben presents al plasma de forma inactiva. La formació dels complexos antigen-anticòs induïx canvis conformacionals en els dominis Fc de les immunoglobulines, fet que permet la unió de C1 [147]. C1 plasmàtic està compost de tres subunitats proteïques: C1q, C1r i C1s, i està estabilitzat per ions de Ca<sup>2+</sup>.

L'activació de C1 està regulada per l'inhibidor de C1, que inhibeix la seva activació mitjançant la unió a les subunitats C1r i C1sb [148]. L'activació de C1 acaba amb la formació de la convertasa C3, que talla C3. En la via clàssica també està implicada la convertasa C5. Com s'explica posteriorment a la Figura 6, la seqüència d'activació del sistema del complement

acaba amb la lisi cel·lular del patògen després de la formació del complex d'atac a la membrana que media la lisi de la seva membrana cel·lular.



**Figura 11.** Canvis en la resposta immunitària segons el programa MetaCore en rates tractades amb la dosi crònica de 5 mg GSPE/kg pes corporal. Aquesta figura correspon a la via clàssica del complement.

La dosi de 5 mg/kg sembla tenir un efecte manifest sobre l'apoptosi. Dues de les 10 vies metabòliques més afectades estan relacionades amb la supervivència i l'apoptosi. La primera és mitjançant la via de senyalització a través del receptor de serotonina (HTR1A). L'altra via és mitjançant la via de senyalització de les ceramides. A continuació es detallarà la primera d'elles (Figura 12).

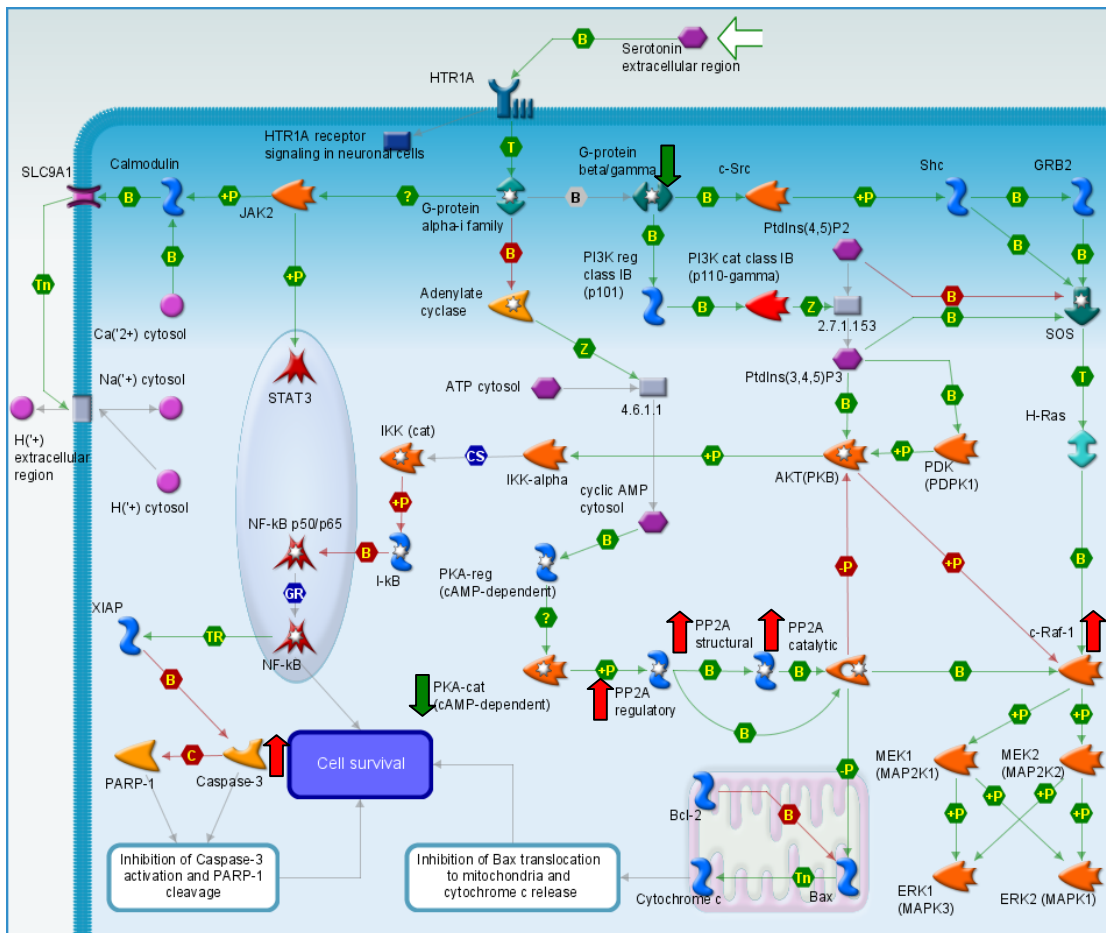
El receptor de serotonina (HTR1A) pertany a la família de receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs). La unió del lligand, serotonina, crea la dissociació del complex trimèric de proteïna G associada a aquest receptor. Aquesta dissociació de la proteïna G trimèrica desemboca amb l'activació de les subunitats proteïna G alfa i proteïna G beta/gamma [149].

La família de proteïnes G alfa-i, al seu torn, estimula l'activitat de JAK2 (*Janus kinase 2*) per un mecanisme encara desconegut. Una vegada activat JAK2, fosforila la calmodulina i STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). La calmodulina fosforilada s'uneix a SLC9A1

(*solute carrier family 9 member 1*) i estimula la seva activitat. SLC9A1 media l'intercanvi 1:1 de  $\text{Na}^+$  extracel·lular per  $\text{H}^+$  intracel·lular, mantenint d'aquesta manera el pH [150].

L'alliberament de la proteïna G beta/gamma pot estimular PI3K cat class IB (p110-gamma) a través de la seva subunitat reguladora. PI3K cat class IB (p110-gamma) és un enzim que converteix  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) a  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*). Aquest últim interacciona amb Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) i incrementa la seva activitat reclutant PDK (*phosphoinositide dependent protein kinase*) perquè el fosforili. A continuació Akt pot fosforilar IKK alfa, subunitat del complex *I $\kappa$ -B kinase complex* (IKK-cat), activant-lo. Les proteïnes IKK-cat tenen la capacitat de fosforilar I $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*). La fosforilació de I $\kappa$ -B porta a la seva ubiquitinació i degradació dins del proteasoma 26S. I $\kappa$ -B inactiva NF $\kappa$ B segrestant-lo al citoplasma, per tant, la degradació de I $\kappa$ -B, permet l'activació del complex NF $\kappa$ B. Aquest complex activat es transloca al nucli, on s'uneix al DNA i promou la transcripció de XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), un membre de la família d'inhibidors d'apoptosi (IAP). XIAP té la capacitat d'unir-se i inhibir la caspasa 3 amb la conseqüent prevenció del tall de PARP-1 (*poly (ADP-ribose) polymerase 1*) [151]. Per tots aquests processos, la senyalització de HTRA1 a través de la via PI3K/NF $\kappa$ B proporciona una acció antiapoptòtica i porta a la cèl·lula a la supervivència [152, 153].

A banda de l'activació PI3K cat class IB (p110-gamma), la subunitat de proteïna G lliure beta/gamma també és capaç d'activar la senyalització a través de la tirosina quinasa c-Scr (*v-src sarcoma viral oncogene homolog*). Aquesta cascada de senyals acaba amb l'activació de c-Raf-1 (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*), que inicia la cascada de fosforilació i activa MEK1/ERK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase 1/mitogen-activated protein kinase 3*) i MEK2/ERK2 (*mitogen-activated protein kinase kinase 2/mitogen-activated protein kinase 1*)[154].



**Figura 12.** Canvis en la via apoptòtica segons el programa MetaCore en rates tractades amb la dosi crònica de 5 mg GSPE/kg pes corporal. Aquesta figura correspon a la via d'apoptosi i supervivència mitjançant la senyalització per serotonina (HTR1A).

HTRA adicionalment controla les vies de NFκB i ERK a través de la família de proteïnes G alfa i, mitjançant la inhibició de l'activitat de l'adenilat ciclasa. L'adenilat ciclasa és un enzim que catalitza la formació de cAMP. cAMP es requereix per l'activació de la proteïna quinasa dependent de cAMP (PKA). Al seu torn, PKA estimula l'activitat de la subunitat catalítica de PP2A (*protein phosphatase 2A catalytic subunit*) a través de la fosforilació de la subunitat reguladora de PP2A (*PP2A regulatory*). Una vegada fosforilada, pot inactivar AKT mitjançant la seva desfosforilació. També pot activar c-Raf-1 unint-se i estimulament la translocació de Bax (*BCL2-associated X protein*) a la mitocondria per mitjà de la desfosforilació [155]. Bax interacciona amb Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) a la membrana mitocondrial. Aquesta interacció, al seu torn, resulta en la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i promou l'alliberament de la proteïna proapoptòtica citocrom c. Quan hi ha activació de HTR1A, la concentració del cAMP citosòlic disminueix, fet que porta a la inactivació de la subunitat catalítica de PP2A i la supressió de totes les seves activitats pro-apoptòtiques [155].



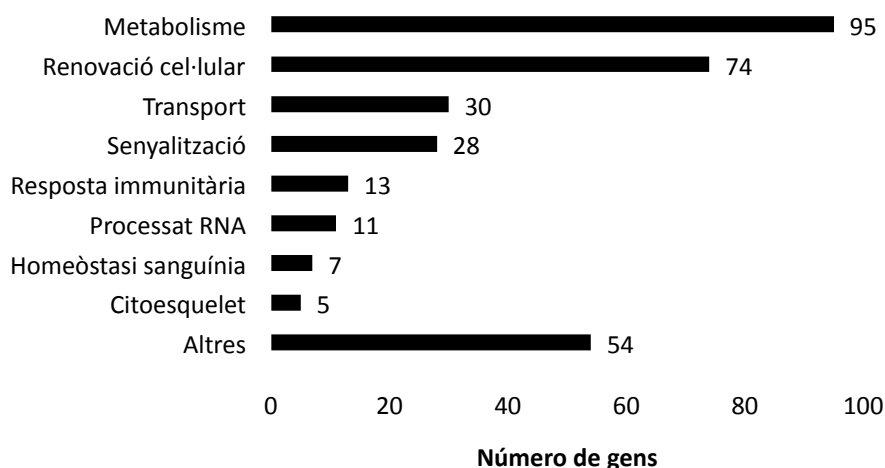
#### 4.2.1.2. Tractament crònic amb 25 mg/kg de GSPE

En les rates Wistar sanes després del tractament crònic durant 21 dies amb 25 mg/kg de l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm, el transcriptoma hepàtic canvia significativament. Així, de les 41.012 sondes testades, 19.884 tenen una expressió 2 vegades superior al seu valor basal. D'aquestes, 3.354 canvien de forma significativa amb una  $p < 0,05$  i 1.406 canvien de forma significativa amb una  $p < 0,01$  després d'aplicar un test de la t de Student. En aquest cas el criteri seguit per assegurar els canvis realment significatius és aplicar un test de *false discovery rate* de Benjamin-Hochberg amb una  $p < 0,05$ . D'aquesta manera, 483 seqüències reuneixen aquestes condicions, i ens garanteix la robustesa de les conclusions a les que es pugui arribar. D'aquestes, **317** corresponen a gens coneguts. Detallat a l'Annex 1.

Per tal de comprendre el significat metabòlic dels canvis d'expressió detectats, s'analitza com anteriorment segons el criteri propi de classificació (Figura 6). Addicionalment a l'anàlisi individual dels canvis d'expressió observats s'ha introduït la informació al programa MetaCore per poder integrar els canvis individuals d'expressió en el context de vies metabòliques i processos cel·lulars.

Dels 317 gens amb canvis robusts d'expressió, el programa MetaCore reconeix 119 dins dels seus mapes de vies metabòliques i 291 els reconeix com a objectes d'una xarxa que tenen un nexa en comú, el qual no té perquè ser un dels gens modificats significativament. Tant els mapes de vies metabòliques com les xarxes de processos les classifica estadísticament aplicant un test corregit amb *false discovery rate*  $p < 0,05$  que permet rebutjar processos o objectes amb una significativitat dubtosa, assegurant que els resultats obtinguts no contenen falsos positius. D'aquests, 144 es troben sobreexpressats i 173 reprimits, i la distribució envers el p-valor és del 21%  $p \leq 0,01$ .

Segons el criteri propi de classificació, els processos cel·lulars que resulten afectats són els indicats a la Figura 13, on s'indiquen per a cada procés el conjunt de gens amb canvis d'expressió.



**Figura 13.** Classificació de gens afectats per un tractament crònic de 25 mg GSPE/kg pes corporal, i agrupats en processos biològics.

Tal com es pot veure a la Figura 13, el procés més afectat és el de metabolisme cel·lular. S'ha de tenir en compte però que la majoria estan inclosos en la subclassificació de metabolisme proteic que inclou la síntesi i degradació d'aminoàcids, processos de traducció, així com la síntesi i degradació de proteïnes. Segueixen en importància els gens involucrats en la renovació cel·lular, el transport i la senyalització. El detall dels gens que canvien d'expressió es presenta a l'Annex 1. Tot seguit es fa una descripció dels principals canvis observats en els diferents grups, comentant aquells canvis amb un mínim d'un 25% de sobreexpressió o repressió i d'aquells gens que estiguin relacionats entre ells.

Els canvis d'expressió dels gens involucrats en el metabolisme es presenten al Gràfic 18, indicant en diferents colors la tipologia de metabolisme a la que pertanyen: metabolisme lipídic (verd), metabolisme glucídic (taronja), metabolisme de xenobiòtics (lila), metabolisme de nucleòtids (blau) i metabolisme energètic (vermell). Al Gràfic 19 està representat exclusivament el metabolisme proteic (groc).

### Canvis d'expressió de gens que codifiquen per metabolisme



**Gràfic 18.** Classificació de gens segons el metabolisme cel·lular en el qual estan implicats. ■ Metabolisme lipídic ■ Metabolisme glucídica ■ Metabolisme de xenobiòtics ■ Metabolisme de nucleòtids ■ Metabolisme energètic.

Del Gràfic 18 i Gràfic 19 es desprèn que els principals canvis metabòlics es donen en el metabolisme lipídic, el metabolisme energètic i el metabolisme proteic. El metabolisme proteic s'explicarà a continuació del gràfic corresponent, donat que en aquesta categoria hi ha molts gens implicats.

Dins del metabolisme lipídic, el gen amb la sobreexpressió més forta és *lah1 (isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog (S. cerevisiae))*, una probable fosfolipasa, i està acompanyat de la sobreexpressió de dues fosfolipases: *Pld1* i *Pld3*, les quals catalitzen la hidròlisi de fosfatidilcolina a àcid fosfatídic i colina. Un altre gen destacat és *Cept1 (choline/ethanolamine phosphotransferase 1)*, gen que catalitza la síntesi dels fosfolípids fosfatidilcolina i fosfatidiletanolamina. Aquests gens fan funcions oposades, ja que catalitzen la hidròlisi i síntesi de fosfatidilcolina. Pel que fa als gens que es troben reprimits en ordre decreixent hi ha *Hsd17b11 (hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11)*, implicat en el metabolisme dels andrògens, on produeix androstan; *Gpd1 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble))* juga un paper important en la síntesi de triglicèrids; *Fads1 (fatty acid desaturase 1)* regula la insaturació d'àcids grassos, sent important en la producció d'àcids grassos altament saturats a partir de poliinsaturats, podent generar àcid araquidònic i àcid eicosapentanoic; *Mcee (methylmalonyl CoA epimerase)*, implicat en la degradació d'àcids grassos amb un nombre de carbonis imparell; *Acox1 (acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl)* és el primer enzim en la via de  $\beta$ -oxidació, catalitzant la desaturació dels acil-CoAs a 2-trans-enoil-CoAs; *Prdx6 (peroxiredoxin 6)* té dos papers, com a regulador de la renovació de fosfolípids així com la protecció contra el dany oxidatiu; finalment, *Lcat (lecithin cholesterol acyltransferase)*, està implicat en l'esterificació del colesterol, important pel seu transport.

Dins del metabolisme glucídic, els gens majoritàriament estan reprimits. Destacar la repressió de *Slc37a4 (solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4)*, el qual transporta la glucosa-6-fosfat des del citoplasma al reticle endoplasmàtic. *Slc37a1* juntament amb la glucosa-6-fosfatasa formen el complex encarregat de produir glucosa a partir de les vies de gluconeogènesi i glicogenòlisi. Està acompanyat de la repressió de *H6pd (hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase))*, implicat en l'oxidació de glucosa-6-fosfat i glucosa, també oxida altres hexoses-6-fosfat. Finalment, *Ins1 (insulin 1)*, també està reprimat, encarregat de disminuir els nivells de glucosa a la sang, accelera a glicòlisi, el cicle de les pentoses fosfat i la síntesi de glicogen a fetge.

Pel que fa al metabolisme de xenobiòtics només hi ha dos gens, tots dos sobreexpressats: *Cyp4b1 (cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1)*, el qual metabolitza una sèrie de carcinògens; i *Adh5 (alcohol dehydrogenase 5)*, encarregat de metabolitzar per la seva eliminació formaldehid.

Dins del metabolisme energètic, hi ha bastants canvis a destacar. El primer d'ells, és la repressió de dues subunitats, *Sdhc* i *Sdhd*, que conformen el complex de la succinat

deshidrogenasa, conegut com Complex II mitocondrial, implicat en la transferència d'electrons del succinat a la ubiquinona. També hi ha una repressió de 3 subunitats de NADH:ubiquinona oxidoreductasa, anomenada Complex I mitocondrial. Aquest funciona en la transferència d'electrons de NADH a la cadena respiratòria mitocondrial, sent la ubiquinona l'acceptor d'aquests. Per altra banda, hi ha dos gens *Uqcrcq* (*ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII*) reprimits i *Uqcrfs1* (*ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1*), dins del Complex III o complex ubiquinol citocrom c reductasa, el qual catalitza la transferència d'electrons des de l'ubiquinol al citocrom c i utilitza l'energia per translocar protons de l'interior de la membrana interna mitocondrial a l'exterior. Finalment, hi ha dos gens *Atp5b* (*ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide*) reprimits, i *Atp5a1* (*ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle*) sobreexpressat, que són dos components de l'ATP sintasa mitocondrial que catalitza la síntesi d'ATP utilitzant el gradient electroquímic de protons a través de la membrana mitocondrial interna durant la fosforilació oxidativa. Tots dos gens formen part del cor catalític F1.

Per últim, dins del metabolisme de nucleòtids hi ha dos gens: *Uckl1\_predicted* (*uridine-cytidine kinase 1-like 1\_predicted*), el qual està sobreexpressat i està implicat en l'acumulació de UTPs; i *Upb1* (*ureidopropionase, beta*), reprimits i que està implicat en l'últim pas de la via de degradació de pirimidina.

Al Gràfic 19 es mostren els canvis del metabolisme proteic (groc).

Canvis d'expressió de gens que codifiquen per metabolisme proteic



Gràfic 19. Classificació de gens segons el metabolisme cel·lular en el qual estan implicats. ■ Metabolisme proteic.

Finalment, dins del metabolisme proteic, Gràfic 19, només es comentaran els gens que tenen com a mínim un 25% de repressió o sobreexpressió, o que estiguin relacionats entre ells i per tant aquest fet expliqui la seva modulació.

La síntesi de noves proteïnes és un procés altament regulat i que permet respostes cel·lulars ràpides a diferents tipus d'estímuls en absència de transcripció. El ritme de traducció es controla a 3 nivells diferents: iniciació, elongació i terminació. Encara que la regulació de la traducció principalment es fa a la iniciació. La iniciació de la traducció consisteix en diferents passos i és catalitzada per unes proteïnes conegudes com factors d'iniciació eucariòtica o eIFs. En aquesta categoria de regulació de la traducció hi ha una sèrie de gens reprimits: Eif3g (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G*), Eif3i (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I*), Eif3c (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C*) i Eef1g (*eukaryotic translation elongation factor 1 gamma*); i uns altres sobreexpressats: Eif4a1 (*eukaryotic translation initiation factor 4A1*), Eif3s6ip (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein*), LOC315661 (*similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2*), Eif4e2\_pred (*eukaryotic translation initiation factor 4E member 2\_predicted*), LOC364713 (*similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2*), LOC499224 (*similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2*) i Eef1a1 (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*). Els ribosomes són els orgànuls encarregats de catalitzar la síntesi de proteïnes i estan compostats de dues subunitats, 40S i 60S. Aquestes dues subunitats estan fetes de diferents proteïnes ribosomals. En aquest sentit, hi ha una sèrie d'elles que es troben reprimides: Rpl37 (*ribosomal protein L37*), Rpl32 (*ribosomal protein L32*), Rps4x (*ribosomal protein S4, X-linked*), Rpl23 (*ribosomal protein L23*), Rps7 (*ribosomal protein S7*), Mrps24 (*mitochondrial ribosomal protein S24*); mentre que només hi ha una sobreexpressada: Rps2 (*ribosomal protein S2*) i RGD1565509\_pred, LOC689668, RGD1562399\_pred, LOC688473 i RGD1560400\_pred que són similars a Rps2.

Dins del metabolisme proteic pren especial rellevància la degradació proteica via proteasoma, que s'encarrega de degradar les proteïnes que ja no siguin necessàries o que estiguin danyades. Les proteïnes per ser degradades han de ser marcades per una proteïna petita anomenada ubiquitina, procés que rep el nom d'ubiquitinació i que permet al proteasoma identificar-les i així poder degradar-les. La ubiquitinació es dona mitjançant l'enzim ubiquitina ligasa. El gens reprimits relacionats amb el procés de degradació proteica mitjançant el proteasoma són: Fbxo7 (*F-box protein 7*), Ubxn4 (*UBX domain protein 4*), Rbx1 (*ring-box 1*), Amfr (*autocrine motility factor receptor*), Skp1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), Usp9x\_pred (*ubiquitin specific peptidase 9, X-linked\_predicted*), Psmc6 (*proteasome (prosome,*

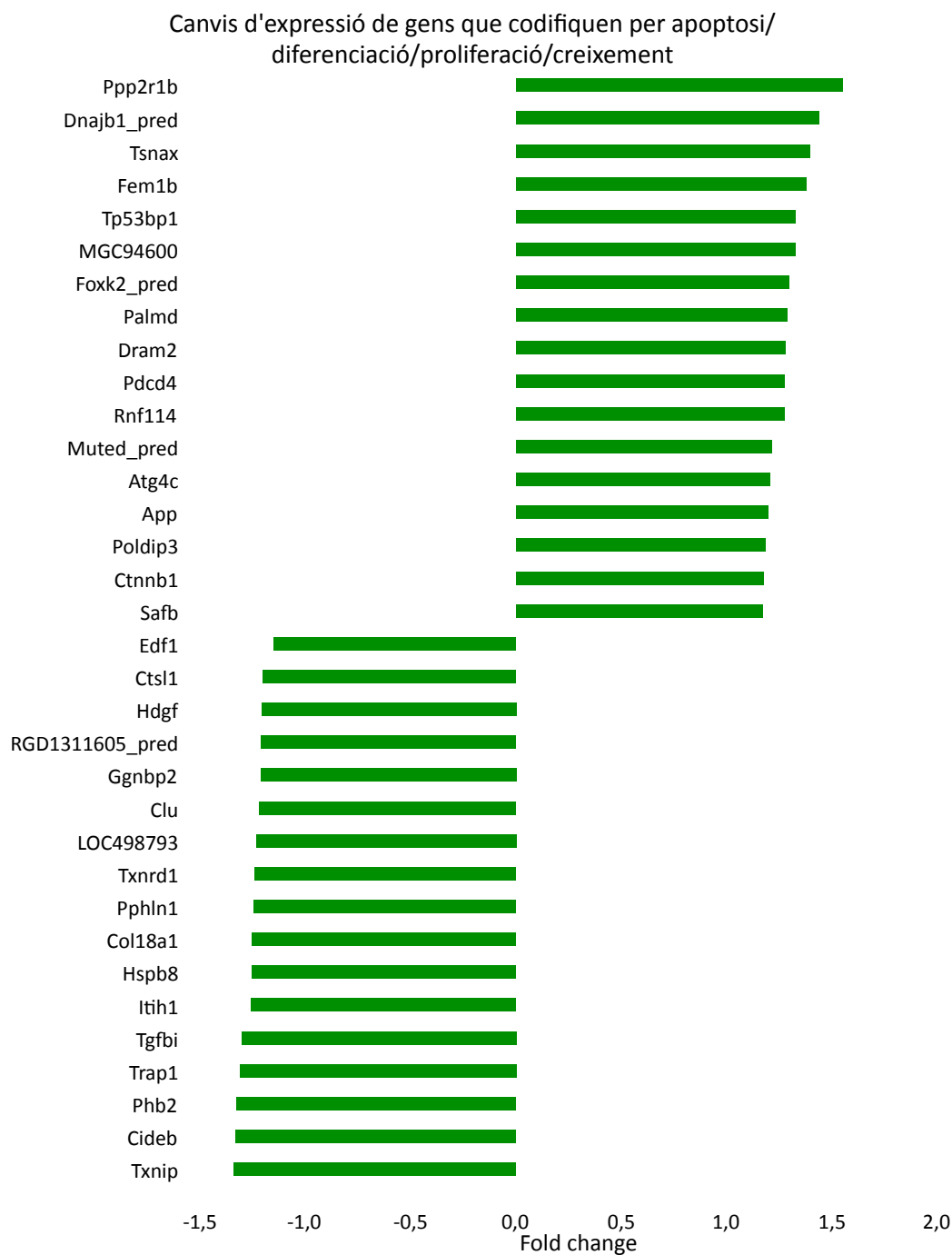
*macropain*) 26S subunit, ATPase, 6), Psm4 (*proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4*), Uba52 (*ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1*) i RGD1306148 (*similar to KIAA0368*). Hi ha quatre gens sobreexpressats: RGD1564425\_pred (*similar to Proteasome subunit beta type 3\_predicted*), Ube2d3 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)*), Wsb2 (*WD repeat and SOCS box-containing 2*) i Spsb2 (*SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2*). Dins de la degradació proteica també i hi ha Lonp1 (*lon peptidase 1, mitochondrial*), que es troba sobreexpressat. Aquest es requereix per la proteòlisi intramitocondrial.

Un altre grup de gens són els que estan relacionats amb la síntesi i degradació d'aminoàcids. Entre ells es troben reprimits Prodh2 (*proline dehydrogenase (oxidase) 2*), Anpep (*alanyl (membrane) aminopeptidase*), Bhmt2 (*betaine-homocysteine methyltransferase 2*), Dnpep (*aspartyl aminopeptidase*), LOC641316 (*similar to aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1*). Els que es troben sobreexpressats són: Lap3 (*leucine aminopeptidase 3*), Gatm (*glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)*), Got2 (*glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial*) i LOC314123 (*similar to Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor*).

Per acabar, Nags (*N-acetylglutamate synthase*), el qual es troba reprimat. Codifica per l'enzim encarregat de catalitzar la formació de N-acetilglutamat (NAG) a partir de glutamat i acetil-CoA. Aquest gen pot regular la ureagènesi mitjançant l'alteració de la disponibilitat de NAG.

Els canvis d'expressió en els gens implicats en la renovació cel·lular està dividit en dos gràfics: Gràfic 20 i 21. El Gràfic 20 mostra els gens implicats en l'apoptosi/desenvolupament/proliferació/creixement (verd).





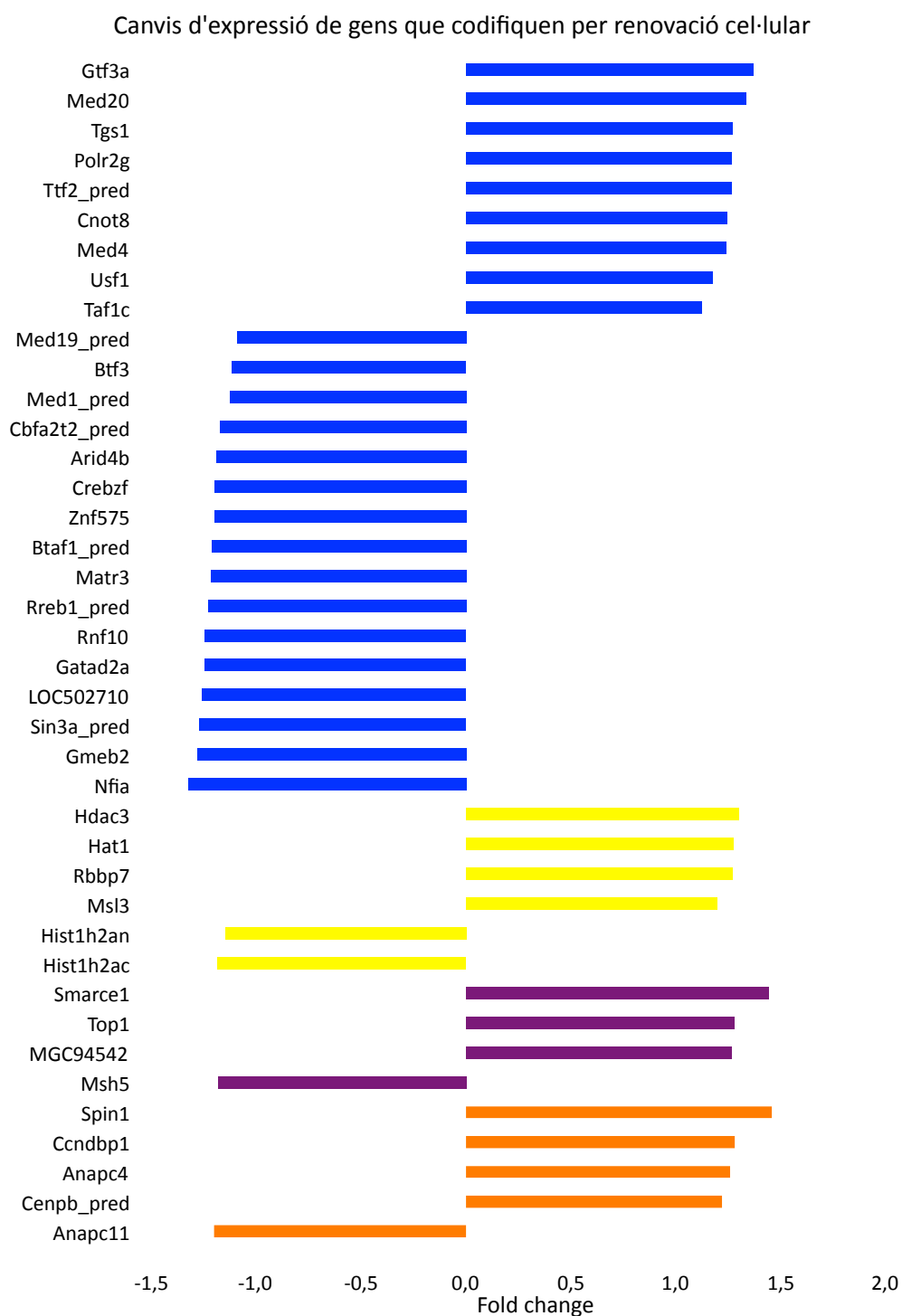
**Gràfic 20.** Classificació de gens involucrats en la renovació del cicle cel·lular. ■ Apoptosi/Desenvolupament/ Proliferació/Creixement.

Aquest grup mostra una distribució força equitativa dels gens que es troben sobreexpressats i els que es troben reprimits. Donat que hi ha un gran nombre de gens en aquest grup només es comentaran aquells que puguin ser rellevants segons el criteri propi. Alguns d'ells, al estar en comú amb la dosi crònica de 5 mg/kg ja han estat explicats anteriorment. El gen amb la sobreexpressió més forta és Ppp2r1b (*protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit*

A (*PR 65*), *beta isoform*), aquest gen també està significativament alterat per la dosi crònica de 5 mg/kg. En ordre decreixent hi ha *Dnajb1\_pred* (*dnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1*), pertanyent a la família de les *heat shock proteins* (HSP). Aquesta en concret estimula l'activitat ATPasa de Hsp70. Hi ha dues Hsps més, en aquest cas es troben reprimides, són: *Trap1* (*TNF receptor-associated protein 1*), una Hsp90 mitocondrial; i *Hspb8* (*heat shock protein B8*), la seva expressió està induïda per estrògens i està implicada en la regulació de la proliferació cel·lular, l'apoptosi i la carcinogènesi. Un altre gen implicat en l'apoptosi és *Fem1b* (*fem-1 homolog b (C. elegans)*), aquest actua com a receptor de mort. Un altre gen sobreexpressat destacable és *Tp53bp1* (*tumor protein p53 binding protein 1*), que incrementa l'activació transcripcional de *Tp53* i indueix l'expressió de *Ckd1a*, un inhibidor de ciclins dependents de quinasa, funcionant com a regulador de la progressió del cicle cel·lular a la fase G1. Per finalitzar amb els gens sobreexpressats, *Atg4c* (*ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)*), és un gen implicat en l'autofàgia. Aquest procés és essencial per l'homeòstasi i remodelació cel·lular durant la diferenciació, s'encarrega de la destrucció intracel·lular de proteïnes i orgànuls danyats.

Pel que fa als gens reprimits, el de major repressió és *Txnip* (*thioredoxin interacting protein*). Aquest és un mediador d'estrès oxidatiu mitjançant la inhibició de l'activitat tiorredoxina o limitant la seva biodisponibilitat, proteïna que funciona com antioxidant. També s'observa la repressió de *Txnrd1* (*thioredoxin reductase 1*), encarregat de mantenir la tiorredoxina en estat reduït. Hi ha una sèrie de gens implicats en l'apoptosi com *Cideb* (*cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B*), *Clu* (*clusterin*), *RGD1311605\_pred* (*similar to apoptosis related protein APR-3; p18 protein\_predicted*). Altres estan implicats en la diferenciació i proliferació cel·lular com *Col18a1* (*collagen, type XVIII, alpha 1*), *Pphln1* (*periphilin 1*), *Ggnbp2* (*gametogenetin binding protein 2*) i *Edf1* (*endothelial differentiation-related factor 1*).

El Gràfic 21 mostra els gens implicats en la regulació del cicle cel·lular (taronja), el processat del DNA (lila), histones/helicases/remodelació de la cromatina (groc) i la regulació de la transcripció (blau).



**Gràfic 21.** Classificació de gens involucrats en la renovació del cicle cel·lular. ■ Regulació del cicle cel·lular ■ Processat DNA ■ Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina ■ Regulació de la transcripció.

El cicle cel·lular és un conjunt ordenat de processos que condueixen al creixement de la cèl·lula i la seva posterior divisió en dues cèl·lules filles. Compta de diferents parts. La fase G1, on la cèl·lula duplica el seu tamany i augmenta el nombre d'òrgànuls, enzims i altres molècules; la

fase S, on es duplica el DNA i les proteïnes associades; la fase G2, procés on apareixen noves estructures necessàries per la divisió i s'inicia la condensació de la cromatina; la fase M agrupa la mitosi (repartiment del material genètic) i la citoquinesi (divisió del citoplasma). Si la cèl·lula no es troba en cicle cel·lular, vol dir que es troba en fase G0 o quiescent.

Pel que fa als gens inclosos en la regulació del cicle cel·lular, majoritàriament es troben sobreexpressats. Només hi ha un gen reprimat Anapc11 (*anaphase promoting complex subunit 11*), forma part del complex promotor de l'anafase, el qual controla la finalització de la mitosi i l'inici una altra vegada de la fase G1. Per contra, un altre gen d'aquest complex, Anapc4 (*anaphase promoting complex subunit 4*), és troba sobreexpressat. El gen amb la sobreexpressió més elevada és Spin1 (*spindlin 1*), està implicat en la regulació del cicle cel·lular durant la transició de gamet a embrió. Un altre gen implicat en la regulació de la progressió del cicle cel·lular és Ccnb1 (*cyclin D-type binding-protein 1*), en aquest cas un regulador negatiu, actuant en la inhibició del complex ciclina-D1/CDK4. Per últim, Cenpb\_pred (*centromere protein B\_predicted*), està relacionat amb facilitació de la formació del centròmer, responsable de realitzar i regular els moviments cromàtics durant la mitosi o la meiosi.

Dins del grup de processat de DNA, cal destacar la forta sobreexpressió de Smarce1 (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1*), està relacionat amb el complex SWI/SNF, capaç d'alterar la posició dels nucleosomes al llarg del DNA. Hi ha dos gens relacionats amb la reparació del DNA, Msh5 (*mutS homolog 5 (E. coli)*), el qual està reprimat i MGC94542 (*similar to RIKEN cDNA 5430437P03*), que es troba sobreexpressat. Finalment, Top1 (*topoisomerase (DNA) I*), gen que es troba sobreexpressat i actua sobre la topologia del DNA durant la transcripció.

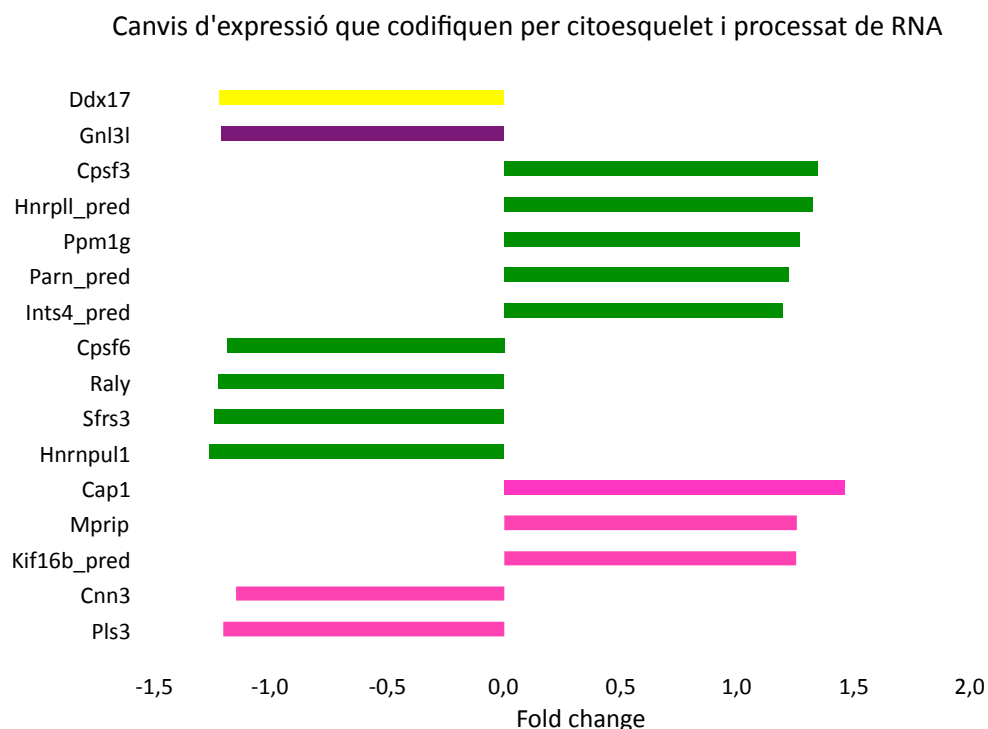
Pel que fa als gens de la següent agrupació, destacar que no hi ha canvis excessivament forts. Destacar la sobreexpressió de Hat1 (*histone acetyltransferase 1*) i Hdac3 (*histone deacetylase 3*), capaços de modificar les histones, proteïnes que juntament amb el DNA formen la cromatina. També hi ha dos gens sobreexpressats responsables de la regulació de la cromatina: Rbbp7 (*retinoblastoma binding protein 7*) i Msl3 (*male-specific lethal 3 homolog (Drosophila)*). Pel que fa als gens que es troben reprimats, hi ha dos que codifiquen per histones de la família H2A: Hist1h2ac (*histone cluster 1, H2ac*) i Hist1h2an (*histone cluster 1, H2an*).

L'últim grup el conformen els gens que estan relacionats amb la regulació de la transcripció. Donat que hi ha un gran nombre de gens i pràcticament tots ells són factors de transcripció o proteïnes reguladores de la transcripció, només es comentaran aquells amb una expressió més

marcada o que tinguin algun tipus de relació entre ells, argumentant d'aquesta manera els seus canvis d'expressió. La transcripció del DNA és el primer pas de l'expressió gènica, mitjançant el qual es transfereix la informació continguda en la seqüència de DNA cap a la seqüència de proteïna, utilitzant diversos tipus de RNA com a intermediaris. Es divideix principalment en 3 etapes: iniciació, elongació i terminació. El gen més fortament sobreexpressat és *Gtf3a* (*general transcription factor III A*), el qual funciona com a factor de transcripció de RNA polimerasa III, induint la transcripció dels rRNA 5s. Hi ha una sèrie de gens que codifiquen per components del complex mediador. Aquest complex és un gran complex proteic que actua com a coactivador transcripcional. Hi ha dos gens que es troben sobreexpressats: *Med20* (*mediator complex subunit 20*) i *Med4* (*mediator complex subunit 4*); i dos que es troben reprimits: *Med19\_pred* (*mediator complex subunit 19\_predicted*) i *Med1\_pred* (*mediator complex subunit 1\_predicted*). Un altre gen sobreexpressat és *Polr2g* (*polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G*), que és la subunitat més gran de la RNA polimerasa II, responsable de la síntesi RNA en eucariotes. La proteïna codificada funciona en la iniciació de la transcripció. *Ttf2\_pred* (*transcription termination factor, RNA polymerase II\_predicted*) actua com a factor de terminació de la transcripció.

El gen més fortament reprimat és *Nfia* (*nuclear factor I/A*), un factor de transcripció. Està seguit de *Gmeb2* (*glucocorticoid modulatory element binding protein 2*), factor que s'uneix als elements moduladors de glucocorticoides (GME) i incrementa la sensibilitat a baixes concentracions de glucocorticoides.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en el manteniment del citoesquelet i el processat de RNA es presenten al Gràfic 22, indicant en diferents colors la tipologia de classificació a la que pertanyen: citoesquelet (rosa), mRNA (verd), tRNA (taronja), rRNA (lila) i helicases de RNA (groc).



**Gràfic 22.** Classificació de gens involucrats en el manteniment del citoesquelet i el processat del RNA.  
 ■ Citoesquelet ■ mRNA ■ rRNA ■ Helicases RNA.

Del Gràfic 22 es desprèn que els principals canvis es troben en el processat de RNA missatger (mRNA). Dins del processat de mRNA hi ha tants gens sobreexpressats com reprimits. Hi ha dos gens implicats en el processat de pre-mRNA, encarregats de la poliadenilació. Tenen expressions oposades, *Cpsf6* (*cleavage and polyadenylation specific factor 6*) està reprimint, mentre que *Cpsf3* (*cleavage and polyadenylation specificity factor 3*) està fortament sobreexpressat. Un gen que també es troba sobreexpressat és *Parn\_pred* (*poly(A)-specific ribonuclease (deadenylation nuclease)\_predicted*) i està implicat en la degradació de les cues de poli(A) dels mRNAs. Hi ha un grup de gens que codifiquen per ribonucleoproteïnes i que estan implicades en el processat i transport del mRNA: *Hnrpll\_pred* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like*), que està sobreexpressada; i *Hnrnpul1* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1*) i *Raly* (*RNA binding protein, autoantigenic (hnRNP-associated with lethal yellow homolog (mouse))*) que estan reprimits. Després de la transcripció, els precursors eucariòtics del mRNA contenen introns i exons, la forma d'escindir els introns és mitjançant el spliceosoma. Relacionat amb això hi ha sobreexpressats el gens *Sfrs3* (*splicing factor, arginine/serine-rich 3*) i *Ppm1g* (*protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform*), un factor de splicing que desfosforila substrats específics requerits per la formació del spliceosoma.

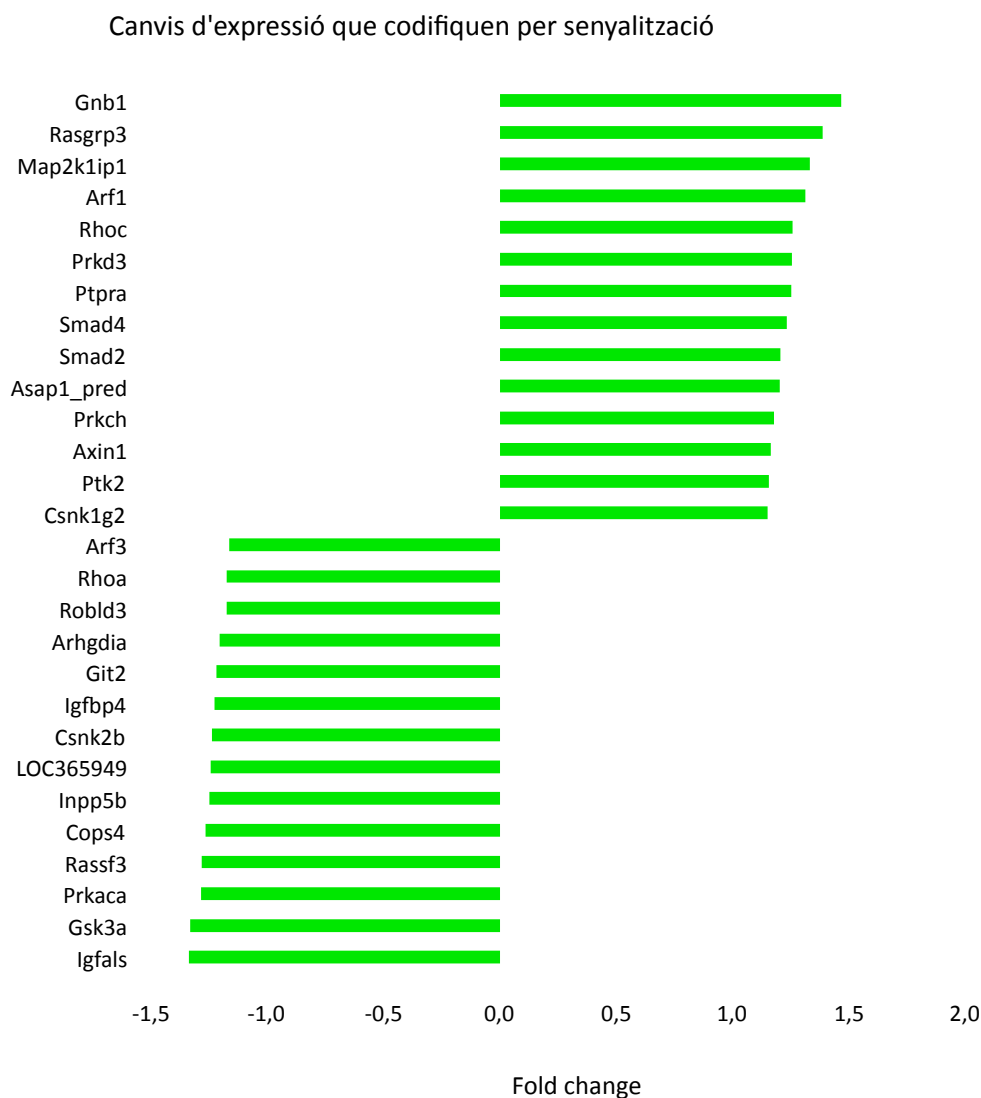
Pel que fa al processat de rRNA hi ha un únic gen, Gnl3l (*guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like*) i es requereix pel processat de pre-rRNA.

Finalment, només hi ha una helicasa de RNA afectada, Ddx17 (*DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17*).

Hi ha cinc gens involucrats en el manteniment del citoesquelet. El canvi més contundent és la sobreexpressió de Cap1 (*CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)*). La proteïna codificada regula l'organització del citoesquelet a través dels filaments d'actina i proteïnes associades. Els altres gens sobreexpressats són Kif16b\_pred (*kinesin family member 16B*) i Mprp (*myosin phosphatase Rho interacting protein*), regulador del citoesquelet d'actina.

Els dos gens reprimits són Pls3 (*plastin 3 (T-isoform)*), implicat en la regulació dels filaments d'actina durant processos dinàmics com la citoquinesi; i Cnn3 (*calponin 3, acidic*). La calponina és una proteïna tipus calmodulina que uneix la tropomiosina i la F-actina, i estaria implicada en la regulació de la contracció del múscul llis.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en la senyalització es presenten al Gràfic 23. És un grup bastant heterogeni ja que inclou diferents tipus de senyalització. Principalment inclou quinases, implicades en la fosforilació/desfosforilació, encara que també es poden trobar gens implicats en la transmissió de senyals per mitjà de la sinapsi.



**Gràfic 23.** Classificació de gens involucrats en diferents processos de senyalització. ■ Senyalització.

Del Gràfic 23 es desprèn que hi ha tants gens reprimits com sobreexpressats. No hi ha cap gen que superi el 50% de sobreexpressió o repressió.

Les proteïnes G són una família de proteïnes implicades en la transducció de senyals, portant la informació des d'un receptor fins a una o més proteïnes efectores. Aquesta família de proteïnes es caracteritza per la seva interacció amb GTP/GDP. Els receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) són receptors transmembrana. Les molècules senyalitzadores d'uneixen al seu domini extracel·lular i el domini intracel·lular activa les proteïnes G, les quals activen la cascada de senyalització. Hi ha una sèrie de gens relacionats amb les proteïnes G. El gen més sobreexpressat és Gnb1 (*guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1*) una proteïna G heterotrimèrica o gran i es situa anclada a la membrana tant en repòs com quan transmet la senyal. Hi ha també sobreexpressades dues proteïnes G petites o



monomèriques: Rhoc (*Ras homolog gene family, member C*), inactiva quan està unida a GDP i activa quan s'uneix a GTP; i Arf1 (*ADP-ribosylation factor 1*), també forma part de la família de les proteïnes Ras i és un activador de les fosfolipases D. El gen *Asap1\_pred (ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain)* és un activador de Arf1, Arf5 i amb menor activitat de Arf6. Un altre membre de la família Ras és *Rasgrp3 (RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated))*, és un activador de proteïnes Ras donat que promou l'adquisició de GTP per mantenir activa la seva unió. En sentit oposat, s'observa la repressió de dues proteïnes G monomèriques: Rhoa (*Ras homolog gene family, member A*) i Arf3 (*ADP-ribosylation factor 3*). També es troba reprimint *Rassf3 (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 3)*, proteïna d'unió a GTP per modular la transducció intracel·lular de vies de senyalització. Un altre gen reprimint és *Arhgdia (Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha)*, de la família de proteïnes Rho. Aquest inhibeix la dissociació de GDP, amb la qual cosa no és pot unir a GTP. Finalment, *Git2 (G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2)*, capaç d'interaccionar amb les quinases dels receptors acoblats a proteïnes G (GRKs), importants per la fosforilació i internalització del receptor.

Les proteïnes quinasa són quinases amb la capacitat de modificar altres proteïnes mitjançant l'addició de grups fosfat, és a dir, fosforilant-les, fet que modifica la funcionalitat de la proteïna fosforilada. Aquest fet els confereix la capacitat de regular la majoria de vies cel·lulars, especialment les que impliquen la transducció de senyals. Hi ha 3 proteïnes quinasa amb l'expressió dels gens que les codifiquen modificada, dues es troben sobreexpressades, *Prkd3 (protein kinase D3)* i *Prkch (protein kinase C, eta)*; i una reprimida, *Prkaca (protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha)*. Les proteïnes quinasa D (PKD) inicien la via de senyalització per mitjà de diacilglicerols (DAG) i la proteïna quinasa C (PKC), està implicada en gran diversitat de vies de senyalització cel·lular. L'activitat de *Prkch* és independent de calci i dependent de fosfolípids. *Prkaca* és una quinasa dependent de cAMP, i està implicada en la regulació del metabolisme de lípids i glucosa.

Hi ha dos gens que codifiquen per quinases que incrementen l'eficiència de la cascada de les MAP quinases i faciliten l'activació de MAPK2, un d'ells es troba sobreexpressat, *Map2k1ip1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1)* i l'altre es troba reprimint, *Robld3 (roadblock domain containing 3)*.

En aquesta mateixa situació es troben els gens *Csnk2b (casein kinase 2, beta subunit)*, reprimint i *Csnk1g2 (casein kinase 1, gamma 2)*, sobreexpressat. Són proteïnes que utilitzen preferentment la caseïna com a substrat. Participen en la regulació de la via de senyalització

de Wnt. Implicat en aquesta via hi ha Axin1 (*axin 1*); sembla ser que les axines són els components limitants de la via de senyalització de Wnt. És important destacar la repressió de Gsk3a (*glycogen synthase kinase 3 alpha*). Gsk3 és capaç de fosforilar gran diversitat de substrats, fet que li confereix gran importància en la regulació de la cascada de transducció de senyals. Gsk3 inactiva la glicogen sintasa mitjançant la seva fosforilació, i està implicat en el control de la resposta cel·lular després d'un dany en el DNA, esta també implicat en la via de senyalització de Wnt.

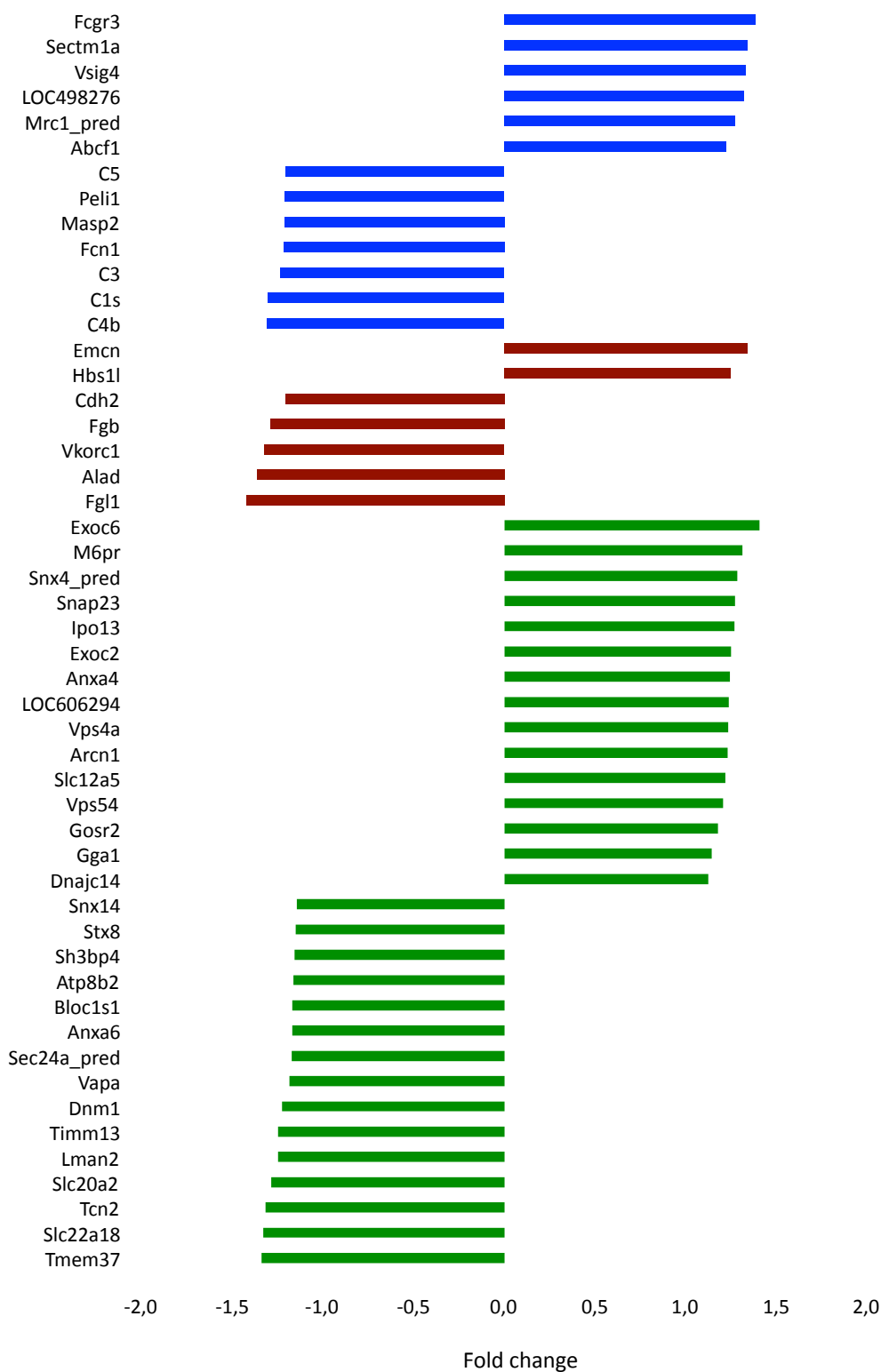
Entre altres mecanismes de regulació de la senyal hi ha la desfosforilació. Ptpya (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, A*) es troba sobreexpressat i està implicat en diferents processos com la regulació de l'adhesió cel·lular, la proliferació o la senyalització per mitjà de les integrines. Una altre fosfatasa és Inpp5b (*inositol polyphosphate-5-phosphatase B*), es troba reprimida, i catalitza la conversió de inositol-1,4,5- trifosfat (IP3) a inositol-1,2-bisfosfat (IP2). IP3 és un segon missatger encarregat de la transducció de senyals i es produeix conjuntament amb DAG per la hidròlisi de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2), un fosfolípid de membrana. La seva principal funció és la mobilització de calci i que aquest pugui desenvolupar les seves funcions.

S'observa la sobreexpressió tant de Smad2 (*SMAD family member 2*) com de Smad4 (*SMAD family member 4*). Les proteïnes codificades per aquests gens promouen la senyal del factor de creixement transformant TGF $\beta$ , fet que regula diferents processos cel·lulars com la proliferació i diferenciació cel·lular, així com l'apoptosi.

Finalment, s'observa la repressió de Igfbp3 (*insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit*) i Igfbp4 (*insulin-like growth factor binding protein 4*). Les proteïnes codificades per aquests gens s'uneixen a factors de creixement d'insulina (IGFs) incrementant la seva vida mitja, els quals estan implicats en el creixement i desenvolupament cel·lular.

Els canvis d'expressió que es presenten al Gràfic 24 engloben el transport (verd), la homeòstasi sanguínia (grana) i la resposta immunitària (blau).

Canvis d'expressió que codifiquen per transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària



**Gràfic 24.** Classificació de gens involucrats en el transport cel·lular, gens involucrats en la homeòstasi sanguínia i gens involucrats en la resposta immunitària. ■ Transport ■ Homeòstasi sanguínia ■ Resposta immunitària.

Dins del transport, es troben inclosos gens implicats en el transport de ions, transport de proteïnes així com el transport de metabòlits entre nucli i citoplasma. Hi ha una distribució força uniforme entre gens reprimits i gens sobreexpressats. Pel que fa als gens que es troben reprimits, hi ha tres amb una repressió superior al 30%, aquests són en ordre decreixent: Tmem37 (*transmembrane protein 37*), un estabilitzador de canals de calci; Slc22a18 (*solute carrier family 22, member 18*), capaç de transportar cations orgànics acoblat a un eflux de protons mitjançant un mecanisme antiport; i Tcn2 (*transcobalamin 2*), codifica per una proteïna capaç d'unir-se a la cobalamina i mediar el seu transport fins a les cèl·lules. Altres gens amb una repressió més suau però superior al 20% són Slc20a2 (*solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2*), implicat en el transport de fòsfat necessari per realitzar diferents funcions cel·lulars; Lman2 (*lectin, mannose-binding 2*), implicat en el transport de glicoproteïnes entre el reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi i la membrana plasmàtica; Timm13 (*translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)*), involucrat en l'import i inserció de proteïnes transmembrana a la membrana mitocondrial interna; i Dnm1 (*dynamitin 1*), implicat en l'endocitosi mediada per clatrina, a més d'estar implicat en altres processos de tràfic vesicular.

Pel que fa als gens sobreexpressats, hi ha dos components del complex exocist, implicat en l'acoblament de vesícules amb la membrana plasmàtica, Exoc6 (*exocyst complex component 6*) i Exoc2 (*exocyst complex component 2*). També implicat en l'ancoratge i ensamblatge de vesícules a la membrana hi ha Snap23 (*synaptosomal-associated protein 23*). Un altre gen força reprimat és M6pr (*mannose-6-phosphate receptor, cation dependent*), implicat en el transport lisosomal. Hi ha dos gens implicats en el transport entre endosoma i aparell de Golgi: Snx4\_pred (*sorting nexin 4\_predicted*) i Vps54 (*vacuolar protein sorting 54 homolog (S. cerevisiae)*). Per acabar aquest grup, hi ha una sèrie de gens que codifiquen per transportadors de proteïnes com Ipo13 (*importin 13*), implicada en l'import de proteïnes des del citoplasma al nucli de forma dependent al sistema GTPasa; Dnajc14 (*dnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 14*), involucrada en el transport de proteïnes des del reticle endoplasmàtic a la superfície cel·lular; Gga1 (*Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1*), que permet el transport de proteïnes entre l'aparell de Golgi i els lisosomes; Gosr2 (*Golgi SNAP receptor complex member 2*), el qual permet el transport entre els diferents compartiments de l'aparell de Golgi.

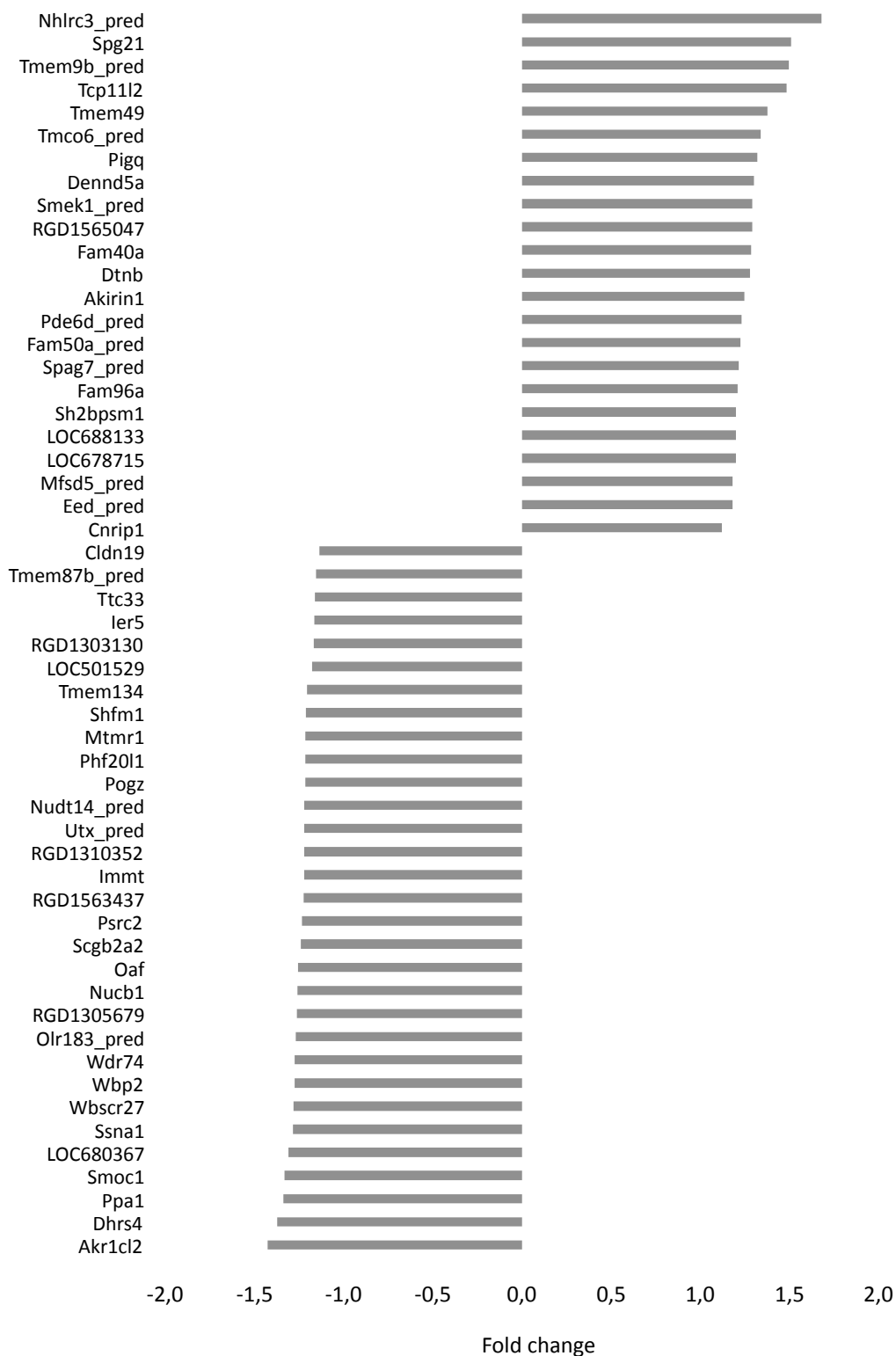
Pel que fa a l'homeòstasi sanguínea, el gen que pateix la sobreexpressió més marcada és Emcn (*endomucin*). Aquest gen interfereix amb l'ensamblatge de complexos d'adhesió focal de manera que inhibeix la interacció entre cèl·lules i la matriu extracel·lular. L'altre gen

sobreexpressat és Hbs1l (*Hbs1-like (S. cerevisiae)*) i podria estar implicat en el control dels nivells d'hemoglobina. Pel que fa als gens que es troben reprimits, Fgl1 (*fibrinogen-like 1*) és el que experimenta la repressió més forta. Forma part de la família del fibrinogen, encara que no posseix la capacitat de la formació del coàgul de fibrina. Sembla ser que té capacitat mitogènica i podria estar implicat en el desenvolupament d'hepatocarcinomes. Un altre gen reprimat és Fgb (*fibrinogen beta chain*), component del fibrinogen, en aquest cas sí que té capacitat per la formació del coàgul. Relacionat amb la formació del coàgul sanguini hi ha Vkorc1 (*vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1*), implicat en el metabolisme de la vitamina K, essencial per la coagulació. L'altre gen força reprimat és Alad (*aminolevulinate, delta-, dehydratase*), implicat en la catàlisi de porfobilinogen, precursor del grup hemo, citocroms i altres hemoproteïnes. Finalment, Cdh2 (*cadherin 2*), involucrat en l'adhesió cel·lular, fet important a l'hora de la formació dels vasos sanguinis.

L'últim grup d'aquesta categoria són els gens relacionats amb la resposta immunitària. També aquí s'observa una repressió generalitzada dels gens relacionats amb la via del complement: C4b (*complement component 4B (Childo blood group)*), C1s (*complement component 1, s subcomponent*), C3 (*complement component 3*) i C5 (*complement component 5*). També és important en l'activació de la via del complement Masp2 (*mannan-binding lectin serine peptidase 2*), el qual dona lloc a la formació de la convertasa C3. Per últim, la repressió de Peli1 (*pellino 1*), el qual seria requerit per l'activació de NfκB i l'expressió gènica de IL-8 en resposta a IL-1. Pel que fa als gens que es troben sobreexpressats, Fcgr3 (*Fc receptor, IgG, low affinity III*), és el que experimenta una sobreexpressió més elevada. Pertany a la família de receptors de les immunoglobulines gamma (IgG). La seva funció és eliminar complexos immunes de la circulació sense l'activació dels neutròfils. Un gen amb funció similar és LOC498276 (*Fc gamma receptor II beta*), implicat en la fagocitosi de complexos immunes per modular la producció d'anticossos per les cèl·lules immunològiques. Un altre gen implicat en la fagocitosi és Vsig4 (*v-set and immunoglobulin domain containing 4*). Aquest regula negativament la proliferació de cèl·lules T i IL-2, a més d'inhibir la via alternativa del complement.

L'última subclassificació, mostrada al Gràfic 25, són els gens que no han estat associats a cap de les anteriors subclassificacions degut a que encara no es coneix la funció que desenvolupa cada un d'ells dins la cèl·lula. Tots ells colorejats en gris.

Canvis d'expressió de gens que codifiquen per altres



Gràfic 25. Classificació de gens que no han estat associats a cap de les classificacions anteriors. ■ Altres.

4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per tal d'integrar la informació dels canvis d'expressió que s'ha descrit fins ara, com ja s'ha dit anteriorment, s'ha fet servir el programa MetaCore. Com a resultats ens indica en primer lloc que les 10 vies metabòliques i els 10 processos cel·lulars més afectats pel tractament crònic amb 25 mg/kg de GSPE són els indicats a la Taula 18. Els símbols que apareixen a les figures del MetaCore estan detallats a l'Annex 3.

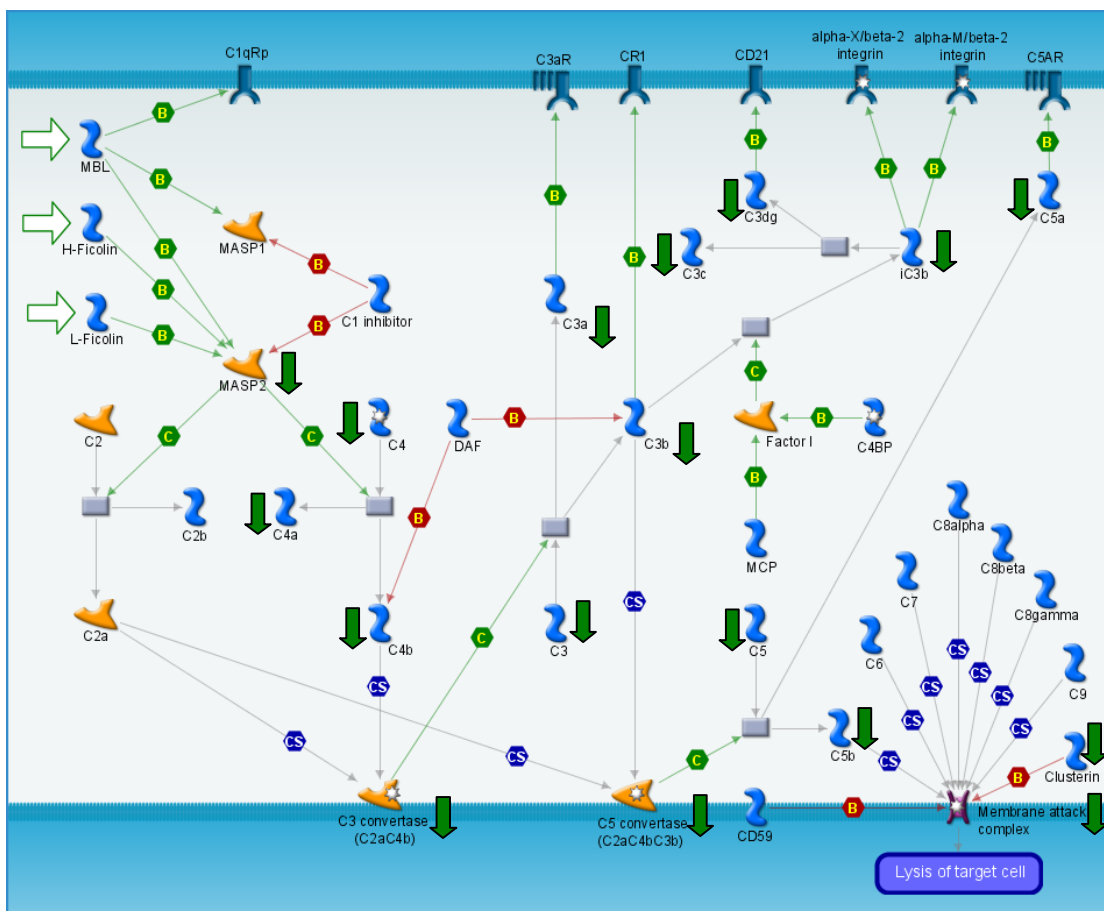
Vies metabòliques	Processos cel·lulars
Immune response_Lectin induced complement pathway	Inflammation_Complement system
Immune response_Classical complement pathway	Translation_Translation initiation
Immune response_Alternative complement pathway	Signal transduction_WNT signaling
Regulation of lipid metabolism_Stimulation of Arachidonic acid production by ACM receptors	Protein folding_Response to unfolded proteins
Oxidative phosphorylation	Translation_Regulation of initiation
Transcription_Ligand-Dependent Transcription of Retinoid-Target genes	Inflammation_Kallikrein-kinin system
Normal and pathological TGF-beta-mediated regulation of cell proliferation	Translation_Elongation-Termination
Signal transduction_Activin A signaling regulation	Protein folding_Folding in normal condition
G-protein signaling_RhoA regulation pathway	Cell adhesion_Cadherins
Regulation of CFTR activity (norm and CF)	Signal Transduction_TGF-beta, GDF and Activin signaling

**Taula 18.** Vies metabòliques i processos cel·lulars més afectats pel tractament agut de 25 mg GSPE/kg pes corporal.

Cal destacar que les 3 primeres vies metabòliques coincideixen amb les 3 primeres vies del tractament crònic amb 5 mg/kg de GSPE.

La Figura 14 mostra la via del complement induïda per lectines. Com s'ha comentat anteriorment, el sistema del complement és el major efector de la resposta immunitària innata humoral, protegint a l'hoste de microorganismes tals com les bacteries. Els components de la via del complement estan designats numèricament: C1 – C9. Els pèptids formats durant l'activació es designen mitjançant lletres en minúscula [145, 146]. Normalment, el fragment petit resultant del tall o escisió s'anomena "a", i el fragment més gran s'anomena "b", ex. C3a C3b.

Les lectines, tals com la ficolina 3 (*H-Ficolin*), la ficolina 2 (*L-Ficolin*) o la proteïna d'unió a manosa (MBL) són proteïnes que reconeixen i s'uneixen a carbohidrats diana presents a la superfície dels patògens [156].



**Figura 14.** Canvis en la resposta immunitària segons el programa MetaCore en rates tractades amb la dosi crònica de 25 mg GSPE/kg pes corporal. Aquesta figura correspon a la via del complement induïda per lectina.

La via de les lectines, de la mateixa manera que la via alternativa del complement s'activa sense la necessitat de la presència d'anticossos. La via de les lectines s'activa mitjançant una proteïna d'unió a mannanosa que detecta residus d'aquest sucre a la superfície dels microorganismes [157]. MBL és una proteïna de fase aguda produïda durant la resposta inflammatòria. Una vegada s'ha unit a la superfície de la cèl·lula o patògen, hi ha una interacció física amb les esterases MASP1 i MASP2 (*mannan-binding lectin serine peptidase 1 and 2*) [158]. Aquest complex inicia el tall i l'activació de C4 i C2, donant lloc a la convertasa C3. Aquesta talla C3, el qual juga un paper central en l'activació del sistema del complement. El seu processament per la convertasa C3 és la reacció central tant en la via clàssica com en la via alternativa. Aquest fet representa un mecanisme de defensa innata molt important comparable a la via alternativa del complement [159, 160].

Les diferents vies del complement, clàssica, alternativa o de les lectines, porta a la producció de la convertasa C5 activa [161]. La seqüència d'aquesta convertasa acaba amb la formació de l'estructura macromolecular anomenada Complex d'atac a la membrana. Aquest complex crea porus a la membrana que permeten el pas de ions i aigua, això crea un desbalanç osmòtic que



causa la lisi cel·lular [162]. L'últim pas de l'activació del complement està controlat per CD59 (*membrane-associated complement regulatory protein*). Aquest no permet la formació del complex d'atac a la membrana en l'últim pas de la via [163, 164]. Un altre punt que interfereix en la formació d'aquest complex és la proteïna plasmàtica reguladora Clusterina (CLU) [165].

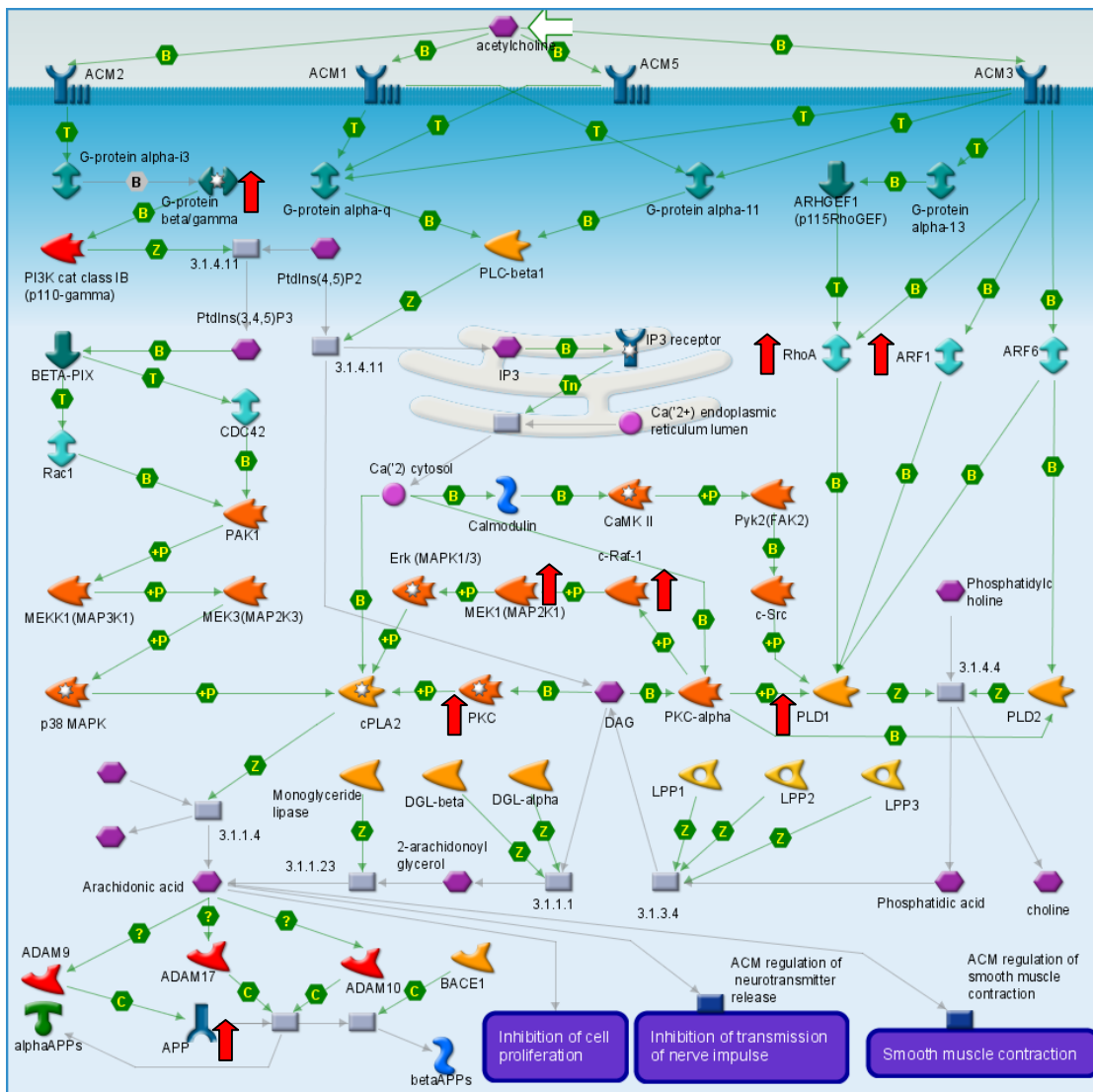
Existeixen una sèrie de treballs on s'ha demostrat l'efecte de diferents flavonoides sobre el sistema del complement, bàsicament en la via clàssica i en la via alternativa, però cap d'ells en la via del complement induïda per les lectines [166-168]. Aquest treball podria ser uns dels primers a tractar sobre aquest fet, posant de manifest el poder d'un extracte de proantocianidines de pinyol de raïm sobre la inhibició de la via del complement induïda per les lectines.

L'àcid araquidònic és un àcid gras poliinsaturat que es troba present en els fosfolípids (principalment en la fosfatililetanolamina i fosfatidilcolina) de les membranes cel·lulars, i es troba de forma abundant als músculs i al cervell. L'àcid araquidònic a més, està implicat en la senyalització cel·lular com a segon missatger, involucrat en la regulació d'enzims senyalitzadors com diferents isoformes de la fosfolipasa C (PLC), diferents isoformes de la proteïna quinasa C (PKC), així com també és un intermediari en el procés d'inflamació.

L'estimulació de la producció d'àcid araquidònic (Figura 15) es pot fer via els receptors colinèrgics muscarínics (ACM). Els receptors muscarínics tenen gran diversitat d'efectes mitjançant la unió d'acetilcolina, influenciant d'aquesta manera el sistema nerviós central i perifèric.

Aquests receptors ACM participen en la via de senyalització de l'àcid araquidònic mitjançant la fosfolipasa A2 (PLA2) [169] i la fosfolipasa D (PLD) [170].

Una de les vies d'activació de l'àcid araquidònic és mitjançant ACM2, que iniciaria la cascada de senyalització a través del complex de la proteïna G beta/gamma, subunitat de la proteïna G heterotrimèrica que consisteix en aquest complex més la subunitat alfa [171]. Els receptors ACM3 i probablement ACM1 podrien induir la síntesi d'àcid araquidònic mitjançant l'activació de cPLA2. ACM3 pren part en l'activació de PLD1 per dues vies, interaccionant directa o indirectament amb RhoA i incrementant d'aquesta manera la seva activitat [172]; o mitjançant la unió a ARF1 [173]. PLD1 actua sobre la fosfatililcolina produint àcid fosfatídic i colina que acabarà sent convertit a diacilglicerol (DAG). Al seu torn, DAG activa PKC que un cop activada és capaç de fosforilar cPLA2, amb la conseqüent producció d'àcid araquidònic [169].



**Figura 15.** Canvis en el metabolisme lipídic segons el programa MetaCore en rates tractades amb la dosi crònica de 25 mg GSPE/kg pes corporal. Aquesta figura correspon a la regulació del metabolisme lipídic estimulada per la producció d'acid araquidònic.

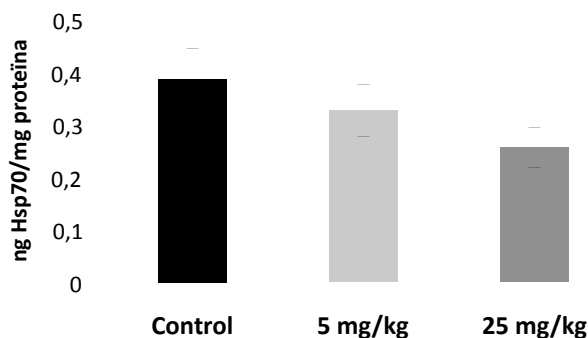
L'acid araquidònic pot influenciar la secreció del precursor de la proteïna amiloide beta [174]. La proteïna amiloide beta és el principal component de les plaques senils al teixit cerebral i per tant pren especial rellevància en la modulació de la malaltia d'Alzheimer [175]. La producció de proteïna amiloide beta necessita el tall d'APP per desencadenar la cascada d'events d'aquesta malaltia. En aquest cas però, no s'observa cap canvi de les proteases responsables d'aquest fet.

#### 4.2.2. Marcadors hepàtics

##### 4.2.2.1. Hsp70

Tenint en compte els efectes observats sobre la quantitat de Hsp70 a fetge després del tractament agut de 250 mg/kg de proantocianidines de pinyol de raïm, es procedeix a la seva determinació als fetges de les rates que han estat sotmeses a un tractament crònic de 5 o 25 mg/kg d'aquestes mateixes proantocianidines.

Al Gràfic 26, s'observa una repressió depenent de la dosi, encara que en cap dels dos casos és significativa. Per la dosi de 5 mg/kg aplicant un test de la t de Student el p-valor és 0,154 i per la dosi moderada de 25 mg/kg el p-valor és 0,096. Si pel contrari s'aplica una ANOVA d'un factor i aplicant una comparació *post hoc* LSD, comparant els 3 grups entre ells, control, 5 i 25 mg/kg, el p-valor del grup de 25 mg/kg respecte al control és de 0,057.



**Gràfic 26.** Efecte del tractament crònic amb GSPE (5 i 25 mg/kg) sobre la concentració de Hsp70 a fetge. Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM (n=10). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents comparant el grup tractat respecte al control en tots dos casos, \*p<0,05.

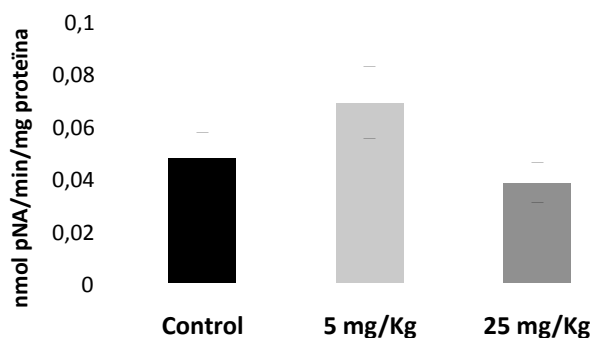
A diferència d'altres paràmetres estudiats, sembla haver-hi un efecte depenent de la dosi. En aquest cas, la dosi moderada de 25 mg/kg fa que els nivells de Hsp70 a fetge siguin menors que per la dosi baixa de 5 mg/kg.

##### 4.2.2.2. Caspasa 3

Continuant en la mateixa línia d'estudi de la capacitat proapoptòtica de les proantocianidines, en aquest experiment crònic es va determinar l'activitat de la caspasa 3 a fetge. En aquest cas no es pot determinar la quantitat de citocrom c degut a que s'ha de fer amb teixit fresc i actualment no es disposa d'aquestes mostres. No obstant, la quantificació de l'activitat caspasa 3 és un indicador vàlid d'apoptosi.

El Gràfic 27 mostra els efectes de les proantocianidines sobre l'activitat caspasa 3 a fetge. S'observa un efecte contrari amb les dues dosis. Mentre que la dosi baixa, 5 mg/kg provoca un

augment de l'activitat caspasa 3, resultat en principi esperable donat que tots els resultats estan apuntant a una inducció de l'apoptosi, la dosi moderada, 25 mg/kg, no causa el mateix efecte provocant la inhibició de l'activitat caspasa 3. Cal destacar però, que en cap dels dos casos, els valors són significatius. Per la dosi baixa té un p-valor de 0,378, i per la dosi moderada el p-valor és 0,098. Si s'aplica una ANOVA d'un factor amb LSD com a comparació *post hoc*, el p-valor de la dosi moderada baixa fins a 0,074, que està per sobre de  $p < 0,05$ .



**Gràfic 27.** Efecte del tractament crònic amb GSPE (5 i 25 mg/kg) sobre la concentració de caspasa 3 a fetge. Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM (n=10). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents comparant el grup tractat respecte al control en tots dos casos, \* $p < 0,05$ .

D'aquests resultats es pot concloure que les proantocianidines afecten de manera diferent en funció de la dosi de proantocianidines que s'utilitza, no observant-se un efecte dosi-depenent. En aquest cas, la dosi baixa de 5 mg/kg augmenta l'activitat de la caspasa 3 respecte al control, mentre que la dosi moderada de 25 mg/kg disminueix aquesta activitat.

#### 4.2.2.3. Comprovació mitjançant expressió gènica de la via d'apoptosi intrínseca a la mitocòndria

D'igual manera al tractament agut, es va comprovar per PCR a temps real l'expressió gènica d'alguns dels gens que codifiquen per algunes proteïnes implicades en la via de l'apoptosi. Aquests gens són Apaf1 (*apoptosis protease-activating factor-1*), Casp3 (*caspase 3*), Bcl2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) i Bax (*Bcl2-associated X protein*). Els resultats es mostren a la Taula 19.

A diferència del tractament agut, no hi ha cap efecte sobre l'expressió gènica.

És interessant destacar que l'expressió gènica de la caspasa 3, extreta de l'array de la dosi baixa, té un valor de sobreexpressió de 1,434, més d'un 40% i amb un p-valor de 0,037, resultat que concorda amb els nivells d'activitat. La dosi de 5 mg/kg provocava un augment de l'activitat caspasa 3 a fetge. En el moment de confirmar aquests valors mitjançant una PCR

quantitativa, el resultat no és significatiu, encara que s'observa una lleugera sobreexpressió d'aquest gen.

Es pot concloure que l'efecte de les proantocianides de pinyol de raïm sobre l'expressió d'aquests gens implicats en la via intrínseca a la mitocondria, depèn de la dosi emprada.

Gens	Control	5 mg/kg	25 mg/kg
Apaf1	1,007 ± 0,040	1,033 ± 0,044	1,114 ± 0,138
Casp3	1,007 ± 0,040	1,117 ± 0,033	1,038 ± 0,039
Bcl2	1,009 ± 0,045	0,982 ± 0,035	0,973 ± 0,064
Bax	1,006 ± 0,036	1,103 ± 0,058	1,001 ± 0,053

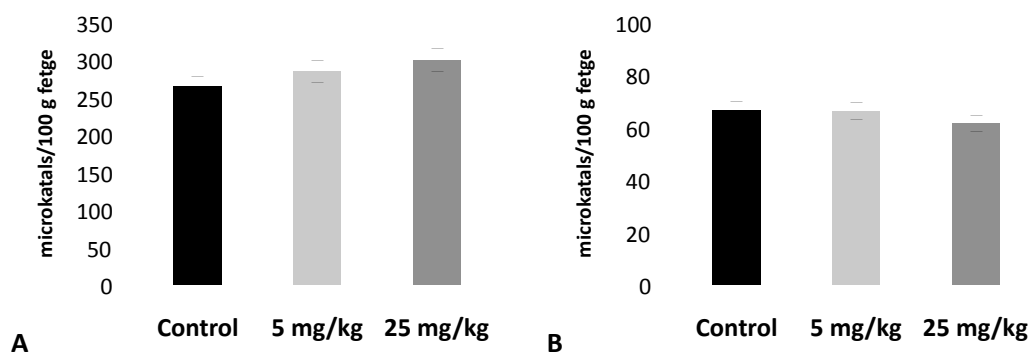
**Taula 19.** Efecte del tractament crònic GSPE (5 i 25 mg/kg) sobre els nivells de mRNA a fetge de diferents gens. Els resultats mostren la mitjana ± SEM (n=10). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents comparant el grup tractat respecte al control en ambdós casos, \*p<0,05.

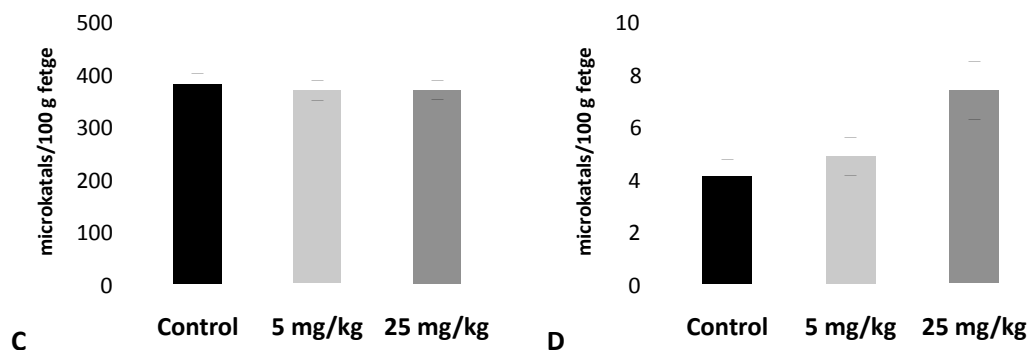
#### 4.2.2.4. Activitats enzimàtiques

En aquest experiment crònic també es determinaran les activitats enzimàtiques glutamat oxalacetat transaminasa (GOT), glutamat piruvat transaminasa (GPT), glutamat deshidrogenasa (GDH) i glutamina sintetasa (GS) per determinar si l'efecte de les proantocianidines de pinyol de raïm és dependent de la dosi i del temps de tractament.

Tal com mostra el Gràfic 28, en cap de les activitats mesurades s'observen canvis significatius, el mateix que succeïa amb el tractament agut. De totes maneres, destacar que hi ha una tendència a l'augment de l'activitat GOT dependent de la dosi. La dosi de 25 mg/kg té un p-valor de 0,099. També sembla haver un efecte dosi dependent sobre l'activitat glutamina sintetasa, en aquest cas també va en augment. El p-valor per la dosi de 25 mg/kg és de 0,056, al límit de la significativitat.

Hom pot concloure que l'efecte sobre les activitats enzimàtiques estudiades varia en funció de la dosi emprada i el temps de tractament, encara que els canvis no són significatius a les dosis i temps utilitzats.





**Gràfic 28.** Efecte del tractament crònic amb GSPE (5 i 25 mg/kg) sobre diferents activitats enzimàtiques. **A.** Glutamat oxalacetat transaminasa (GOT). **B.** Glutamat piruvat transaminasa GPT. **C.** Glutamat deshidrogenasa (GDH). **D.** Glutamina sintetasa (GS). Els resultats mostren la mitjana  $\pm$  SEM (n=10). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents comparant el grup tractat respecte al control en tots els casos, \*p<0,05.

#### 4.2.3. Marcadors plasmàtics

Pel que fa als paràmetres plasmàtics, s'han quantificat els mateixos que en l'experiment agut per poder comparar si els efectes sobre aquests varien en funció de la dosi i el temps de tractament. La Taula 20 mostra els resultats obtinguts.

Pel que fa als nivells plasmàtics de glucosa, de la mateixa manera que passava amb l'experiment agut, no es veu afectada pel tractament amb proantocianidines.

El triglicèrids plasmàtics si que es troben afectats pel tractament amb proantocianidines. Amb el tractament de 25 mg/kg estan afectats en el mateix sentit que el tractament agut, experimentant una marcada repressió dels nivells circulants. En canvi, amb la dosi baixa, sembla passar tot el contrari, s'observa un augment, encara que no és significatiu.

Els nivells de colesterol tampoc es veuen modificats, encara que s'observa una lleu repressió amb la dosi de 25 mg/kg (p=0,110).

Pel que fa als àcids grassos lliures, no s'observa cap efecte. Per contra, amb la dosi aguda hi havia una augment de la seva concentració després de 5 hores de tractament agut.

El  $\beta$ -hidroxibutirat augmenta amb les dues dosis, sent significativa amb el tractament de 25 mg/kg, té una p=0,049. Encara que la dosi de 5 mg/kg no afecta de forma significativa, té una p=0,087. L'efecte en aquest cas seria dependent de la dosi. En el tractament agut es podia apreciar un lleu augment de la seva concentració després de 5 hores de tractament encara que no de forma significativa.

#### 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Pel que fa al glicerol plasmàtic, el tractament crònic no afecta als nivells circulants amb cap de les dues dosis. Per contra, el tractament agut si que afectava de forma significativa a 1 i 5 hores de tractament.

En aquest cas el lactat es troba clarament afectat pel tractament de proantocianidines, tenint el mateix efecte les dues dosis. El tractament agut no induïa cap efecte.

Finalment, no s'observa cap efecte sobre els nivells plasmàtics d'urea. El tractament agut tenia efecte a les 5 hores.

Paràmetres plasmàtics	Control	5 mg/kg	25 mg/kg
Glucosa (mg/dl)	111,68 ± 7,75	102,54 ± 3,58	106,50 ± 3,00
Triglicèrids (mg/dl)	189,74 ± 15,11	222,35 ± 35,60	<b>136,31 ± 17,17*</b>
Colesterol (mg/dl)	29,58 ± 2,45	27,18 ± 1,80	23,78 ± 2,30
Àcids Grassos Lliures (mg/dl)	27,53 ± 2,09	27,39 ± 1,65	24,64 ± 2,61
β-Hidroxibutirat (mg/dl)	16,43 ± 3,22	24,77 ± 3,25	<b>28,23 ± 4,59*</b>
Glicerol (mg/l)	14,42 ± 0,96	12,28 ± 1,49	11,59 ± 1,12
Lactat (mM)	1,41 ± 0,04	<b>1,23 ± 0,05*</b>	<b>1,24 ± 0,06*</b>
Urea (mg/dl)	27,09 ± 1,21	26,45 ± 1,41	29,36 ± 2,08

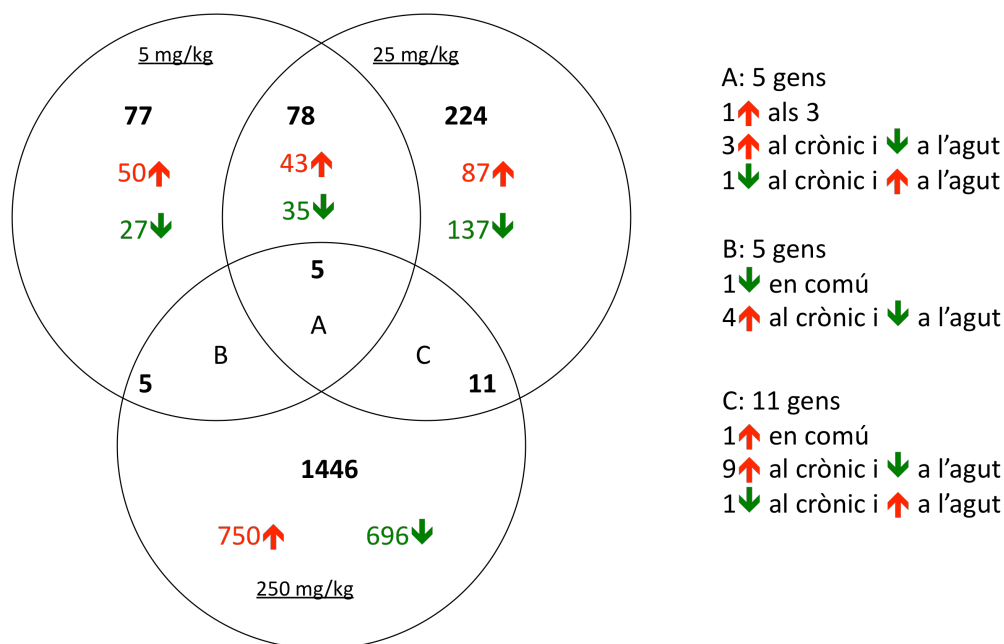
**Taula 20.** Efecte del tractament crònic amb GSPE (5 i 25 mg/kg) sobre paràmetres plasmàtics. Els resultats mostren la mitjana ± SEM (n=10). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents comparant el grup tractat respecte al control en ambdós casos, \*p<0,05.

És pot concloure que el nivell d'efecte sobre els paràmetres plasmàtics estudiats, depèn en gran mesura de la dosi i els temps de tractament. És interessant destacar que encara que l'efecte sigui significatiu en l'experiment agut i no en el crònic, o a la inversa, la tendència és la mateixa. D'aquí és pot extreure que les proantocianidines de pinyol de raïm exerceixen el mateix efecte, encara que la intensitat d'aquest varia en funció de la dosi i el temps de tractament.

#### 4.3. Identificació de gens diana de proantocianidines a partir dels estudis *in vivo*

Els diagrames de Venn s'utilitzen per comparar llistes de gens que s'expressen diferencialment. En aquest cas, l'objectiu de la utilització d'aquests diagrames és veure dels gens que estan alterats de forma significativa, quins estan afectats per més d'un dels tractaments utilitzats. En aquest apartat, pel tractament agut de 250 mg/kg es tenen en compte tots els gens modificats significativament i no només els que tenien un 50% de sobreexpressió o repressió.

La Figura 16 mostra el nombre de gens modificats significativament després de cada un dels tractaments. En **negre** hi ha la totalitat de gens modificats. En **vermell** els que estan sobreexpressats i en **verd** els que estan reprimits.



**Figura 16.** Diagrama de Venn dels experiments *in vivo* amb fetge de rates Wistar sanes amb diferents tractaments de GSPE: agut 3h 250 mg/kg, crònic 21 dies 5 mg/kg i crònic 21 dies 25 mg/kg.

El tractament agut amb 250 mg/kg de GSPE afecta a l'expressió de **1467** gens (**1446+5+11+5**), dels quals **753** es troben sobreexpressats i **714** reprimits. De la globalitat de gens, 1446 estan afectats exclusivament pel tractament agut; 5 pel tractament agut i pel tractament crònic de 5 mg/kg; 11 pel tractament agut i pel tractament crònic de 25 mg/kg; i 5 pels tres tractaments, només un d'ells ho fa en el mateix sentit.

Dels 5 gens (A) que estan alterats pels tres tractaments només un va en el mateix sentit en els 3 casos: Fam40A (*family with sequence similarity 40, member A*). Els altres 4 gens, 3 d'ells estan sobreexpressats amb les dues dosis del tractament crònic i reprimits amb el tractament, i el que queda ho fa en el sentit contrari.

Dels 6 gens (B) que estan afectats pel tractament agut i pel tractament crònic de 5 mg/kg, només un ho fa en el mateix sentit i està reprimat, és Hif1a (*hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit*). Els altres 5 s'alteren en sentit contrari. Amb el tractament crònic estan sobreexpressats i amb tractament agut estan reprimits.

Dels 11 gens (C) que estan afectats pel tractament agut i pel tractament crònic de 25 mg/kg, només un ho fa en el mateix sentit i està reprimat, és Rbx1 (*ring-box 1*). Els altres 10 s'alteren



en sentit contrari. Dels quals 9 en el tractament crònic estàn sobreexpressats i amb el tractament agut estan reprimits, i el gen restant ho fa a la inversa.

Pel que fa a l'efecte del tractament crònic de 5 mg/kg, hi ha **165** gens (**77+78+5+5**) alterats, dels quals **63** estan reprimits i **102** sobreexpressats.

Pel que fa a l'efecte del tractament crònic de 25 mg/kg, hi ha **317** gens (**224+78+5+11**) alterats, dels quals **137** estan reprimits i **87** sobreexpressats.

Finalment, si es compara l'efecte d'aquests dos tractaments crònics, hi ha **78** gens afectats per tots dos, dels quals **35** estan reprimits i **43** sobreexpressats. No només ho fan en el mateix sentit sinó que també ho fan amb la mateixa intensitat.

Hom conclou que l'efecte de les proantocianidines de pinyol de raïm depèn en gran mesura del temps de tractament, ja que els resultats obtinguts del tractament agut i del tractament crònic no són els mateixos. Pel que fa a la dosi, sembla ser que afecten a un gran nombre de gens en comú, però també poden afectar a altres gens segons quina sigui la dosi emprada, per tant, d'aquí es desprèn que l'efecte de les proantocianidines de pinyol de raïm també dependrà en gran part de la dosi emprada.

#### 4.4. Identificació de les molècules responsables dels efectes de les proantocianidines en un model cel·lular

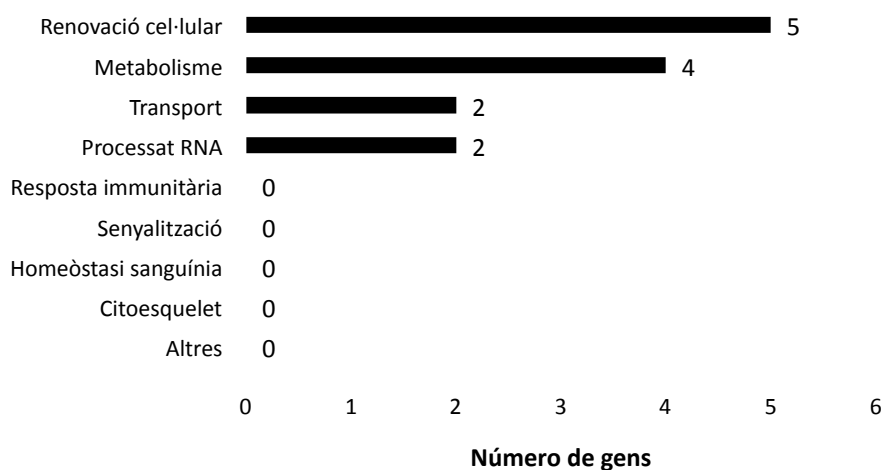
##### 4.4.1. Epicatequina

En les cèl·lules *FAO* després del tractament de 5h amb 50 mg/l d'epicatequina, el transcriptoma canvia significativament. Així, de les 41.012 sondes testades, 14.996 tenen una expressió 2 vegades superior al seu valor basal. D'aquestes, 167 canvien de forma significativa amb una  $p < 0,05$  després d'aplicar un test de la *t* de Student. Hem fet servir el criteri de considerar només aquells gens pels quals el canvi és com a mínim un 40% de sobreexpressió o repressió; és un criteri que hom acostuma a aplicar per tal de garantir la robustesa de les conclusions a les que es pugui arribar. Fent servir aquest criteri s'identifiquen **13 gens** dels que es pot afirmar amb seguretat que la seva expressió està modificada en condicions de tractament agut amb proantocianidines. Detallat a l'Annex 1.

Per tal de comprendre el significat metabòlic dels canvis d'expressió detectats, s'analitza com anteriorment segons el criteri propi de classificació (Figura 6). Addicionalment a l'anàlisi individual dels canvis d'expressió observats s'ha introduït la informació al programa MetaCore per poder integrar els canvis individuals d'expressió en el context de vies metabòliques i processos cel·lulars.

Dels 13 gens amb canvis robusts d'expressió, el programa MetaCore reconeix 3 dins dels seus mapes de vies metabòliques i 11 els reconeix com a objectes d'una xarxa que tenen un nexe en comú, el qual no té perquè ser un dels gens modificats significativament. Tant els mapes de vies metabòliques com les xarxes de processos les classifica estadísticament aplicant un test corregit amb *false discovery rate*  $p < 0,05$  que permet rebutjar processos o objectes amb una significativitat dubtosa, assegurant que els resultats obtinguts no contenen falsos positius. D'aquests, 7 es troben sobreexpressats i 6 reprimits, i la distribució envers el *p*-valor és del 62% amb  $p \leq 0,01$ .

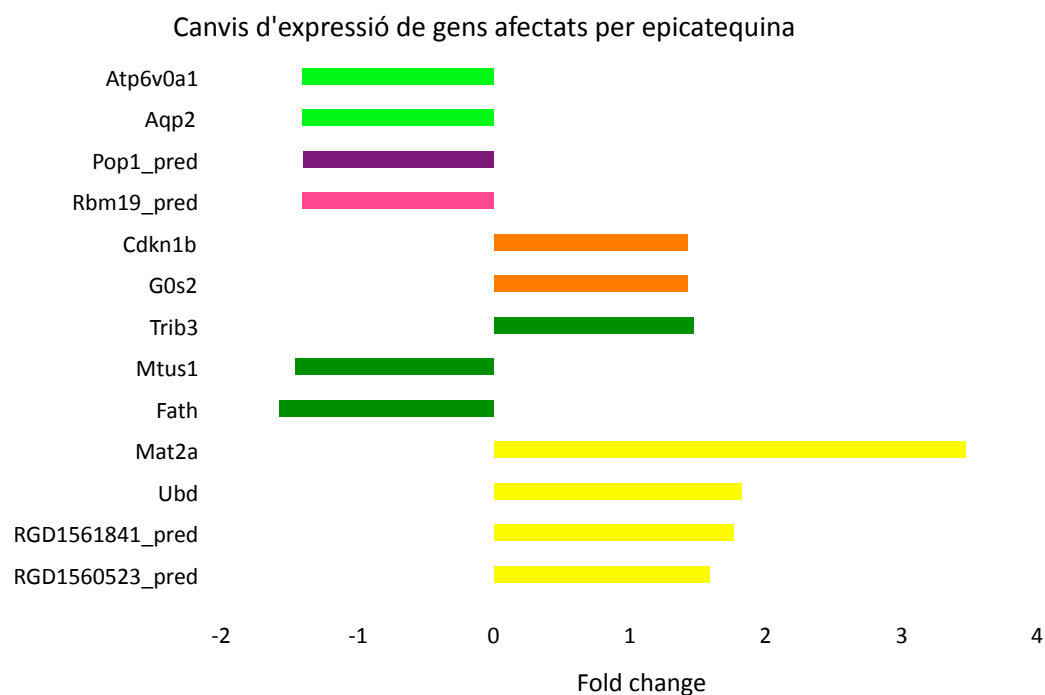
Segons el criteri propi de classificació, els processos cel·lulars que resulten afectats són els indicats a la Figura 17, on s'indiquen per a cada procés el conjunt de gens amb canvis d'expressió.



**Figura 17.** Classificació de gens afectats per un tractament de 50 mg/l d'epicatequina durant 5h i agrupats en processos biològics segons la classificació pròpia emprada.

Tal com es pot veure a la Figura 17, el procés més afectat és el de renovació cel·lular. S'ha de tenir en compte però que el tractament amb epicatequina no té un efecte molt marcat sobre el transcriptoma de les cèl·lules hepàtiques *FAO*. El detall dels gens que canvien d'expressió es presenta a l'Annex 1. Tot seguit es fa una descripció de tots els canvis observats en els diferents grups, ja que només hi ha 13 gens afectats.

Els canvis d'expressió es presenten al Gràfic 29, indicant en diferents colors la tipologia a la que pertanyen: metabolisme proteic (groc), apoptosi/diferenciació/proliferació/creixement (verd), regulació del cicle cel·lular (taronja), mRNA (rosa), tRNA (lila), transport (verd clar).



**Gràfic 29.** Classificació de gens involucrats en els processos metabòlics. ■ Metabolisme proteic ■ Apoptosi/Desenvolupament/Proliferació/Creixement ■ Regulació del cicle cel·lular ■ mRNA ■ tRNA ■ Transport.

Del Gràfic 29 es desprèn que els principals canvis metabòlics es donen en la renovació cel·lular, amb 5 gens alterats, seguit del metabolisme proteic amb 4 gens alterats.

Dins del metabolisme proteic, tots 4 gens es troben sobreexpressats, sent Mat2a (*methionine adenosyltransferase II, alpha*), el que experimenta una sobreexpressió més forta, de gairebé 3,5 vegades respecte al control. S-adenosilmetionina (SAME), és el principal donant biològic de grups metil, i és sintetitzat a partir de metionina i ATP en una reacció catalitzada per la metionina adenosiltransferasa (MAT). Amb una sobreexpressió prou important dins del metabolisme proteic es troben predits RGD1561841 (*similar to ribosomal protein L31*), implicat en la síntesi de proteïnes i RGD1560523 (*similar to S-adenosylmethionine synthetase gamma form (methionine adenosyltransferase)*). Per últim, Ubd (*ubiquitin D*), dins de la família de les ubiquitines, encarregades de marcar les proteïnes per la seva destrucció al proteasoma.

El següent grup correspon a la renovació cel·lular, amb dos subgrups. El primer és el d'apoptosi/diferenciació/proliferació/creixement i el segon implicat en la regulació del cicle cel·lular. En el primer d'ells, hi ha 2 gens reprimits, Fath (*fat tumor suppressor homolog (Drosophila)*), que codifica per un supressor tumoral essencial pel control de la proliferació cel·lular durant el desenvolupament de la *Drosophila*, i Mtus1 (*mitochondrial tumor suppressor 1*), que coopera amb Agtr2 (*angiotensin II receptor, type 2*) per inhibir Erk2 (*mitogen activated protein kinase 1*) en la proliferació cel·lular. El gen sobreexpressat és Trib3 (*tribbles homolog 3*

4 RESULTATS i DISCUSSIÓ

(*Drosophila*)), un regulador negatiu de NfκB. A més, també pot regular a les cèl·lules d'entrar en apoptosi induïda per TNF i TRAIL.

Dins de la regulació del cicle cel·lular hi ha 2 gens, tots dos sobreexpressats. Cdkn1b (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), que pertany a la família de les proteïnes inhibidores de quinases depenents de ciclins. Es parla d'aquesta proteïna com inhibidora del cicle cel·lular degut a que la seva funció principal és frenar o ralentir el cicle de divisió cel·lular. G0s2 (*G0/G1 switch gene 2*) es podria requerir per fer entrar les cèl·lules en fase G1.

Pel que fa al processat de RNA, els dos són seqüències predites i es troben reprimits. Rbm19 (*RNA binding motif protein 19 (predicted)*) codifica per una proteïna implicada en la biogènesi del ribosoma, i Pop1 (*processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP family, (S. cerevisiae)*) és un component de la ribonucleasa P, un complex proteic que genera les molècules madures de tRNA.

Dins del grup de gens implicats en el transport, destacar que tots dos estan reprimits. El primer d'ells es Aqp2 (*aquaporin 2*), proteïna de membrana capaç de transportar l'aigua a través dels compartiments cel·lulars, en aquest cas mitjançant un canal. L'altre gen correspon a Atp6v0a1 (*ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A1*), important en el transport intracel·lular.

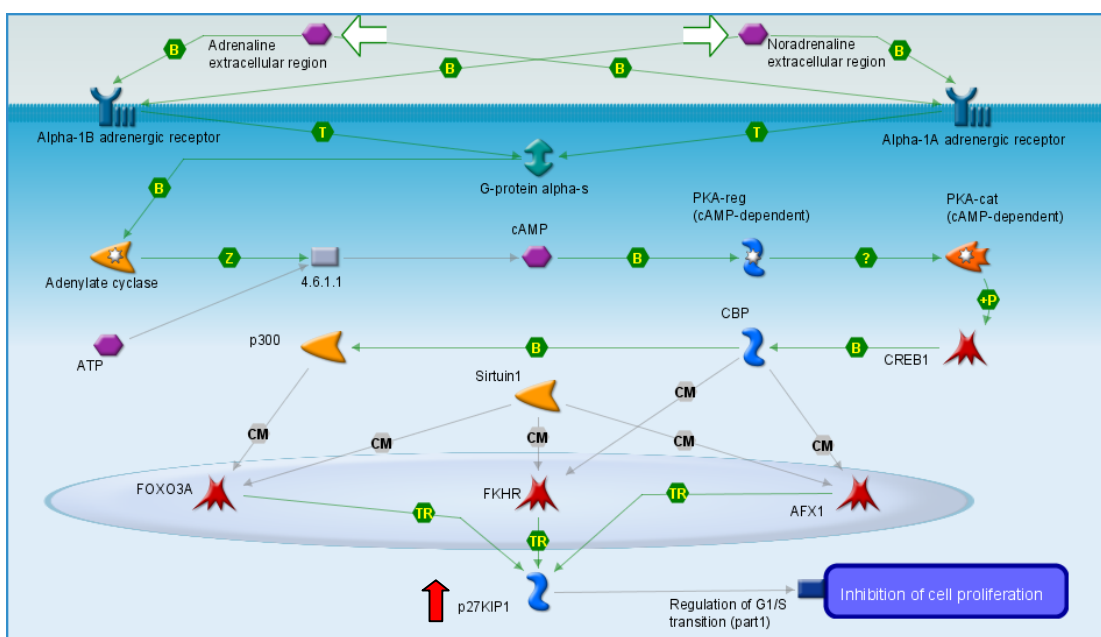
Per tal d'integrar la informació dels canvis d'expressió que s'ha descrit fins ara, com ja s'ha dit anteriorment, s'ha fet servir el programa MetaCore. Com a resultats ens indica en primer lloc que les 10 vies metabòliques i els 10 processos cel·lulars més afectats pel tractament amb 50 mg/l d'epicatequina són els indicats a la Taula 21. Els símbols que apareixen a les figures del MetaCore estan detallats a l'Annex 3.

Vies metabòliques	Processos cel·lulars
Development_Alpha-1 adrenergic receptors signaling via cAMP	Cell cycle_G0-G1
Development_FGF2-dependent induction of EMT	Signal Transduction_BMP and GDF signaling
Development_Thrombopoietin signaling via JAK-STAT pathway	Apoptosis_Endoplasmic reticulum stress pathway
Development_Delta- and kappa-type opioid receptors signaling via beta-arrestin	Translation_Selenium pathway
Immune response_MIF-JAB1 signaling	Inflammation_Interferon signaling
Cell cycle_Role of SCF complex in cell cycle regulation	Cell cycle_Core
DNA damage_Brca1 as a transcription regulator	Cell cycle_G1-S Interleukin regulation
Cell cycle_ESR1 regulation of G1/S transition	Proteolysis_Proteolysis in cell cycle and apoptosis
Methionine metabolism	Development_Hemopoiesis, Erythropoietin pathway
Development_SSTR2 in regulation of cell proliferation	Inflammation_MIF signaling

Taula 21. Vies metabòliques i processos cel·lulars més afectats pel tractament amb 50 mg/ d'epicatequina.

Pel que fa a les vies metabòliques, interpretant els resultats del MetaCore i la classificació pròpia, hom pot concloure que les vies més afectades són les que tenen relació amb la regulació del cicle cel·lular (Figures 18 i 19) i el metabolisme de la metionina (Figura 20).

De les 10 vies representades a la Taula 21, 9 d'elles giren al voltant de l'expressió del gen **Cdkn1b** (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) o **p27Kip1**. Cdkn1b [176, 177] forma part de la família dels inhibidors de CDK (ciclins depenents de quinases), anomenats CDIs. Aquests s'uneixen als complexos ciclina/CDK i detenen el cicle cel·lular. Les CDKs juntament amb les ciclins, les seves subunitats reguladores, governen la progressió del cicle cel·lular a les cèl·lules eucariotes. La proteïna codificada per Cdkn1b [178] s'uneix i frena l'activació dels complexos ciclina E/CDK2 o ciclina D/CDK4, de manera que controla la progressió del cicle cel·lular a la fase G1. La degradació d'aquesta proteïna, la qual és accionada per la seva fosforilació depenent de CDK i la seva subsegüent ubiquïtinació pels complexos SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*), es requereix per la transició d'un estat de quiescència a un estat proliferatiu. A continuació es mostren dues figures (Figura 18 i 19) que representen la dependència del cicle cel·lular de Cdkn1b. La Figura 18 representa la inhibició de la proliferació cel·lular depenent de la sobreexpressió de Ckn1b.



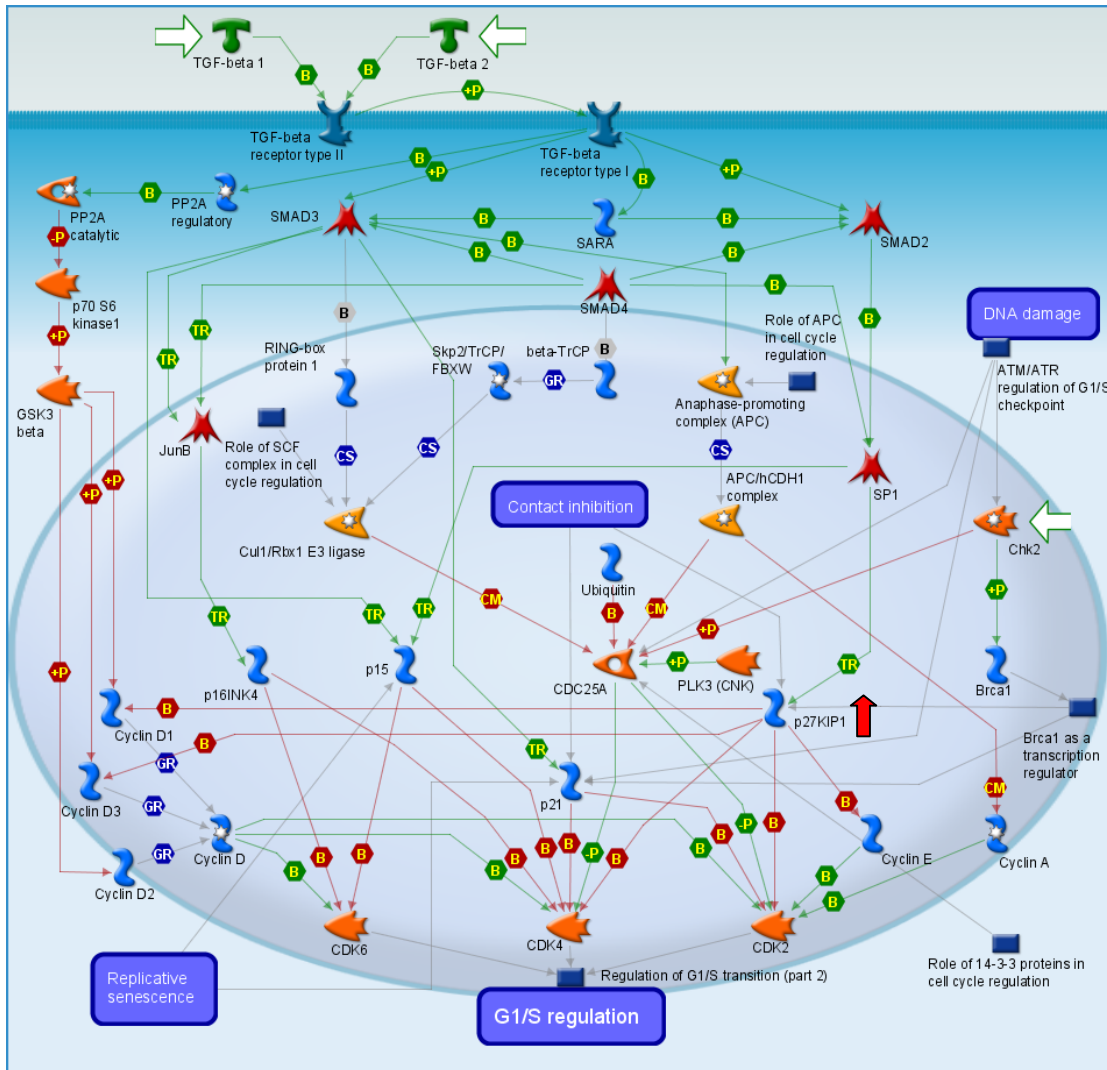
**Figura 18.** Canvis en la via de desenvolupament segons el programa MetaCore en cèl·lules FAO tractades amb una dosi de 50 mg/l d'epicatequina. Aquesta figura correspon a la via de senyalització via AMP cíclic dels receptors alfa-1 adrenergics.

Els receptors adrenergics alfa-1A i alfa-1B poden inhibir la proliferació cel·lular via la proteïna G alfa-s depenent de la sobreexpressió de l'inhibidor de ciclina depenent de quinasa 1B (**p27KIP1** o **Cdkn1b**) [179, 180]. La proteïna G alfa-s estimula l'adenilat ciclasa per produir

cAMP, utilitzant ATP com a substrat, que al seu torn activa PKA (*protein kinase cAMP-dependent*) [179, 180]. cAMP es un potent inhibidor de la proliferació cel·lular en gran varietat de línies cel·lulars [181]. La repressió de la ciclina D1 o la sobreexpressió **p27KIP1** són dos mecanismes pels quals cAMP pot induir l'arrest de G1. PKA activa a CREB1 (*cAMP responsive element binding protein*) fosforilant-lo [182] i a continuació CREB1 interacciona amb CBP (*CREB binding protein*) incrementant la seva activitat. CREB1/CBP s'uneix a la proteïna p300. El complex CBP/p300 té activitat acetilasa. L'acetilació dels factors de transcripció FoxO (*Forkhead box, class O*) podria ser una via de la seva regulació [183]. Els activadors transcripcionals FKHR (*Forkhead box O1A*), FOXO3A (*Forkhead box O3A*), AFX1 (*Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to 7*) [181] activen la transcripció de **p27KIP1**. Probablement la interacció del complex CBP/p300 amb els factors de transcripció FoxO i la seva deacetilació per part de la Sirtuina 1 sigui necessària per la transcripció de **p27KIP1** [183].

La Figura 19 representa la regulació de la fase G1/S del cicle cel·lular depenent de la sobreexpressió de Cdkn1b.

Els punts de verificació dels danys del DNA són llocs on es frena o retrassa la progressió del cicle cel·lular en resposta als danys en el DNA. El cicle cel·lular té 4 fases a totes les cèl·lules somàtiques eucariotes: G1, S, G2 i M, i una fora del cicle per sí mateix anomenada G0 [184]. El receptor del factor de creixement transformant I (*TGF receptor I*) mitjançant fosforilació activa els membres 2 i 3 de la família SMAD [185], els quals formen un complex amb SMAD 4. Aquests complexos s'acumulen al nucli i regulen la transcripció de gens diana [186]. Les SMADs estimulen la transcripció de proteïnes com p16INK, p15, p21 o p27KIP1 que actuen directa o indirectament com a inhibidors quinasa del cicle cel·lular. SMAD2 actua via el factor de transcripció SP1. Aquests inhibidors interfereixen amb les interaccions entre CDKs i les corresponents ciclines. El dany al DNA [184] estimularia l'arrest al punt de verificació G1/S a través de p27KIP1, p21 o p15.



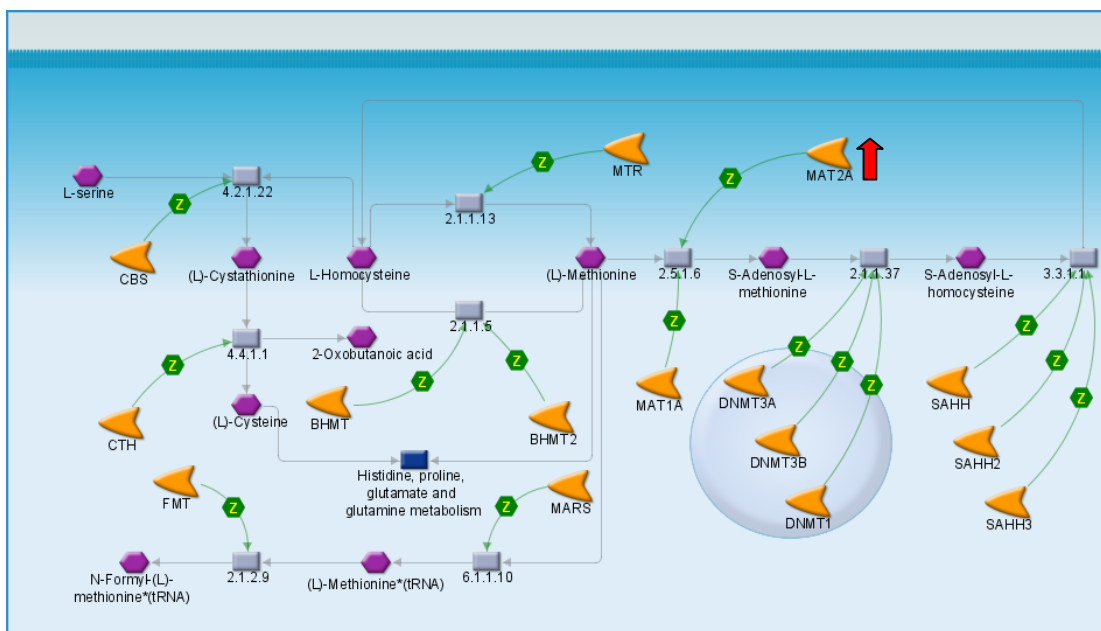
**Figura 19.** Canvis en la via del cicle cel·lular segons el programa MetaCore en cèl·lules *FAO* tractades amb una dosi de 50 mg/l d'epicatequina. Aquesta figura correspon a la via de la regulació de la transició de la fase G1 a la fase S.

Actualment no hi ha cap treball que relacioni l'efecte de l'epicatequina sobre l'expressió de p27KIP1, d'altra banda sí que existeix un gran ventall d'estudis on s'ha vist que l'epigallocatequina gal·lat (EGCG) exerceix el mateix efecte sobre aquest gen. Així doncs, el tractament amb EGCG a concentracions no tòxiques en cèl·lules pancreàtiques aïllades de rata [187] inhibeix la progressió del cicle cel·lular a la fase G1 disminuint l'expressió de la ciclina D1 i incrementant l'expressió de p27KIP1. Un altre estudi amb EGCG [188] en cultiu cel·lular suggereix que aquest indueix els inhibidors dependents de quinasa CKIs de la fase G1, entre ells p27KIP1, els quals al seu torn inhibeixen els complexos ciclina/cdk que operen a les fases G0/G1 del cicle cel·lular, causant un arrest del cicle cel·lular a G0/G1, procés irreversible que conclou amb la mort cel·lular apoptòtica. Aquest fet posaria de manifest als polifenols com a possibles agents anticancerígens. S'han fet treballs amb altres polifenols com per exemple resveratrol [189]. En aquest estudi fet amb una línia cel·lular cancerosa s'ha vist com el



resveratrol disminueix el ritme de proliferació així com un increment en l'apoptosi cel·lular de forma dosi i temps depenent. Aquest efecte es suggereix que pugui ser degut entre altres coses a l'increment dels moduladors p53, p21 i p27.

Pel que fa a l'altre via inclosa dins de les 10 més significatives segons el programa MetaCore, és la corresponent al metabolisme de la metionina on el gen implicat és **MAT2A** (*methionine adenosyltransferase II, alpha*), el qual està fortament sobreexpressat (Figura 20).



**Figura 20.** Canvis en la via del metabolisme de la metionina segons el programa MetaCore en cèl·lules FAO tractades amb 50 mg/ d'epicatequina.

El primer pas en el metabolisme de la (L)-metionina, és la síntesi de S-adenosil-(L)-metionina, que és catalitzat per MAT1A [190] i MAT2A [190, 191]. S-adenosil-(L)-metionina (SAME) és el principal donador de grups metil en els mamífers. Les DNA (citosina-5-)-metiltransferases DNMT1 [192], DNMT3A [193] i DNMT3B [193] catalitzen de forma natural la transferència d'un grup metil activat des de SAME a C5 d'una citosina del DNA amb la corresponent formació de S-Adenosil-(L)-homocisteïna (AdoHcy).

Les hidrolases SAAH [194], SAH2 [195] i SAH3 [195] catalitzen la hidròlisi de AdoHcy a adenosina i (L)-homocisteïna. Al seu torn CBS (*cystathionine beta-synthase*) catalitza la condensació de (L)-serina i (L)-homocisteïna per formar (L)-cistationina [196]. Per altra banda CTH (*cystathionine gamma-lyase*) catalitza el segon pas en la via de trans-sulfuració reversa per la obtenció de (L)-Cisteïna, àcid 2-Oxobutanoic, i amoni [197].

Finalment, la (L)-metionina és un aminoàcid implicat en la biosíntesi de proteïnes que forma el conjugat aminoacil-tRNA amb el seu corresponent tRNA mitjançant MARS (*methionyl-tRNA*

*synthetase*) [198].

Fins ara no existeixen treballs que relacionin l'efecte dels polifenols sobre MAT2A. D'altra banda, hi ha un gran ventall d'estudis on es relaciona la sobreexpressió de MAT2A amb la proliferació cel·lular a fetge. La regulació de la proliferació cel·lular a fetge és un event clau per controlar el tamany del fetge durant el seu desenvolupament i regeneració [199]. MAT (*methionine adenosiltransferase*) és un enzim clau pel metabolisme hepàtic de la metionina i catalitza la síntesi de S-adenosil-(L)-metionina a partir de metionina i ATP. Els dos gens que codifiquen per aquest enzim són MAT1A i MAT2A [200]. MAT1A s'expressa principalment a fetge, mentre que MAT2A es troba distribuït per tots els teixits [199, 200]. Els nivells hepàtics relatius de les dues isoformes de MAT canvien segons l'estat de desenvolupament [199], així doncs, l'expressió de MAT2A incrementa en el fetge fetal i en processos de regeneració hepàtica. Hi ha un treball on es relaciona el paper de MAT i SAME amb el càncer hepàtic associat a l'alcohol [200]. En ell mostra com el fetge malalt té una disminució de l'activitat hepàtica MAT que acaba amb una menor biosíntesi de SAME, i acaba conclouent que SAME controlaria tant el creixement com la mort de les cèl·lules hepàtiques. Això és degut a que SAME mostra tenir propietats antiapoptòtiques en hepatòcits normals, mentre que en hepatòcits cancerosos sembla tenir propietats proapoptòtiques, fet que li confereix la possibilitat de ser un atractiu agent tant per la quimoprevenició com el tractament d'hepatocarcinoma. Un altre treball realitzat amb una línia cel·lular hepàtica [199] mostra com MAT2A seria una diana de factors de creixement, com HGF (*hepatocyte growth factor*) un potent mitogen, i com la seva sobreexpressió seria requerida per la proliferació cel·lular a fetge. Un altre treball on relaciona HGF amb MAT2A [201], en les cèl·lules hepàtiques *HepG2*, posa de manifest que la densitat cel·lular és un factor important en l'expressió de MAT2A i altres moduladors del cicle cel·lular després d'un tractament amb HGF.

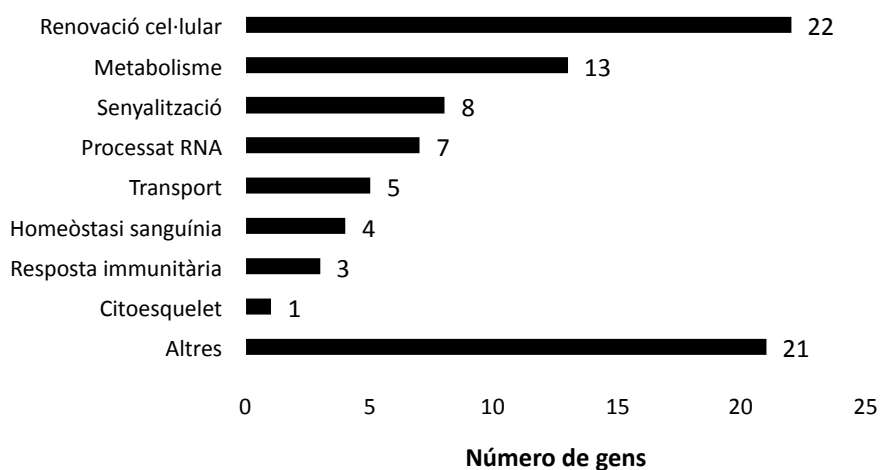
#### 4.4.2. Dímer de catequina

En les cèl·lules *FAO* després del tractament de 5h amb 10 mg/l de dímer de catequina, el transcriptoma canvia significativament. Així, de les 41.012 sondes testades, 14.996 tenen una expressió 2 vegades superior al seu valor basal. D'aquestes, 1.503 canvien de forma significativa amb una  $p < 0,05$  després d'aplicar un test de la *t* de Student. Hem fet servir el criteri de considerar només aquells gens pels quals el canvi és com a mínim un 50% de sobreexpressió o repressió; és un criteri que hom acostuma a aplicar per tal de garantir la robustesa de les conclusions a les que es pugui arribar. Fent servir aquest criteri s'identifiquen **84 gens** dels que es pot afirmar amb seguretat que la seva expressió està modificada en condicions de tractament agut amb proantocianidines. Detallat a l'Annex 1.

Per tal de comprendre el significat metabòlic dels canvis d'expressió detectats, s'analitza com anteriorment segons el criteri propi de classificació (Figura 6). Addicionalment a l'anàlisi individual dels canvis d'expressió observats s'ha introduït la informació al programa MetaCore per poder integrar els canvis individuals d'expressió en el context de vies metabòliques i processos cel·lulars.

Dels 84 gens amb canvis robusts d'expressió, el programa MetaCore reconeix 28 dins dels seus mapes de vies metabòliques i 77 els reconeix com a objectes d'una xarxa que tenen un nexa en comú, el qual no té perquè ser un dels gens modificats significativament. Tant els mapes de vies metabòliques com les xarxes de processos les classifica estadísticament aplicant un test corregit amb *false discovery rate*  $p < 0,05$  que permet rebutjar processos o objectes amb una significativitat dubtosa, assegurant que els resultats obtinguts no contenen falsos positius. D'aquests, 65 es troben sobreexpressats i 19 reprimits, hi ha una repressió generalitzada dels gens que es sobreexpressen o reprimeixen un 50%. La distribució envers el p-valor és del 69% amb  $p \leq 0,01$ .

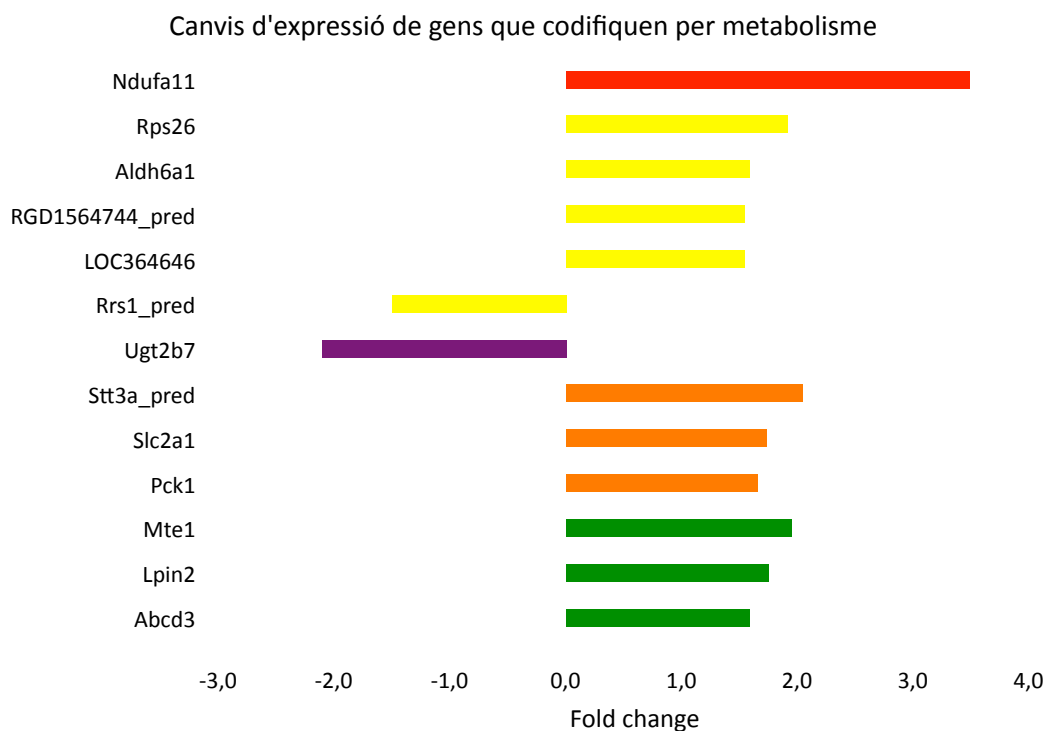
Segons el criteri propi de classificació, els processos cel·lulars que resulten afectats són els indicats a la Figura 21, on s'indiquen per a cada procés el conjunt de gens amb canvis d'expressió.



**Figura 21.** Classificació de gens afectats per un tractament de 10 mg/l de dímer de catequina durant 5h i agrupats en processos biològics segons la classificació pròpia emprada.

Tal com es pot veure a la Figura 21, el procés més afectat és el de renovació cel·lular, en el qual es troben gens involucrats en la proliferació, creixement, diferenciació i apoptosi, així com gens involucrats en el cicle cel·lular. Segueixen en importància els gens implicats en metabolisme i senyalització. El detall dels gens que canvien d'expressió es representa a l'Annex 1. Tot seguit es fa una descripció dels principals canvis observats en els diferents grups.

Els canvis d'expressió en els gens implicats en el metabolisme es presenten al Gràfic 30, indicant en diferents colors la tipologia de metabolisme a la que pertanyen: metabolisme lipídic (verd), metabolisme glucídic (taronja), metabolisme de xenobiòtics (lila), metabolisme proteic (groc), metabolisme de nucleòtids (blau) i metabolisme energètic (vermell).



**Gràfic 30.** Classificació de gens segons el metabolisme cel·lular en el qual estan implicats. ■ Metabolisme lipídic ■ Metabolisme glucídic ■ Metabolisme de xenobiòtics ■ Metabolisme proteic ■ Metabolisme de nucleòtids ■ Metabolisme energètic.

Del Gràfic 30 es desprèn que els principals canvis metabòlics es donen en el metabolisme proteic, seguit del metabolisme lipídic i glucídic.

Dins del metabolisme lipídic, tots els gens estan sobreexpressats. El primer i que experimenta la sobreexpressió més suau és *Abcd3* (*ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3*), implicat en l'import d'àcids grassos i/o acil-CoAs al peroxisoma. El següent en ordre d'expressió és *Lpin2* (*lipin 2*), el qual juga un paper important en el control del metabolisme dels àcids grassos a diferents nivells. El gen que experimenta la sobreexpressió més forta és *Mte1* (*mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1*), gairebé el doble del control. *Mte1* és una acil-CoA tioesterasa, un grup d'enzims que catalitza la hidròlisi dels acil-CoAs a àcid gras i coenzim A (CoASH), de manera que pot regular els nivells intracel·lular d'acils-CoAs, àcids grassos lliures i CoASH.

Pel que fa al metabolisme glucídic, tots tres gens estan sobreexpressats. Amb el doble d'expressió que el control hi ha *Stt3a* (*STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A*), és un dels components d'un complex que catalitza la transferència d'un oligosacàrid de mannos a un residu d'asparraguina d'un motiu consens Asn-X-Ser/Thr d'una cadena polipeptídica naixent. *Pck1* (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*), és el principal punt

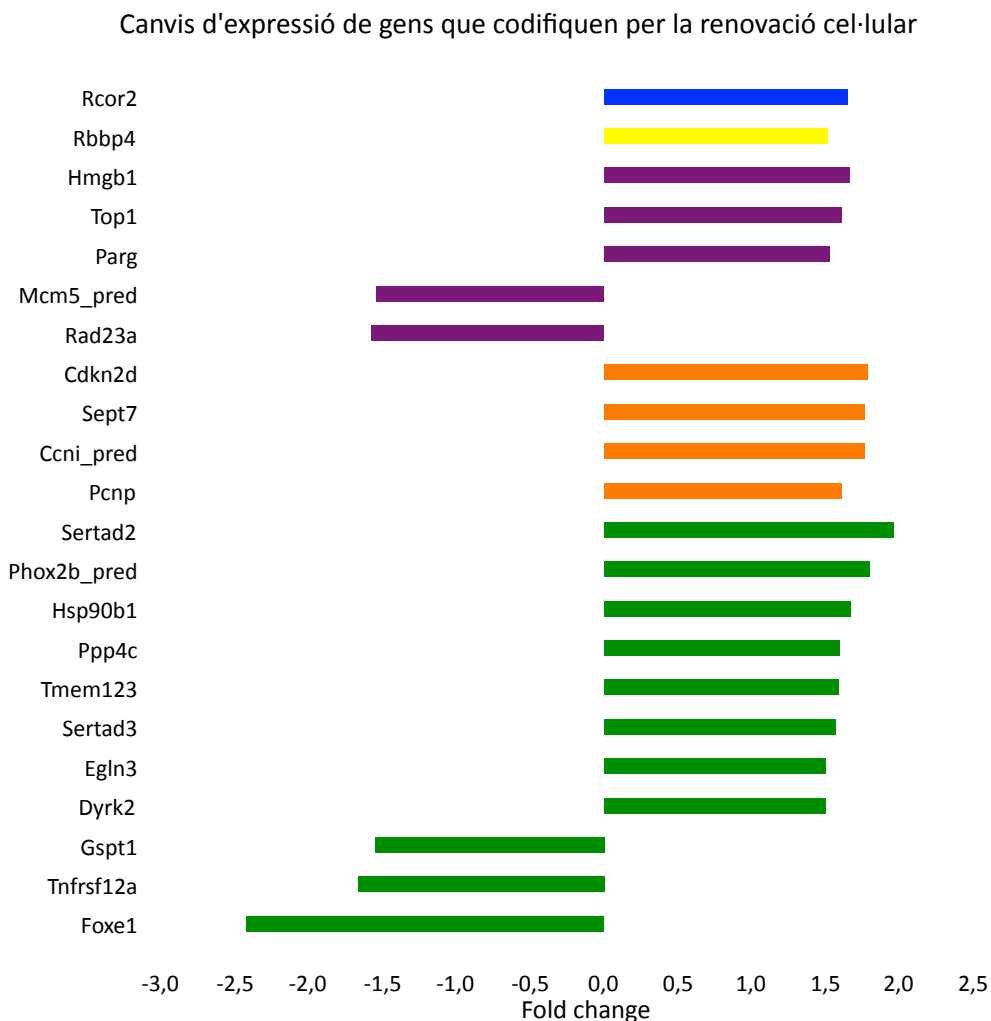
de regulació de la gluconeogènesi. Catalitza la conversió del oxalacetat a fosfoenolpiruvat, el pas limitant en la via metabòlica de producció de glucosa a partir de lactat i altres precursors derivats del cicle dels àcids tricarboxílics (TCA). L'altre gen sobreexpressat és Slc2a1 (*solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1*), el principal transportador de glucosa.

Dins del metabolisme de xenobiòtics hi ha Ugt2b7 (*UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7*), amb una repressió bastant forta. Forma part de la família de les UDP glucuronosiltransferases, que són de màxima importància en la conjugació i subsegüent eliminació de xenobiòtics potencialment tòxics.

En el metabolisme proteic hi ha 5 gens, 4 dels quals es troben sobreexpressats. Tots ells relacionats amb la síntesi de proteïnes excepte Aldh6a1 (*aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1*), que està implicat en el metabolisme de la valina i la pirimidina.

Finalment, en el metabolisme energètic només hi ha un gen, Ndufa11 (*NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11*), amb una sobreexpressió de gairebé 3,5 vegades la del control. Aquest correspon a una de les subunitats de la cadena respiratòria mitocondrial NADH deshidrogenasa (Complex I). El Complex I funciona en la transferència d'electrons des de NADH cap a la cadena respiratòria.

Els canvis d'expressió en els gens implicats en la renovació cel·lular es presenten al Gràfic 31, indicant en diferents colors la tipologia de la classificació a la que pertanyen: apoptosi/desenvolupament/proliferaió/creixement (verd), regulació del cicle cel·lular (taronja), processat del DNA (lila), histones/helicases/remodelació de la cromatina (groc) i regulació de la transcripció (blau).



**Gràfic 31.** Classificació de gens involucrats en la renovació del cicle cel·lular. ■ Apoptosi/Desenvolupament/Proliferació/Creixement ■ Regulació del cicle cel·lular ■ Processat DNA ■ Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina ■ Regulació de la transcripció.

Del Gràfic 31 es desprèn que els principals canvis es donen en el subgrup de l'apoptosi/desenvolupament/proliferació/creixement. Dins d'aquest grup, majoritàriament es troben sobreexpressats. El gen amb una repressió més forta és *Foxe1* (*forkhead box E1* (*thyroid transcription factor 2*)). Aquest gen funciona com a factor de transcripció de tiroides, jugant un paper crucial en la morfogènesi de la tiroides. En ordre de repressió hi ha *Tnfrsf12a* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A*). Aquest funciona com a receptor de TNFSF12/TWEAK. És un inductor dèbil d'apoptosi en alguns tipus cel·lulars i promou l'angiogènesi i la proliferació de les cèl·lules endotelials. Finalment, amb la repressió més moderada hi ha *Gspt1* (*G1 to S phase transition 1*), involucrat en la regulació del creixement cel·lular. Pel que fa als gens que estan sobreexpressats en ordre de magnitud hi ha *Sertad2* (*SERTA domain containing 2*), aquest podria contribuir a l'oncogènesi mitjançant un

mecanisme depenent de E2F, factors de transcripció involucrats en la regulació del cicle cel·lular i la síntesi de DNA. Amb una expressió menys marcada hi ha Sertad3 (*SERTA domain containing 3*), amb la mateixa funcionalitat. Implicat també en l'oncogènesi hi ha Tmem123 (*transmembrane protein 123*). Amb un 80% de sobreexpressió hi ha Phox2b (*paired-like homeobox 2b (predicted)*). La proteïna per la qual codifica, funciona com un factor de transcripció implicat en el desenvolupament de la població de neurones noradrenèrgiques i en la determinació del fenotip del neurotransmissor. Amb una sobreexpressió força important es troba Hsp90b1 (*heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1*). És una Hsp90 del reticle endoplasmàtic i està implicada en la inhibició de l'apoptosi mitjançant la inhibició de l'acció de les calpaïnes, que són proteases depenents de calci. Ppc4 (*Protein serine/threonine phosphatase 4*) és un polipèptid essencial involucrat en processos cel·lulars crítics tals com l'apoptosi, recuperació del *checkpoint* després d'un dany en el DNA, organització i creixement de microtúbuls o senyalització via Tnf $\alpha$ . Finalment hi ha Egl3 (*EGL nine homolog 3 (C. elegans)*) i Dyrk2 (*dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2*). Egl3 funciona com un sensor d'oxigen cel·lular que catalitza la formació post-transduccional de 4-hidroxiprolina en el factor d'hipòxia induïble alfa (Hif $\alpha$ ). També promou la mort cel·lular per mecanismes depenents de les caspases. Dyrk2 pertany a la família de les proteïnes quinases implicades en el creixement cel·lular i el desenvolupament. Aquesta regula p53 mitjançant la seva fosforilació, induint l'apoptosi en resposta a un dany en el DNA.

Dins de la regulació del cicle cel·lular, hi ha 4 gens implicats, tots ells sobreexpressats. Cdkn2d (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2D*), amb la sobreexpressió més forta, codifica per una proteïna que forma un complex estable amb Cdk4 o Cdk6, que són quinases depenents de ciclina. Aquesta interacció prevé l'activació d'aquestes quinases, actuant com a regulador negatiu del cicle cel·lular. Les ciclins són una família de proteïnes que controlen la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'activació de les quinases depenents de ciclina (Cdk), es troba sobreexpressada Ccni (*ciclina 1*). Amb una sobreexpressió similar està Sept7 (*septin 7*); les septines són proteïnes essencials per la citoquinesi. Finalment, Pcnp (*similar to PEST-containing nuclear protein*), implicada en la regulació del cicle cel·lular.

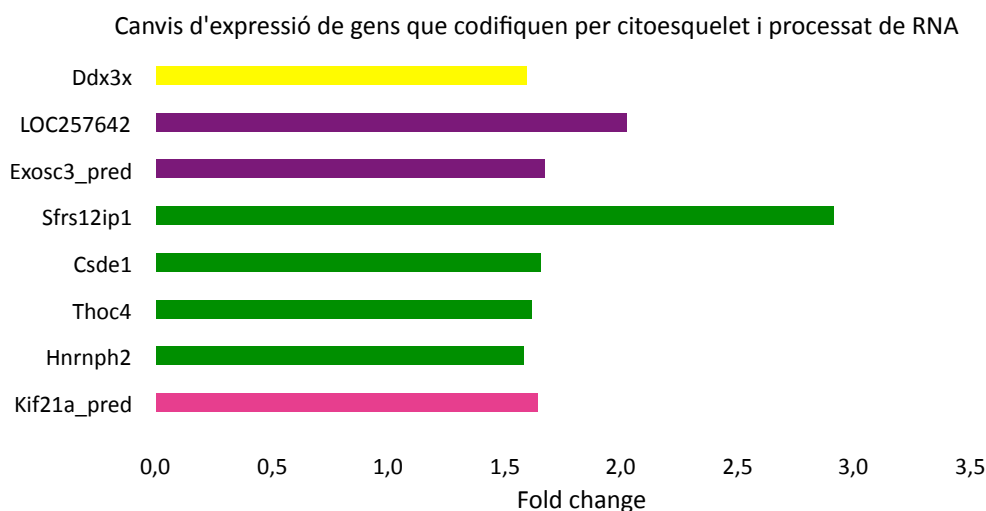
Pel que fa al grup implicat en el processat de DNA, tots ells tenen un grau d'expressió similar, ja sigui repressió o sobreexpressió. El més sobreexpressat és Hmgb1 (*high mobility group box 1*). Les Hmg-1 i Hmg-2, es troben exclusivament al nucli i estan implicades en la replicació. Està seguit de Top1 (*topoisomerase (DNA) 1*) i Parg (*poly (ADP-ribose) glycohydrolase*). Top1, catalitza el tall i la unió d'una cadena simple de DNA durant la transcripció. Parg és el principal enzim responsable del catabolisme de poli(ADP-ribosa), que es sintetitza després que hi hagi



un dany al DNA. Hi ha dos gens reprimits, Rad23a (*RAD23a homolog (S. cerevisiae)*), que juga un paper important en la reparació del DNA, i Mcm5 (*minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) (predicted)*), implicat en l'inici de la replicació del DNA.

En el dos últims grups només hi ha un gen en cadascun, tots dos sobreexpressats. Rbbp4 (*retinoblastoma binding protein 4*), implicat en la remodelació de la cromatina, i Rcor2 (*REST corepressor 2*), que actua com a repressor de la transcripció.

Els canvis d'expressió en els gens implicats en el manteniment del citoesquelet i el processat de RNA es presenten al Gràfic 32, indicant en diferents colors la tipologia de la classificació a la que pertanyen: citoesquelet (rosa), mRNA (verd), tRNA (taronja), rRNA (lila) i helicases de RNA (groc). Es interessant destacar que tots ells estan sobreexpressats.



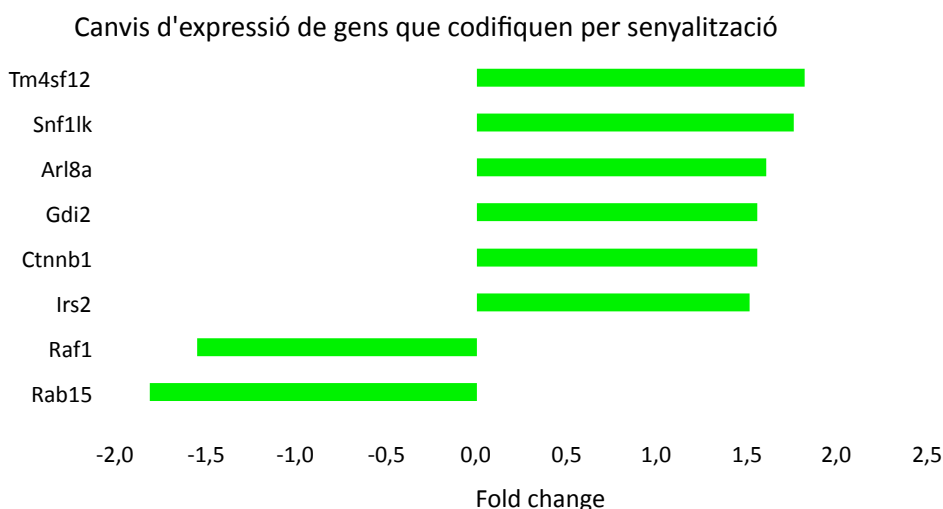
**Gràfic 32.** Classificació de gens involucrats en el manteniment del citoesquelet i el processat del RNA.  
■ Citoesquelet ■ mRNA ■ rRNA ■ Helicases RNA.

Del Gràfic 32 es desprèn que tots els gens implicats tant en el processat de RNA com en el manteniment del citoesquelet estan sobreexpressats. Els principals canvis es troben en el processat de RNA, bàsicament en el mRNA. Dins d'aquest grup el gen que experimenta la màxima sobreexpressió és Sfrs12ip1 (*SFRS12-interacting protein 1*), és un regulador del *splicing* i podria estar implicat en el control de la supervivència cel·lular. Els altres gens implicats en el processat de mRNA tenen una expressió molt similiar, són Csde1 (*cold shock domain containing E1, RNA binding*), implicat en la renovació del mRNA, Thoc4 (*THO complex 4*), implicat en el processat del mRNA i la seva exportació, i finalment Hnrnp2 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H')*), involucrat en el processat del pre-mRNA i en altres aspectes del metabolisme del mRNA i el seu transport. Pel que fa al processat de rRNA hi ha dos gens,

Exosc3 (*exosome component 3 (predicted)*), component del complex del exosoma encarregat de degradar diversos tipus de RNA, i LOC257642 (*rRNA promoter binding protein*), proteïna que s'uneix a la seqüència promotora del rRNA i a factors de transcripció de rRNA, induint la seva síntesi. Per finalitzar el grup de processat de RNA hi ha una helicasa, la Ddx3x (*DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked*).

En la classificació de citoesquelet només hi ha un gen, Kif21a (*kinesin family member 21A (predicted)*). Aquesta proteïna pot estar implicada en el transport dependent dels microtúbuls. Les quinesines són una família de proteïnes motores que regulen el transport intracel·lular sobre els microtúbuls, que són components del citoesquelet.

Els canvis d'expressió en els gens implicats en la senyalització es presenten al Gràfic 33. És un grup bastant heterogeni ja que inclou diferents tipus de senyalització. Principalment inclou quinases, implicades en la fosforilació/desfosforilació, encara que també es poden trobar gens implicats en la transmissió de senyals per mitjà de la sinapsi.

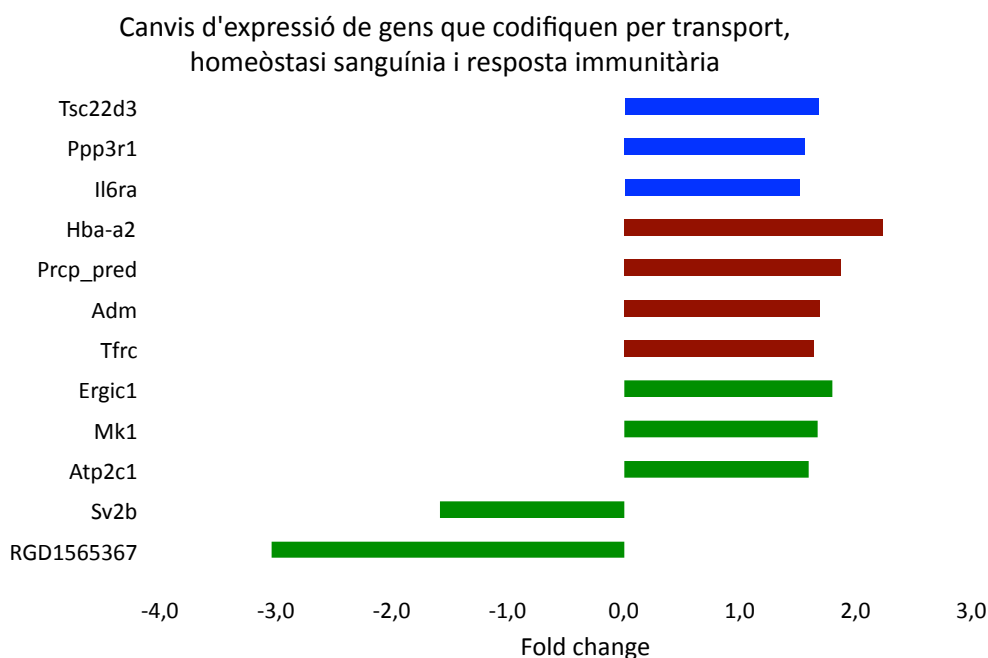


**Gràfic 33.** Classificació de gens involucrats en diferents processos de senyalització. ■ Senyalització.

Del Gràfic 33 es desprèn que hi ha una sobreexpressió generalitzada dels gens implicats en la senyalització. El canvi més important l'experimenta Tm4sf12 (*transmembrane 4 superfamily member 12*), implicat en la mediació de transducció de senyals pel desenvolupament cel·lular, activació del creixement i la motilitat. Amb similar magnitud hi ha Snf1lk (*SNF1-like kinase*), el qual actua com a sensor de  $[Na^+]_i$ , transformant aquest event en una cascada de senyalització. Va seguit de Arl8a (*ADP-ribosylation factor-like 8A*), que forma part de la superfamília Ras, una proteïna de la superfamília de les GTPases monomèriques. Les proteïnes Ras són molt

importants en gran varietat de rutes de transmissió de senyals: integritat del citoesquelet, proliferació, diferenciació, adhesió i apoptosi. Amb sobreexpressió molt similar estan Gdi (*GDP dissociation inhibitor 2*), que regula l'intercanvi GDP/GTP de la majoria de les proteïnes Rab, inhibint la dissociació del GDP d'elles i la subsegüent unió del GTP; Ctnnb1 (*catenin (cadherin associated protein), beta 1*) implicada en la regulació de l'adhesió cel·lular i la transducció de senyals a través de la via de senyalització Wnt; Irs2 (*insulin receptor substrate 2*) proteïna que media els efectes de la insulina, regulant d'aquesta manera diferents processos cel·lulars controlats per la insulina. Només hi ha dos gens reprimits, Rab15 (*RAB15, member RAS oncogene family*) una proteïna G monomèrica de la superfamília Ras; i Raf1 (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*), que forma part de la via de senyalització depenent de Ras. Està implicat en la transducció de senyals mitogèniques des de la membrana al nucli.

Els canvis d'expressió que es presenten al Gràfic 34 engloben el transport (verd), la homeòstasi sanguínia (grana) i la resposta immunitària (blau).



**Gràfic 34.** Classificació de gens involucrats en el transport cel·lular, gens involucrats en la homeòstasi sanguínia i gens involucrats en la resposta immunitària. ■ Transport ■ Homeòstasi sanguínia ■ Resposta immunitària.

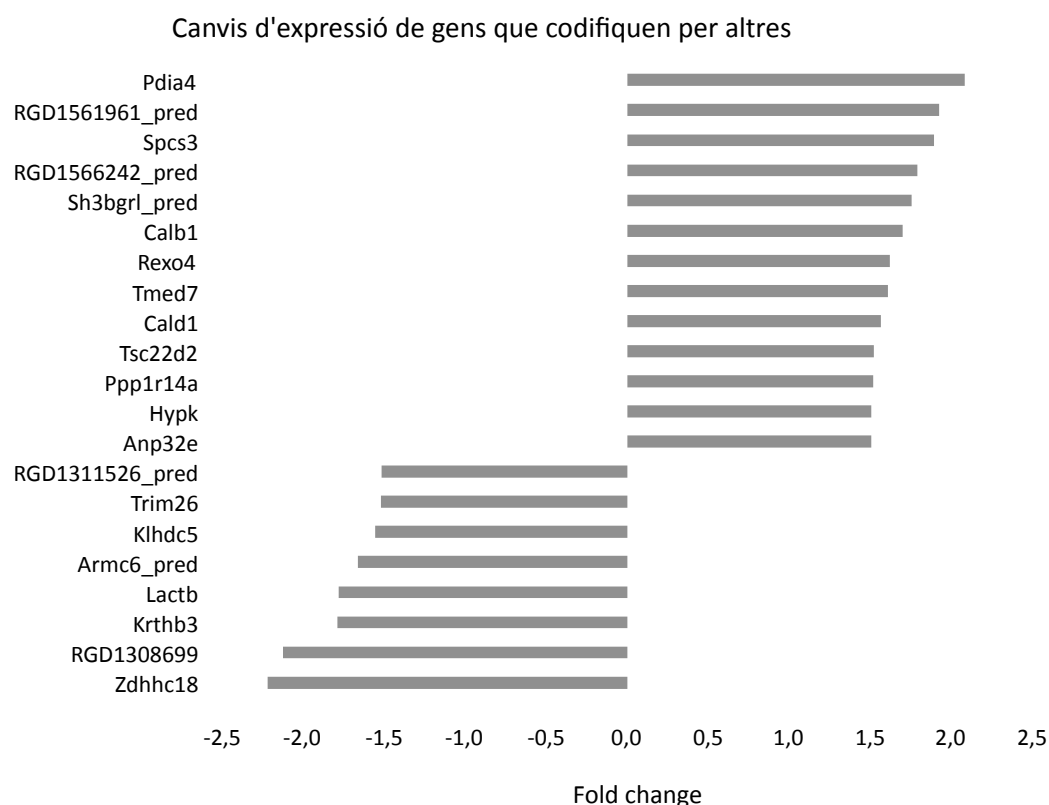
Del Gràfic 34 es desprèn que pràcticament la totalitat d'ells estan sobreexpressats. En el primer grup, referent al transport, hi ha dos gens reprimits i tres sobreexpressats. El principal canvi s'observa en un dels que estan reprimits, RGD1565367 (*similar to Solute carrier family 23, member 2 (sodium-dependent vitamin C transporter 2)*), que és un cotransportador de sodi

i ascorbat. L'altre gen reprimat és Sv2b (*synaptic vesicle glycoprotein 2b*), que podria estar implicat en la regulació de la secreció de les cèl·lules neuronals i endocrines. Pel que fa als gens que estan sobreexpressats, trobem Ergic1 (*endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1*), involucrat en el transport entre reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi, Mk1 (*Mk1 protein*) que és un canal de potassi i Atp2c1 (*ATPase, Ca<sup>++</sup>-sequestering*), enzim dependent de magnesi que catalitza la hidròlisi d'ATP associada al transport de calci.

Dins del grup dels gens implicats en la homeòstasi sanguínia, trobem 4 gens, tots ells sobreexpressats. Hba-a2 (*hemoglobin alpha, adult chain 2*) codifica per una de les cadenes de la hemoglobina, implicada en el transport de l'oxigen als teixits. Prcp (*prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)*) podria estar involucrat en la regulació de la pressió sanguínia i el balanç electrolític. Els dos últims són Adm (*adrenomedullin*), un potent peptid hipotensiu i vasodilatador; i Tfrc (*transferrin receptor*), necessari pel desenvolupament dels eritròcits i el sistema nerviós.

L'últim grup pertany a la resposta immunitària, on només trobem 3 gens, tots ells sobreexpressats. Tsc22d3 (*TSC22 domain family 3*) l'expressió del qual està estimulada per glucocorticoides i la interleuquina 10 que sembla ser juga un paper important en els efectes antiinflamatoris i immunosupressors d'aquest tipus d'esteroides i citoquina. El següent és Ppp3r1 (*protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)*) que és la subunitat reguladora de la calcineurina. La calcineurina és la responsable de l'activació de la transcripció de la interleuquina 2, proteïna que a la vegada és la responsable de la estimulació del creixement i diferenciació dels limfòcits T. L'últim d'aquest grup és Il6ra (*interleukin 6 receptor, alpha*). És part del receptor d'interleuquina 6, citoquina que juga un paper clau en la resposta inflamatòria.

L'última subclassificació, mostrada al Gràfic 35, són els gens que no han estat associats a cap de les anteriors subclassificacions degut a que encara no es coneix la funció que desenvolupa cada un d'ells dins la cèl·lula. Tots ells colorejats en gris.



**Gràfic 35.** Classificació de gens que no han estat associats a cap de les classificacions anteriors. ■ Altres.

Per tal d'integrar la informació dels canvis d'expressió que s'han descrit fins ara, com ja s'ha dit anteriorment, s'ha fet servir el programa MetaCore. Com a resultats ens indica en primer lloc que les 10 vies metabòliques i els 10 processos cel·lulars més afectats pel tractament amb dímer de catequina són els indicats a la Taula 22. Els símbols que apareixen a les figures del MetaCore estan detallats a l'Annex 3.

<b>Vies metabòliques</b>	<b>Processos cel·lulars</b>
Translation_Regulation activity of EIF2	DNA damage_DBS repair
Signal transduction_Activation of PKC via G-Protein coupled receptor	Protein folding_Folding in normal condition
Immune response_IL-10 signaling pathway	Signal transduction_Androgen receptor signaling cross-talk
Transcription_Role of Akt in hypoxia induced HIF1 activation	Cardiac development_Wnt_beta-catenin, Notch, VEGF, IP3 and integrin signaling
Immune response_IL-6 signaling pathway	Cell cycle_Core
Transport_Aldosterone-mediated regulation of ENaC sodium transport	Signal transduction_ESR1-nuclear pathway
Immune response_IL-4 - antiapoptotic action	Cell cycle_G1-S Interleukin regulation
Cytoskeleton remodeling_Reverse signaling by ephrin B	Signal transduction_Androgen receptor nuclear signaling
Immune response_IL-9 signaling pathway	Development_Hedgehog signaling
Immune response_IL-7 signaling in T lymphocytes	Development_Hemopoiesis, Erythropoietin pathway

**Taula 22.** Vies metabòliques i processos cel·lulars més afectats pel tractament amb dímer de catequina.

Pel que fa a les vies metabòliques, interpretant els resultats del MetaCore hom pot concloure que les vies més afectades són la resposta immunitària i la senyalització. En aquestes 10 primeres vies dels 84 gens que s'han carregat només 12 d'ells apareixen en elles, i d'aquests els que s'identifiquen a la majoria d'elles són Raf1 i Irs2. Donat que hi ha molt pocs gens identificats, per tal de fer la discussió, només es tindran en compte aquells que tinguin uns nivells d'expressió més contundents i aquelles vies identificades pel MetaCore que aportin informació per explicar els canvis globals segons la classificació pròpia.

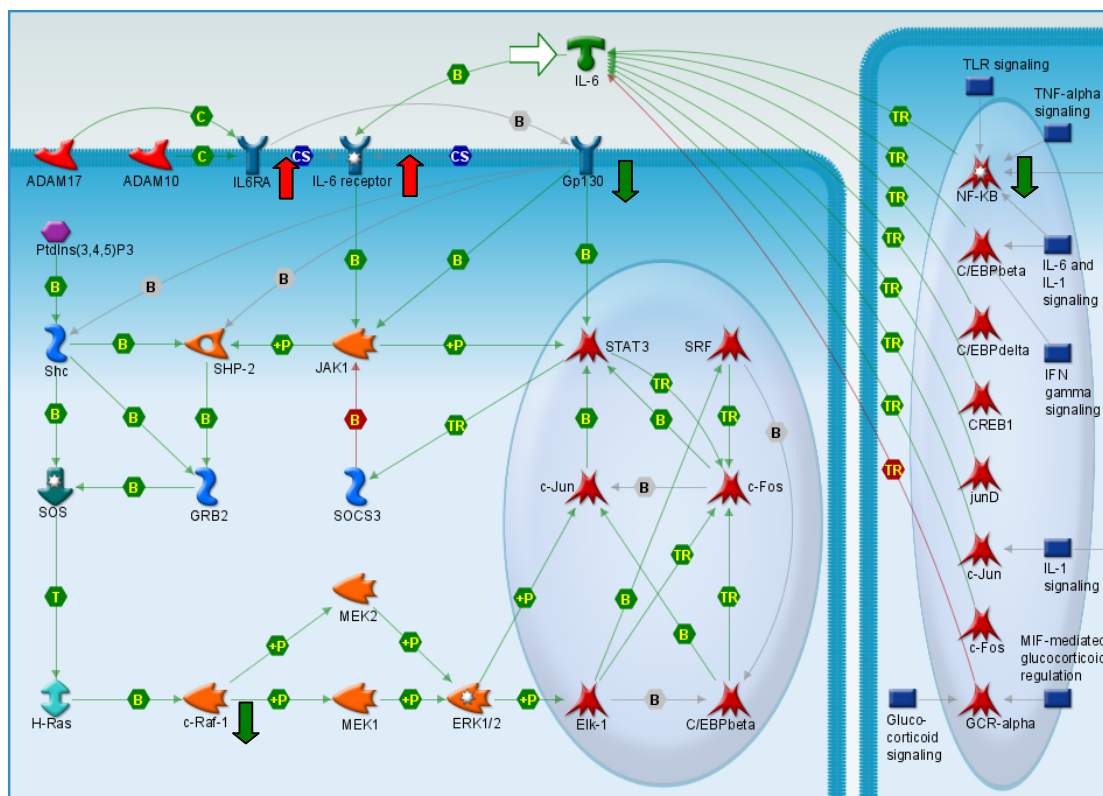
Tenint en compte els gens modificats en la classificació de metabolisme, el gen amb el canvi més important és Ndufa11, component del Complex mitocondrial I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa; EC 1.6.5.3). El Complex I és un gran complex multienzimàtic que catalitza el primer pas de la cadena respiratòria mitocondrial, on transfereix electrons del NADH a la ubiquinona (coenzim Q) acompanyat per la translocació de protons a través de la cadena mitocondrial interna [202]. Un estudi realitzat en humans [203], mostra com la deficiència del complex I és el defecte més comú de la cadena respiratòria mitocondrial, i que es manifesta clínicament amb diferents tipus de desordres com el cardíac, hepàtic o renal, així com malalties neonatals com l'acidosi làctica o la malaltia de Leigh, deguts a un desordre en la generació d'energia. En tots els pacients d'aquest estudi es va identificar una mutació en el gen Ndufa11. Donat que és l'únic gen del complex I que mostrava una mutació, es suggereix que aquest podria ser crucial en la desestabilització del complex I. No hi ha estudis que mostrin efectes directes de cap tipus de polifenol o compost natural sobre Ndufa11, encara que sí que hi ha algun treball de l'efecte de tannins [204] i resveratrol [205] inhibint el complex I, encara que les subunitats afectades són unes altres.

Un altre gen a tenir en compte és Lpin2, que forma part de la família de les lipines actuant com enzims fosfatidat fosfatasa (PAP), els quals es requereixen per la biosíntesi de glicerofosfolípids així com a coactivadors transcripcionals que regulen l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic [206]. L'augment de l'activitat fosfatidat fosfatasa a fetge és important a l'hora d'augmentar la capacitat d'aquest per emmagatzemar àcids grassos així com triglicèrids per poder ser utilitzats posteriorment per la  $\beta$ -oxidació o la secreció de VLDL [207]. PAP1 a fetge catalitza la conversió de fosfatidat a diacilglicerol, substrat clau per la biosíntesi de triglicèrids i fosfolípids. L'increment de Lpin2 suposaria una inducció en la síntesi de triglicèrids. Un estudi realitzat amb animals i utilitzant hesperitin, un flavonoide present principalment als cítrics, s'observa una disminució tant de l'activitat PAP com de l'acumulació de triglicèrids al fetge quan els animals han estat tractats amb àcid oròtic, mentre que els animals no pateixen aquest efecte quan no són tractats amb aquest àcid [208].

Dins del metabolisme de carbohidrats es troba sobreexpressat Pck1, que és la principal diana per la regulació de la gluconeogènesi [209]. La seva transcripció pot ser regulada per diferents factors com la insulina, els glucocorticoides, cAMP o la dieta per tal d'ajustar la producció de glucosa als requeriments necessaris. Hi ha diversos treballs que mostren la capacitat de Pck1 de convertir precursors gluconeogènics com piruvat, lactat o alanina en glicerol. L'augment de l'expressió d'aquest gen estaria relacionada amb la reesterificació d'àcids grassos i la conseqüent acumulació de triglicèrids a fetge [210]. En un treball realitzat amb la línia cel·lular d'adipòcits 3T3-L1 [211], EGCG induïx una sobreexpressió de Pck1 en les primeres fases de diferenciació, fet que induïx l'acumulació de greixos. Un altre gen a destacar és Slc2a1 (Glut1), pertanyent a la família de transportadors de glucosa, pel qual s'ha vist que la seva expressió es troba incrementada a fetge després d'un tractament amb un extracte de polifenols de té negre [64]. En aquest treball a més, també s'observa com aquest extracte incrementa l'expressió de Irs2, implicat en la via de senyalització de la insulina. Aquest és un dels gens que és troba repetidament implicat en les vies més destacades segons el MetaCore. Aquest treball suggereix que aquests resultats podrien regular la captació de glucosa i la senyalització d'insulina en estats d'intolerància a la glucosa, resistència a la insulina, diabetis i obesitat.

A continuació es mostra una de les vies identificades pel MetaCore, la qual correspon a la via de senyalització mitjançant IL-6 (Figura 22). La IL-6 provoca una gran varietat de respostes cel·lulars i fisiològiques, entre elles la resposta immune, la inflamació, l'hematopoesi i l'oncogènesi, regulant el creixement cel·lular, l'activació gènica, la proliferació, la supervivència així com la diferenciació [212]. IL-6 actua a través del seu receptor, format per dues subunitats, IL6RA que és específic, i gp130 encarregat de transduir la senyal i que es comparteix amb altres citoquines de la família IL-6 [213]. Aquest mapa mostra la sobreexpressió de IL6RA i la repressió de gp130. La unió de IL-6 al seu receptor inicia una cascada d'events cel·lulars de senyalització però necessita unir-se a gp130 perquè aquesta senyal tingui lloc. El que s'observa a més en aquesta via, és una disminució de l'expressió de c-Raf-1, gen implicat en la majoria de les vies més significatives segons el programa MetaCore. La proteïna codificada per aquest gen és una MAP quinasa quinasa quinasa (MAP3K), la qual funciona riu avall a la família de Ras (GTPases associades a membrana), on s'uneix directament [214]. Si aquesta proteïna és activada, en el nostre cas la seva expressió es troba reprimida, fosforila MEK1 i MEK2, dues proteïnes quinasa, que al seu torn fosforilen i activen unes altres proteïnes quinasa: ERK1 i ERK2. L'activació de ERKs juga un paper important en el control d'una sèrie de gens implicats en el cicle de divisió cel·lular, apoptosi, diferenciació i migració

cel·lular. Hi ha treballs que relacionen l'activació de Raf1 amb una progressió del cicle cel·lular, protegint les cèl·lules d'entrar en apoptosi per diferents vies [215].



**Figura 22.** Canvis en la via de senyalització per IL-6 segons el programa MetaCore en cèl·lules FAO tractades amb 10 mg/l de dímer de catequina.

Seguint el camí d'apoptosi hi ha una sèrie de gens que es troben regulats pel dímer de catequina, com Hsp90b1 i Cdkn2d. Les *heat shock proteins* (HSPs) són xaperones que actualment s'han relacionat com a reguladors bioquímics emergents del creixement cel·lular, l'apoptosi o l'homeòstasi proteica [216]. Encara que el programa MetaCore no situa aquesta via dins de les 10 vies més afectades, és un punt de gran interès donat que el tractament amb GSPE sembla actuar sobre aquest procés de manera significativa.



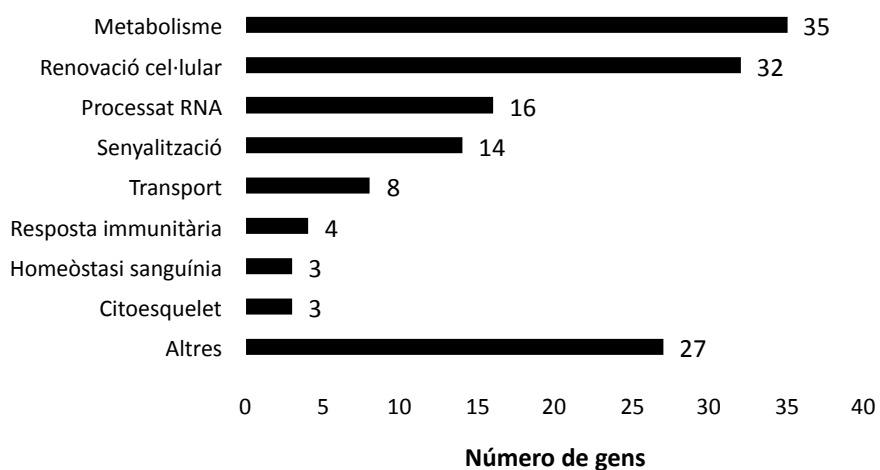
#### 4.4.3. Trímer de catequina

En les cèl·lules *FAO* després del tractament de 5h amb 50 mg/l de trímer de catequina, el transcriptoma canvia significativament. Així, de les 41.012 sondes testades, 14.996 tenen una expressió 2 vegades superior al seu valor basal. D'aquestes, 2.138 canvien de forma significativa amb una  $p < 0,05$  després d'aplicar un test t de Student. Hem fet servir el criteri de considerar només aquells gens pels quals el canvi és com a mínim un 50% de sobreexpressió o repressió; és un criteri que hom acostuma a aplicar per tal de garantir la robustesa de les conclusions a les que es pugui arribar. Fent servir aquest criteri s'identifiquen **142 gens** dels que es pot afirmar amb seguretat que la seva expressió està modificada en condicions de tractament agut amb proantocianidines. Detallat a l'Annex 1.

Per tal de comprendre el significat metabòlic dels canvis d'expressió detectats, s'analitza com anteriorment segons el criteri propi de classificació (Figura 6). Addicionalment a l'anàlisi individual dels canvis d'expressió observats s'ha introduït la informació al programa MetaCore per poder integrar els canvis individuals d'expressió en el context de vies metabòliques i processos cel·lulars.

Dels 142 gens amb canvis robusts d'expressió, el programa MetaCore reconeix 51 dins dels seus mapes de vies metabòliques i 129 els reconeix com a objectes d'una xarxa que tenen un nexa en comú, el qual no té perquè ser un dels gens modificats significativament. Tant els mapes de vies metabòliques com les xarxes de processos les classifica estadísticament aplicant un test corregit amb *false discovery rate*  $p < 0,05$  que permet rebutjar processos o objectes amb una significativitat dubtosa, assegurant que els resultats obtinguts no contenen falsos positius. D'aquests, 77 es troben sobreexpressats i 65 reprimits, i la distribució envers el p-valor és del 75% amb  $p \leq 0,01$ .

Segons el criteri propi de classificació, els processos cel·lulars que resulten afectats són els indicats a la Figura 23, on s'indiquen per a cada procés el conjunt de gens amb canvis d'expressió.

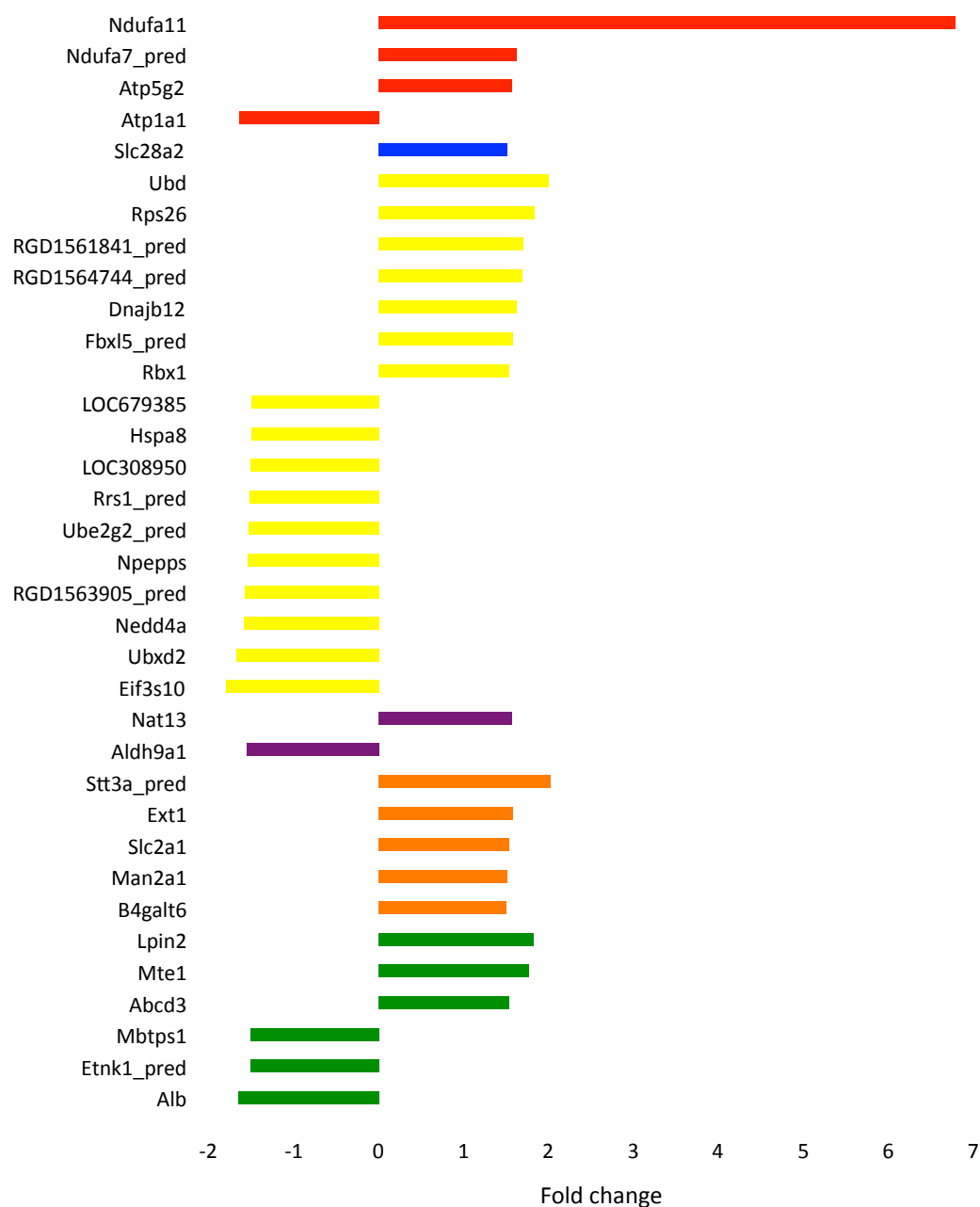


**Figura 23.** Classificació de gens afectats per un tractament de 50 mg/l de trímer de catequina durant 5h i agrupats en processos biològics segons la classificació pròpia emprada.

Tal com es pot veure a la Figura 23, el procés més afectat és el de metabolisme, en el qual es troben gens involucrats en el metabolisme de lípids, glúcids, xenobiòtics, proteïna, nucleòtids i energètic. Segueixen en importància els gens implicats en la renovació cel·lular, processat de RNA i senyalització. El detall dels gens que canvien d'expressió es representa a l'Annex 1. Tot seguit es fa una descripció dels principals canvis observats en els diferents grups.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en el metabolisme es presenten al Gràfic 36, indicant en diferents colors la tipologia de metabolisme a la que pertanyen: metabolisme lipídic (verd), metabolisme glucídic (taronja), metabolisme de xenobiòtics (lila), metabolisme proteic (groc), metabolisme de nucleòtids (blau) i metabolisme energètic (vermell).

### Canvis d'expressió de gens que codifiquen per metabolisme



**Gràfic 36.** Classificació de gens segons el metabolisme cel·lular en el qual estan implicats. ■ Metabolisme lipídic ■ Metabolisme glucídic ■ Metabolisme de xenobiòtics ■ Metabolisme proteic ■ Metabolisme de nucleòtids ■ Metabolisme energètic.

Del Gràfic 36 es desprèn que els principals canvis metabòlics es donen en el metabolisme proteic, seguit del metabolisme lipídic, i el canvi més contundent està dins del metabolisme energètic.

Dins del metabolisme lipídic, hi ha tants gens sobreexpressats com reprimits. El gen que experimenta la repressió més forta Alb (*albumin*), proteïna soluble que representa la meitat de proteïna present al sèrum i que desenvolupa una funció important en el transport d'àcids grassos. Amb una repressió similar estan Mbtps1 (*membrane-bound transcription factor peptidase, site 1*), que té un paper central en el metabolisme lipídic ja que catalitza el primer pas en l'activació proteolítica de SREBPs (*sterol regulatory element-binding proteins*) i Etnk1 (*ethanolamine kinase 1*), quinasa implicada en la via de síntesi de fosfatidiletanolamina. Pel que fa als gens que es troben sobreexpressats, són els mateixos afectats pel dímer de catequina i amb una sobreexpressió molt semblant. Aquests gens són en ordre descendent: Lpin2 (*lipin 2*), Mte1 (*mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1*) i Abcd3 (*ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3*).

Pel que fa al metabolisme glucídic, tots cinc gens estan sobreexpressats. Amb sobreexpressió molt similar estan Ext1 (*exostoses (multiple) 1*), implicat en la biosíntesi d'heparan sulfat; Man2a1 (*mannosidase, alpha, class 2A, member 1*), que catalitza el primer pas de la biosíntesi de N-glicans complexos; B4galt6 (*UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6*), que es requereix per la biosíntesi de glicoesfingolípids; i finalment i en comú amb el dímer de catequina Slc2a1 (*solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1*) el principal transportador de glucosa i Stt3a (*STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A*).

Dins del metabolisme de xenobiòtics hi ha dos gens. Nat13 (*N-acetyltransferase 13*), aquest es troba sobreexpressat i és probablement el component catalític d'un complex amb activitat acetiltransferasa. Les N-acetiltransferases catalitzen la transferència de grups acetil des de l'acetil-CoA a les arilamines. Aldh9a1 (*aldehyde dehydrogenase family 9, subfamily A1*) està reprimat. Aquest gen codifica per un enzim que catalitza la deshidrogenació de gamma-aminobutiraldehid a àcid gamma-aminobutíric (GABA), implicat en processos de toxicació.

El metabolisme proteic està altament alterat, hi ha 17 gens afectats. Hi ha una sèrie de gens implicats en la síntesi de proteïnes: Rps26 (*ribosomal protein S26*), RGD1561841 (*similar to ribosomal protein L31*) i RGD1564744 (*similar to 60S acidic ribosomal protein P1*), aquests 3 sobreexpressats. Els que estan reprimits són Eif3s10 (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A*), RGD1563905 (*similar to ribosomal protein L19*) i Rrs1 (*RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae)*) implicat en la biogènesi de ribosomes. Un altre grup dins del metabolisme proteic són els gens implicats en la degradació proteica per mitjà de la ubiquitinació. Hi ha dos gens reprimits, són Nedd4a (*neural precursor cell expressed,*

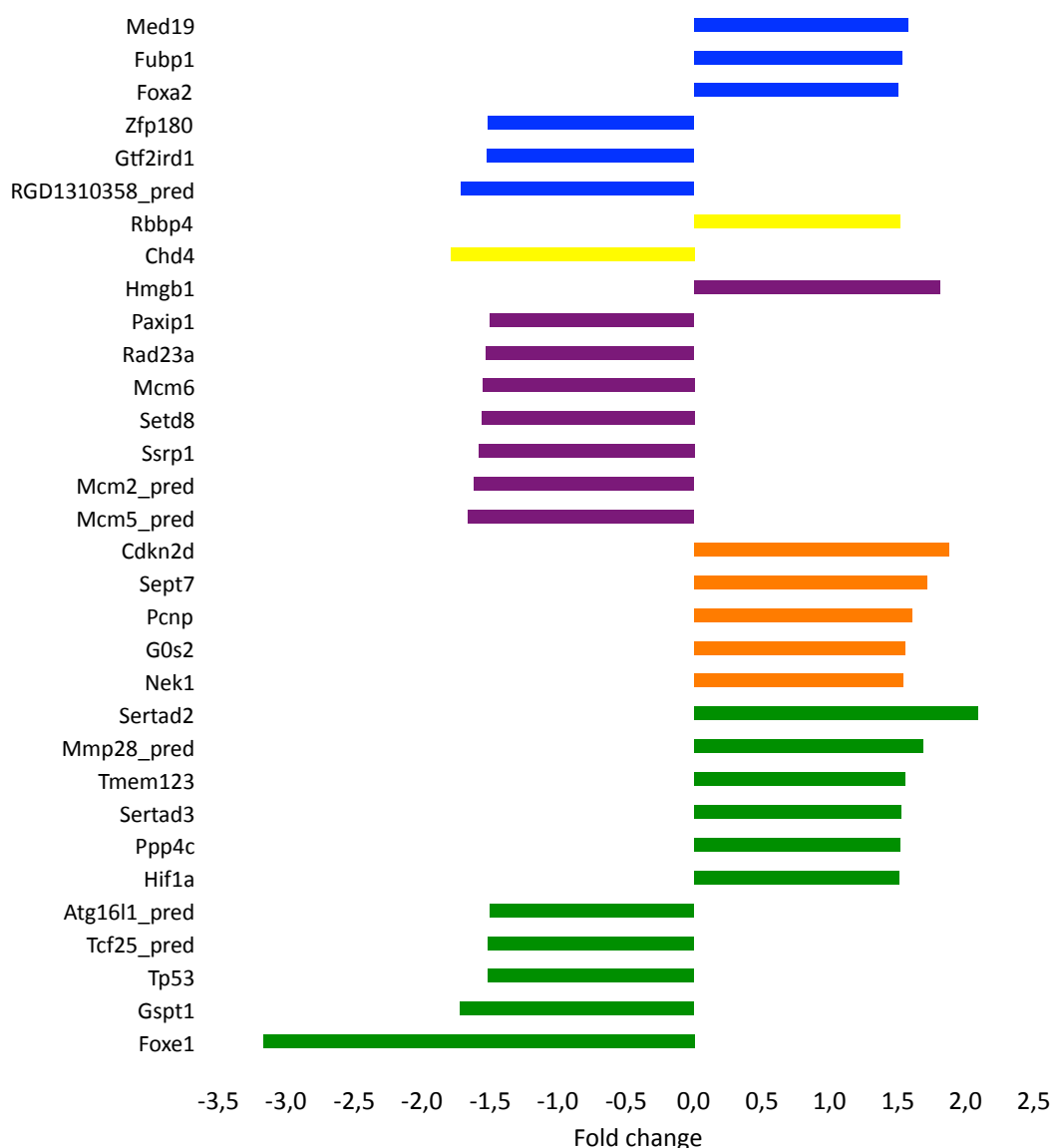
*developmentally down-regulated gene 4a*) i Ube2g2 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast)*). Pel que fa als que estan sobreexpressats són Ubd (*ubiquitin D*), Fbxl5 (*F-box and leucine-rich repeat protein 5*) i Rbx1 (*ring-box 1*). Un altre gen implicat en la degradació proteica i que es troba reprimat és Ubxd2 (*UBX domain protein 4*). Aquest gen i l'anterior Ube2g2 estan implicats en la degradació proteica associada a reticle endoplasmàtic (ERAD). La resta de gens reprimats són Npepps (*aminopeptidase puromycin sensitive*), que hidrolitza aminoàcids i una sèrie de gens que codifiquen per xaperones i que estan implicats en el plegament de proteïnes: Dnajb12 (*dnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12*); Hspa8 (*heat shock protein A8*); LOC679385 (*similar to heat shock protein 8*); i LOC308950 (*similar to heat shock protein 1 (chaperonin)*).

Dins del metabolisme de nucleòtids només hi ha un gen: Slc28a2 (*solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2*), implicat en la captació de nucleòsids de purina.

Finalment, en el metabolisme energètic hi ha quatre gens, Ndufa11 (*NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11*), en comú amb el dímer de catequina, pateix una sobreexpressió molt més forta que amb el dímer, de gairebé 7 vegades el control. Hi ha dos gens més sobreexpressats, Ndufa7 (*NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7 (B14.5a) (predicted)*), subunitat de la cadena respiratòria mitocondrial i Atp5g2 (*ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C2 (subunit 9)*), subunitat de l'ATP sintasa mitocondrial. Només hi ha un gen reprimat, Atp1a1 (*ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide*), component catalític de l'enzim actiu que catalitza la hidròlisi d'ATP acoblada a l'intercanvi de ions a través de la membrana plasmàtica.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en la renovació cel·lular es presenten al Gràfic 37, indicant en diferents colors la tipologia de classificació a la que pertanyen: apoptosi/desenvolupament/proliferaió/creixement (verd), regulació del cicle cel·lular (taronja), processat del DNA (lila), histones/helicases/remodelació de la cromatina (groc) i regulació de la transcripció (blau).

Canvis d'expressió de gens que codifiquen per la renovació cel·lular



**Gràfic 37.** Classificació de gens involucrats en la renovació del cycle cel·lular. ■ Apoptosi/Desenvolupament/Proliferació/Creixement ■ Regulació del cycle cel·lular ■ Processat DNA ■ Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina ■ Regulació de la transcripció.

Del Gràfic 37 es desprèn que els principals canvis es donen en el subgrup d'apoptosi/ desenvolupament/proliferació/creixement. Hi ha una sèrie de gens en comú amb l'efecte del dímer de catequina. Els que estan reprimits són Foxe1 (*forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)*) i Gspt1 (*G1 to S phase transition 1*). L'efecte del trímer de catequina és més contundent sobre ambdós gens. Els que estan sobreexpressats en comú són Sertad2 (*SERTA domain containing 2*), Sertad3 (*SERTA domain containing 3*), Tmem123 (*transmembrane protein 123*) i Ppc4 (*protein serine/threonine phosphatase 4*), aquests 4 amb el mateix grau de

sobreexpressió que el dímer. Pel que fa als gens reprimits pel trímer hi ha Tp53 (*tumor protein p53*), gen que codifica per la proteïna tumoral p53, la qual respon a diversos tipus d'estrès cel·lular de manera que pot regular gens implicats en l'apoptosi, sensecència, reparació del DNA o canvis en el metabolisme; Tcf25 (*transcription factor 25 (basic helix-loop-helix)\_predicted*), juga un paper important en el control de la mort cel·lular i Atg16l1 (*ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)*), essencial per l'autofàgia. Pel que fa als gens que es troben sobreexpressats en ordre ascendent trobem Hif1a (*hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*) que juga un paper essencial en respostes homeostàtiques cel·lulars i sistèmiques a la hipoxia i Mmp28 (*matrix metalloproteinase 28 (epilysin) (predicted)*), implicat en la degradació de la matriu extracel·lular tant en processos fisiològics com en el desenvolupament embrionari, la reproducció o la remodelació dels teixits, així com en processos patològics, és per això que juga un paper important en la homeòstasi dels teixits i la reparació de les ferides.

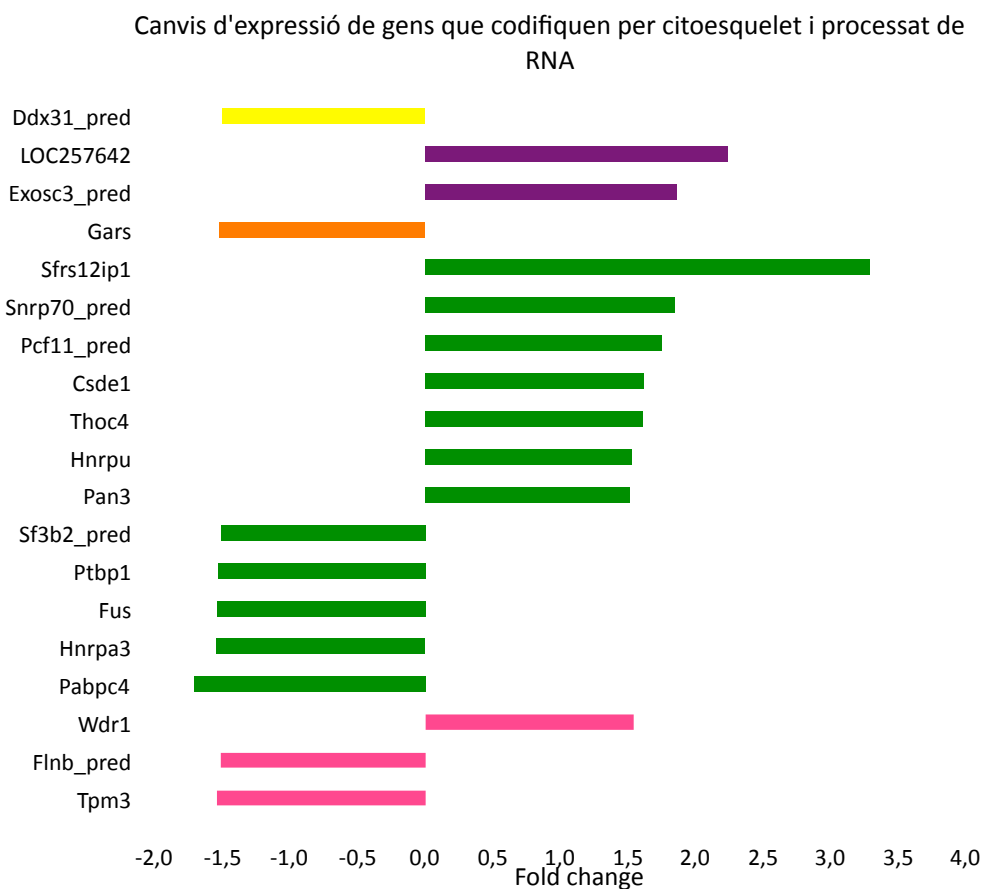
Dins de la regulació del cicle cel·lular, hi ha 5 gens implicats, tots ells sobreexpressats. Tres d'ells en comú amb el dímer de catequina i amb el mateix ordre d'expressió: Cdkn2d (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2D*); Sept7 (*septin 7*); i Pcnp (*similar to PEST-containing nuclear protein*). El altres dos gens són G0s2 (*G0/G1 switch gene 2*), es podria requerir per fer entrar les cèl·lules en fase G1; i Nek1 (*NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 11*), implicat en la meiosi.

Pel que fa al grup implicat en el processat de DNA, majoritàriament estan reprimits. L'únic sobreexpressat és Hmgb1 (*high mobility group box 1*) i també està afectat pel dímer. Respecte als gens que es troben reprimits, hi ha dos en comú amb el dímer: Rad23a (*RAD23a homolog (S. cerevisiae)*), i Mcm5 (*minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) (predicted)*). La resta de gens reprimits són: Mcm2 (*minichromosome maintenance deficient 2 mitotin (S. cerevisiae) (predicted)*) i Mcm6 (*minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)*), implicats tots dos en la replicació del genoma eucariòtic. Ssrp1 (*structure specific recognition protein 1*), codifica per una subunitat d'un heterodímer que està involucrat en el desensamblatge del nucleosoma i l'elongació de la transcripció; Setd8 (*similar to SET domain-containing protein*), és una histona metiltransferasa requerida per la proliferació cel·lular probablement perquè contribueix a mantenir correctament l'estructura del DNA durant la mitosi; i Paxip (*PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1*) codifica per una proteïna essencial en el manteniment de la estabilitat del genoma, la condensació de la cromatina i la progressió durant la mitosi.

Dins del grup de Histones/Helicases/remodelació cromatina, hi ha dos gens, un d'ells en comú amb el dímer: Rbbp4 (*retinoblastoma binding protein 4*), implicat en la remodelació de la cromatina. L'altre gen és Chd4 (*chromodomain helicase DNA binding protein 4*), aquest està reprimit.

Pel que fa als gens implicats en la regulació de la transcripció, hi ha 6 gens. Els que es troben reprimits són: RGD1310358 (*similar to NNX3 (predicted)*), Gtf2ird1 (*general transcription factor II I repeat domain-containing 1*) i Zfp180 (*zinc finger protein 180*). Els que estan sobreexpressats són: Med19 (*mediator complex subunit 19*), Fubp1 (*far upstream element (FUSE) binding protein 1*) i Foxa2 (*forkhead box A2*), que és un factor nuclear d'hepatòcits i actua com a activador transcripcional de gens específics del fetge.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en el manteniment del citoesquelet i el processat de RNA es presenten al Gràfic 38, indicant en diferents colors la tipologia de classificació a la que pertanyen: citoesquelet (rosa), mRNA (verd), tRNA (taronja), rRNA (lila) i helicases de RNA (groc).



**Gràfic 38.** Classificació de gens involucrats en el manteniment del citoesquelet i el processat del RNA.  
 ■ Citoesquelet ■ mRNA ■ tRNA ■ rRNA ■ Helicases RNA.



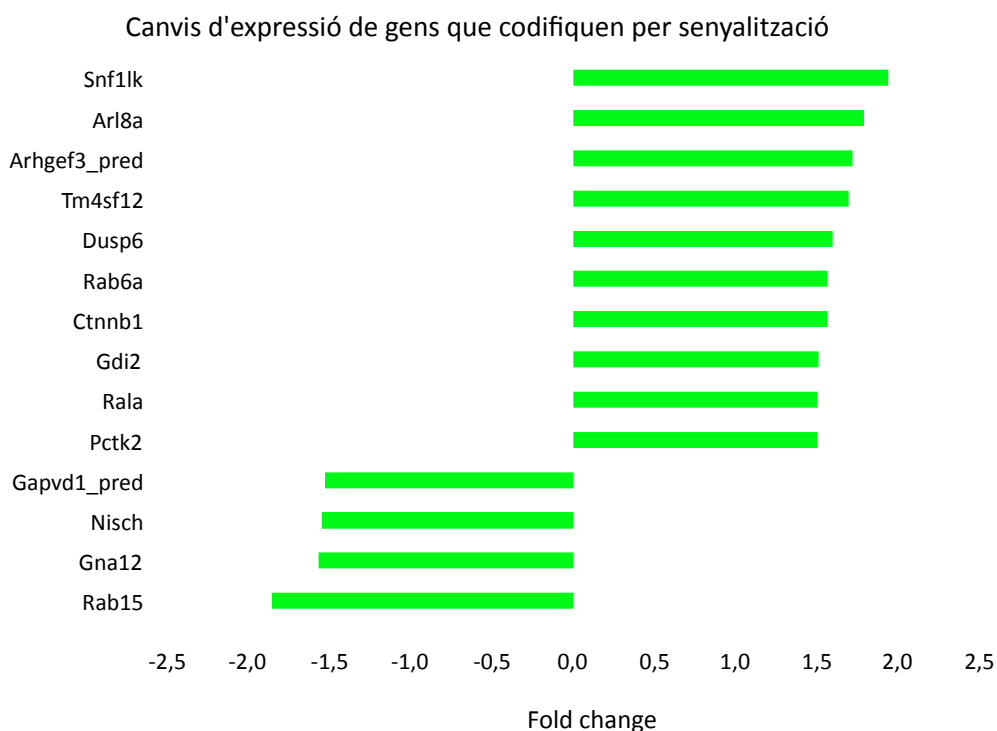
Del Gràfic 38 es desprèn que el grup més afectat són els gens implicats en el processat de mRNA.

Dins del grup del citoesquelet hi ha 3 gens. Només un està sobreexpressat *Wdr1 (WD repeat domain 1)*, la proteïna resultant indueix el desensamblatge dels filaments d'actina. Els gens reprimits són *Tpm3 (tropomyosin 3, gamma)* que pertany a la família de les tropomiosines implicades en el sistema contràctil de les cèl·lules musculars llises i estriades, i en el citoesquelet de les cèl·lules no-musculars; i *Flnb (filamin, beta (predicted))* que connecta els constituents de la membrana cel·lular al citoesquelet d'actina.

Pel que fa al grup de gens implicats en el processat de RNA, el més alterat és el de processat de mRNA. Dins d'aquest grup hi ha tres gens afectats també pel dímer, aquests són *Sfrs12ip1 (SFRS12-interacting protein 1)*, *Csde1 (cold shock domain containing E1, RNA binding)* i *Thoc4 (THO complex 4)*. L'efecte del trímer és lleugerament superior. La resta de gens sobreexpressats són *Snrp70 (U1 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A (predicted))*, que forma part del spliceosoma, *Pcf11 (cleavage and polyadenylation factor subunit homolog (S. cerevisiae) (predicted))* involucrat en el processat de pre-mRNA, *Hnrpu (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U)*, implicat en el metabolisme i transport de mRNA, i *Pan3 (polyA specific ribonuclease subunit homolog)* implicat en la degradació dels mRNAs citoplasmàtics. Pel que fa als gens reprimits, hi ha 5, en ordre descendent són *Pabpc4 (poly A binding protein, cytoplasmic 4)* implicat en els processos citoplasmàtics reguladors del metabolisme de mRNA; *Hnrpa3 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3)* important en el transport citoplasmàtic de mRNA; *Fus (fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human))* que forma part del complex de les ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies (hnRNP) implicat en el *splicing* de pre-mRNA i el seu transport al citoplasma; *Ptbp1 (polypyrimidine tract binding protein 1)*, també pertany a les hnRNPs; i finalment *Sf3b2 (splicing factor 3b, subunit 2 (predicted))*. Pel que fa al processat de tRNA només hi ha un gen, *Gars (glycyl-tRNA synthetase)* que catalitza la unió de la glicina a tRNA(Gly). Dins del grup de rRNA hi ha dos gens, els mateixos afectats pel dímer de catequina: *Exosc3 (exosome component 3 (predicted))* i *LOC257642 (rRNA promoter binding protein)*. Per finalitzar el grup de processat de RNA hi ha una helicasa, la *Ddx31 (DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 31 (predicted))*.

Els canvis d'expressió dels gens implicats en la senyalització es presenten al Gràfic 39. És un grup bastant heterogeni ja que inclou diferents tipus de senyalització. Principalment inclou

quinases, implicades en la fosforilació/desfosforilació, encara que també es poden trobar gens implicats en la transmissió de senyals per mitjà de la sinapsi.



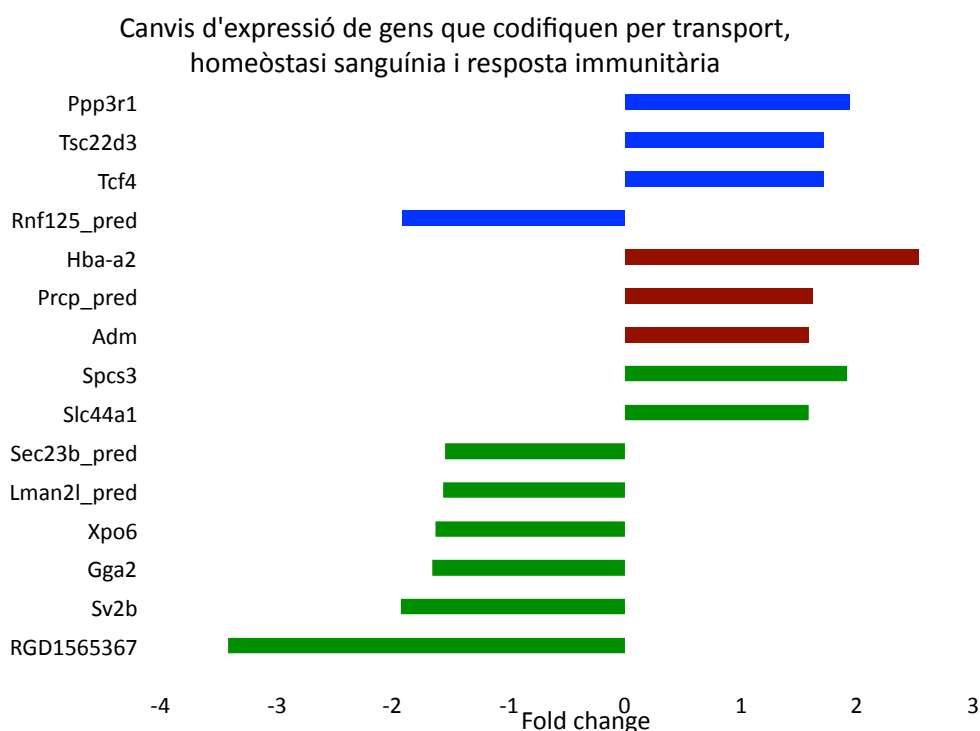
**Gràfic 39.** Classificació de gens involucrats en diferents processos de senyalització. ■ Senyalització.

Del Gràfic 39 es desprèn que hi ha una sobreexpressió generalitzada dels gens implicats en la senyalització. Hi ha 6 gens en comú amb l'efecte del dímer de catequina, tots ells amb el mateix grau d'expressió. D'aquests, només hi ha un reprimat: Rab15 (*RAB15, member RAS oncogene family*) una proteïna G monomèrica de la superfamília Ras. Els altres que es troben sobreexpressats en ordre decreixent són Snf1lk (*SNF1-like kinase*), Arl8a (*ADP-ribosylation factor-like 8A*), Tm4sf12 (*transmembrane 4 superfamily member 12*), Ctnnb1 (*catenin (cadherin associated protein), beta 1*) i Gdi2 (*GDP dissociation inhibitor 2*). Hi ha 3 gens més reprimats. Gna12 (*Guanine nucleotide binding protein, alpha 12*) és una proteïna G, involucrada en la transducció de senyals; Nisch (*nischarin*) que s'uneix a diversos lligands d'imidazolina que indueixen l'inici de cascades de senyalització dirigides a la supervivència cel·lular, el creixement o la migració; i finalment Gapvd1 (*GTPase activating protein and VPS9 domains 1 (predicted)*) que actua tant com a proteïna activadora de GTPasa (GAP) o com a factor d'intercanvi de nucleòtids de guanina (GEF). Pel que fa als gens sobreexpressats, hi ha tres GTPases: Arhgef3 (*Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3 (predicted)*), activa RhoA i RhoB; Rab6a (*RAB6A, member RAS oncogene family*) té una activitat GTPasa baixa; i Rala (*v-ras simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)*) pertanyent a la superfamília de les

## 4 RESULTATS i DISCUSSIÓ

GTPases petites Ras. Els altres dos gens sobreexpressats que queden són Dusp6 (*dual specificity phosphatase 6*) que inactiva les seves quinases diana desfosforilant els residus de fosfoserina/treonina i fosfotirosina que té especificitat per la família ERK; i Pctk2 (*PCTAIRE protein kinase 2*) pertany a la família de proteïnes quinasa serina/treonina.

Els canvis d'expressió que es presenten al Gràfic 40 engloben el transport (verd), la homeòstasi sanguínia (grana) i la resposta immunitària (blau).



**Gràfic 40.** Classificació de gens involucrats en el transport cel·lular, gens involucrats en la homeòstasi sanguínia i gens involucrats en la resposta immunitària. ■ Transport ■ Homeòstasi sanguínia ■ Resposta immunitària.

Del Gràfic 40 es desprèn que pràcticament el grup més alterat és el del transport. Dins d'aquest hi ha dos gens en comú amb el dímer, tots dos reprimits i amb un efecte més contundent per part del trímer. Aquests són RGD1565367 (*similar to Solute carrier family 23, member 2 (sodium-dependent vitamin C transporter 2)*) i Sv2b (*synaptic vesicle glycoprotein 2b*). Els altres gens reprimits d'aquest grup són Gga2 (*Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2*), regula el tràfic de proteïnes entre l'aparell de Golgi i els lisosomes; Xpo6 (*Exportin 6*) implicada en el transport des del nucleoplasma al citoplasma a través dels porus nuclears; Lman2l (*lectin, mannose-binding 2-like (predicted)*) involucrat en l'exportació de glicoproteïnes des del reticle endoplasmàtic; i Sec23b (*SEC23B (S. cerevisiae) (predicted)*) implicat en el tràfic de vesícules. Pel que fa als gens sobreexpressats, només hi ha

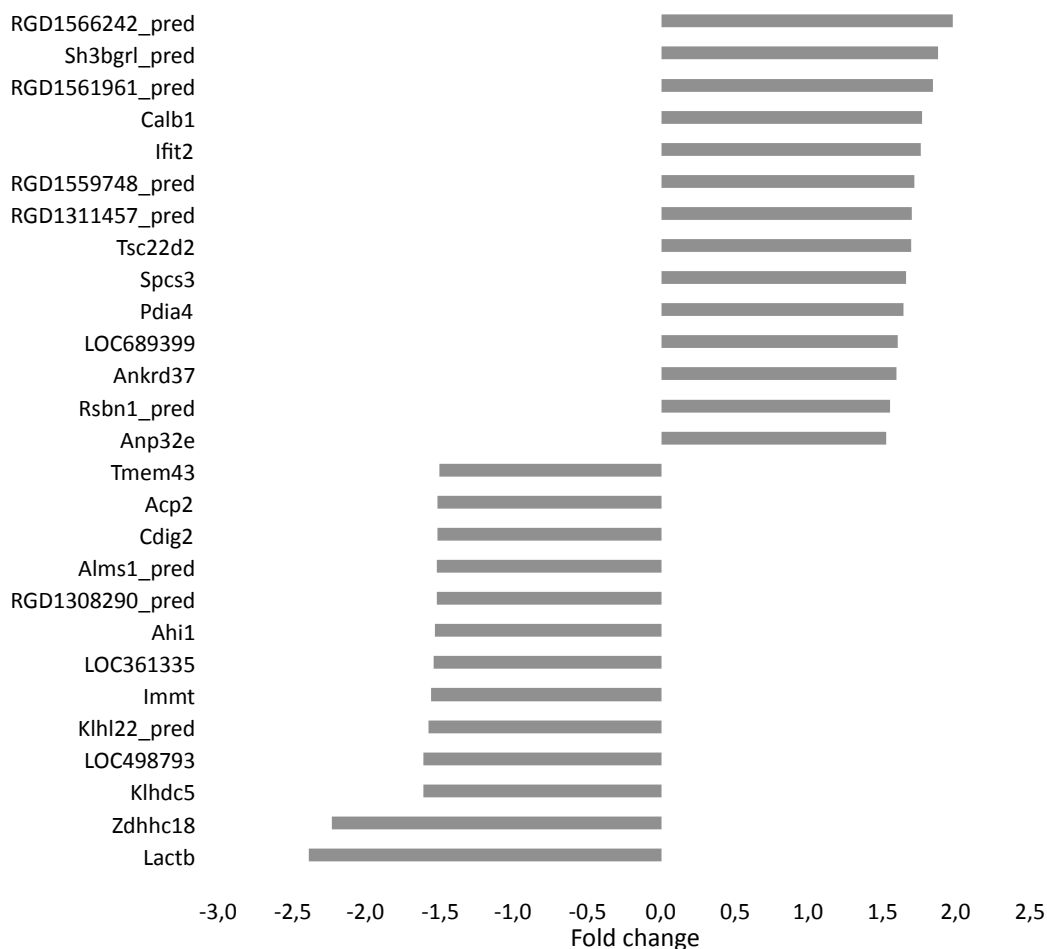
dos, *Spcs3* (*signal peptidase complex subunit 3 homolog*) que talla seqüències senyal de proteïnes perquè aquestes siguin dirigides a les vies de secreció i *Slc44a1* (*solute carrier family 44, member 1*) un transportador de colina.

Dins del grup d'homeòstasi sanguínia hi ha 3 gens afectats també pel dímer de catequina. Aquest són *Hba-a2* (*hemoglobin alpha, adult chain 2*), *Prcp* (*prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)*) i *Adm* (*adrenomedullin*).

L'últim grup pertany a la resposta immunitària, on només trobem 4 gens, només un d'ells està reprimit, *Rnf125* (*ring finger protein 125 (predicted)*) que funciona com a regulador positiu en la via de senyalització del receptor de les cèl·lules T. Dels 3 gens que hi ha sobreexpressats, 2 coincideixen amb els afectats pel dímer, *Tsc22d3* (*TSC22 domain family 3*) i *Ppp3r1* (*protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)*). L'altre gen sobreexpressat és *Tcf4* (*transcription factor 4*) expressat majoritàriament a les cèl·lules pre-B.

L'última subclassificació, mostrada al Gràfic 41, són els gens que no han estat associats a cap de les anteriors subclassificacions degut a que encara no es coneix la funció que desenvolupa cada un d'ell dins la cèl·lula. Tots ells colorejats en gris.

### Canvis d'expressió de gens que codifiquen per altres



**Gràfic 41.** Classificació de gens que no han estat associats a cap de les classificacions anteriors. ■ Altres.

Per tal d'integrar la informació dels canvis d'expressió que s'ha descrit fins ara, com ja s'ha dit anteriorment, s'ha fet servir el programa MetaCore. Com a resultats ens indica en primer lloc que les 10 vies metabòliques i els 10 processos cel·lulars més afectats pel tractament amb trímer de catequina són els indicats a la Taula 23. Els símbols que apareixen a les figures del MetaCore estan detallats a l'Annex 3.

Vies metabòliques	Processos cel·lulars
Transcription_Role of Akt in hypoxia induced HIF1 activation	Transcription_mRNA processing
Proteolysis_Putative ubiquitin pathway	Protein folding_Folding in normal condition
Proteolysis_Role of Parkin in the Ubiquitin-Proteasomal Pathway	Protein folding_ER and cytoplasm
Regulation of degradation of deltaF508 CFTR in CF	Proteolysis_Ubiquitin-proteasomal proteolysis
Neurodisease_Parkin disorder under Parkinson disease	Protein folding_Protein folding nucleus
Cell cycle_Start of DNA replication in early S	Cell cycle_Core

phase	
Normal and pathological TGF-beta-mediated regulation of cell proliferation	Protein folding_Response to unfolded proteins
G-protein signaling_RhoA regulation pathway	Cell cycle_S phase
Regulation of metabolism_Bile acids regulation of glucose and lipid metabolism via FXR	Development_Hedgehog signaling
Transcription_P53 signaling pathway	Cell cycle_G1-S

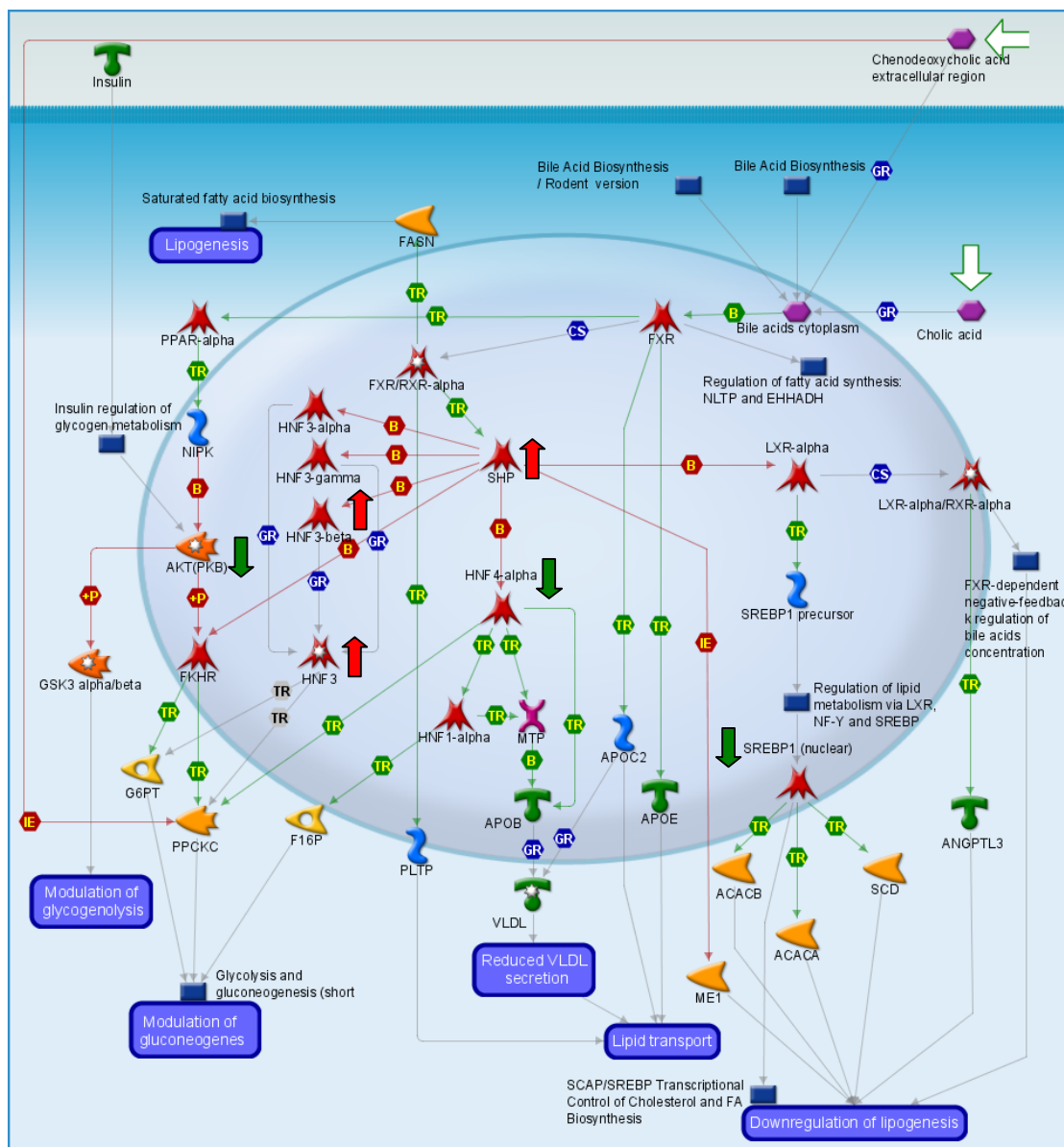
**Taula 23.** Vies metabòliques i processos cel·lulars més afectats pel tractament de trímer de catequina.

Una via que pren especial rellevància és la regulació del metabolisme glucídic i lipídic mitjançant el receptor nuclear FXR (Figura 24).

La lipogènesi és la reacció bioquímica per la qual són sintetitzats els àcids grassos i esterificats o units a glicerol per formar triglicèrids [217]. La síntesi d'àcids grassos comença amb l'acetil-CoA i la seva elongació és mitjançant l'addició d'unitats de dos carbonis. La seva síntesi té lloc al citoplasma, mentre que la seva degradació, anomenada oxidació, es dona a la mitocòndria. La majoria d'enzims per la síntesi d'àcids grassos estan organitzats en el complex multienzimàtic de la FAS (*fatty acid synthase*).

El receptor nuclear FXR modula processos lipogènics i la biosíntesi dels àcids biliars [130]. Aquest receptor és capaç d'actuar mitjançant un altre receptor nuclear, SHP, que via LXR $\alpha$  inhibeix la transcripció de SREBP1, fet que provoca un decrement de l'expressió de gens depenents de SREBP1, tals com ACACA i ACACB (*acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha and beta*), SCD (*stearoyl-CoA desaturase*) o ME1 (*malic enzyme 1*). FXR també pot induir l'expressió de FAS (*fatty acid synthase*) [130].

El receptor nuclear FXR també és capaç de modular els processos de glicòlisi i gluconeogènesi via el factor de transcripció nuclear PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator activated receptor alpha*), inhibint l'expressió de AKT (*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*). AKT pot ser activat per la via de senyalització de la insulina [218]. AKT fosforila FKBP i disminueix la seva activitat, aquest una vegada activat és capaç d'activar la transcripció de G6PT (*glucose-6-phosphatase*) i PPCKC (*phosphoenolpiruvate carboxykinase*), enzims clau en la homeòstasi glucídica, funcionant tant en la gluconeogènesi com en la glicòlisi.



**Figura 24.** Canvis en el metabolisme dels lípids segons el programa MetaCore en rates tractades amb dosi aguda de proantocianidines.

La Figura 24 mostra la repressió dels gens *HNF4α* (*hepatocyte nuclear factor 4, alpha*), *SREBP1* i *AKT*, mentre que hi ha una sobreexpressió dels gens *SHP* i *HNF3β* (*hepatocyte nuclear factor 3 beta*).

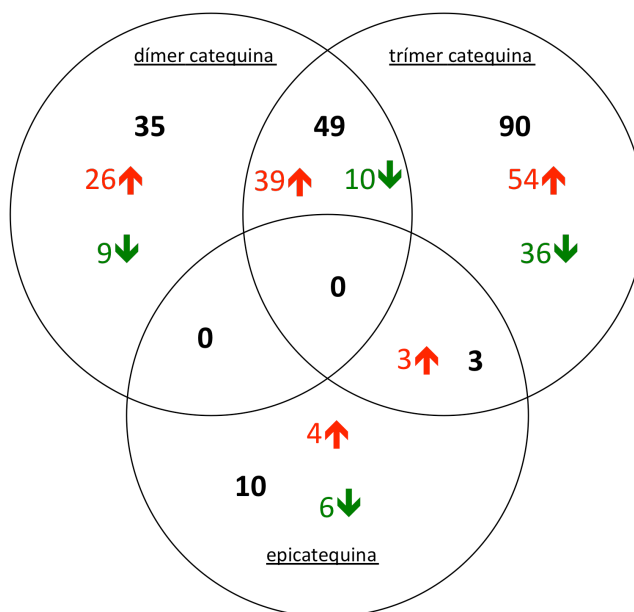
Aquests canvis d'expressió gènica posen de manifest el paper del trímer de catequina com a possible agent en processos de repressió de la lipogènesi i inductor de la gluconeogènesi.

#### 4.4.4. Identificació de gens diana de les proantocianidines a partir de molècules pures

Els diagrames de Venn s'utilitzen per comparar llistes de gens que s'expressen diferencialment. En aquest cas, l'objectiu de la utilització d'aquests diagrames és veure dels

gens que estan alterats de forma significativa i amb un mínim de sobreexpressió o repressió del 50%, quins estan afectats per més d'una de les molècules pures utilitzades.

La Figura 25 mostra el nombre de gens modificats significativament després de cada un dels tractaments. En **negre** hi ha la totalitat de gens modificats. En **vermell** els que estan sobreexpressats i en **verd** els que estan reprimits.



**Figura 25.** Diagrama de Venn de les cèl·lules hepàtiques *FAO* amb diferents tractaments: epicatequina, dímer de catequina i trímer de catequina.

L'epicatequina afecta a l'expressió de **13 gens (10+3)**, dels quals **7** es troben sobreexpressats i **6** reprimits. Dels **7** que estan sobreexpressats, **3** també estan afectats en el mateix sentit i amb la mateixa intensitat pel trímer de catequina (Taula 24). Els gens reprimits per l'epicatequina no es troben alterats ni pel dímer ni pel trímer de catequina.

Gen	Nom	Fold-change Epicatequina	Fold-change Trímer
G0s2	G0/G1 switch gene 2	1,422	1,553
RGD1561841_pred	Similar to ribosomal protein L31 (predicted)	1,759	1,699
Ubd	Ubiquitin D	1,818	1,999

**Taula 24.** Gens afectats per epicatequina i trímer de catequina.

El dímer de catequina afecta a l'expressió de **84 gens (35+49)**, dels quals **65** es troben sobreexpressats i **19** reprimits. D'aquests, **35** estan alterats exclusivament pel dímer de catequina, dels quals **9** estan reprimits i **26** sobreexpressats. El 77% de gens afectats pel dímer de catequina estan sobreexpressats.



#### 4 RESULTATS i DISCUSSIÓ

El trímer de catequina afecta a l'expressió de **142** gens (**49+90**), dels quals **78** es troben sobreexpressats i **64** reprimits. D'aquests, **90** estan alterats exclusivament pel trímer de catequina, dels quals **54** estan reprimits i **36** sobreexpressats. La distribució dels gens que estan sobreexpressats o reprimits és bastant homogènia, encara que hi ha més sobreexpressats.

El dímer i trímer de catequina tenen en comú l'efecte sobre 49 gens (Taula 25). Aquests es troben alterats en el mateix sentit d'expressió, **39** es troben sobreexpressats i **10** reprimits. Generalment, l'efecte del trímer és lleugerament superior. Dels gens que comparteixen, majoritàriament estan sobreexpressats, el 79%.

Gen	Nom	Fold-change Dímer	Fold-change Trímer
RGD1565367	Similar to Solute carrier family 23, member 2 (Sodium-dependent vitamin C transporter 2)"	-3,046	-3,427
Foxe1	Forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	-2,423	-3,171
Zdhhc18	Zinc finger, DHHC domain containing 18	-2,218	-2,238
Rab15	RAB15, member RAS oncogene family	-1,813	-1,856
Lactb	Lactamase, beta	-1,779	-2,393
Sv2b	Synaptic vesicle glycoprotein 2b	-1,592	-1,935
Rad23a	RAD23a homolog (S. cerevisiae)	-1,577	-1,533
Gspt1	G1 to S phase transition 1	-1,553	-1,724
Mcm5_predicted	Minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) (predicted)	-1,542	-1,666
Rrs1_predicted	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae) (predicted)	-1,505	-1,529
Anp32e	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E"	1,507	1,523
RGD1311457_predicted	Similar to RIKEN cDNA 2310003F16 (predicted)	1,507	1,698
LOC499624	Similar to TSC22 domain family protein 2 (TSC22-related-inducible leucine zipper protein 4)	1,523	1,693
RGD1564744_predicted	Similar to 60S acidic ribosomal protein P1 (predicted)	1,541	1,692
Ppp3r1	Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)	1,557	1,939
Gdi2	GDP dissociation inhibitor 2	1,558	1,507
MGC108974	Similar to replication protein-binding trans-activator RBT1	1,571	1,522
Abcd3	ATP-binding cassette, sub-family	1,581	1,530

	D (ALD), member 3		
Tmem123	Transmembrane protein 123	1,591	1,551
Ppp4c	Protein phosphatase 4, catalytic subunit	1,594	1,516
RGD1565940_predicted	Similar to ADP-ribosylation factor-like 10B (predicted)	1,605	1,788
LOC288165	Similar to PEST-containing nuclear protein	1,609	1,607
Thoc4	THO complex 4	1,613	1,611
Csde1	Cold shock domain containing E1, RNA binding	1,654	1,618
Hmgb1	High mobility group box 1	1,664	1,806
Exosc3_predicted	Exosome component 3 (predicted)	1,671	1,860
Tsc22d3	TSC22 domain family 3	1,672	1,714
Adm	Adrenomedullin	1,689	1,580
Calb1	Calbindin 1	1,702	1,767
Slc2a1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	1,731	1,536
Lpin2	Lipin 2	1,752	1,826
Sh3bgrl_predicted	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like (predicted)	1,757	1,875
Snf1lk	SNF1-like kinase	1,759	1,937
Sept7	Septin 7	1,768	1,715
Cdkn2d	Similar to cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	1,788	1,875
RGD1566242_predicted	Similar to RIKEN cDNA 1500009M05 (predicted)	1,790	1,977
Tm4sf12	Transmembrane 4 superfamily member 12	1,820	1,695
Prpc_predicted	Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) (predicted)	1,865	1,614
LOC680782	Similar to signal peptidase complex subunit 3 homolog	1,895	1,911
Rps26	Ribosomal protein S26	1,909	1,834
RGD1561961_predicted	Similar to IQ motif and WD repeats 1 (predicted)	1,924	1,840
Mte1	Mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1	1,949	1,769
Sertad2	SERTA domain containing 2	1,959	2,088
LOC503325	Hypothetical protein LOC503325	2,022	2,238
Stt3a_predicted	Similar to integral membrane protein 1 (predicted)	2,041	2,022
Pdia4	Protein disulfide isomerase associated 4	2,085	1,639
Hba-a2	Hemoglobin alpha, adult chain 2	2,227	2,533
Sfrs12ip1	SFRS12-interacting protein 1	2,912	3,285
Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11	3,485	6,788

**Taula 25.** Gens afectats pel dímer i trímer de catequina.

#### 4.5. Utilització d'un model de transcriptòmica dirigida per la identificació de gens diana de les proantocianidines en diferents models cel·lulars

En el desenvolupament de les patologies cardiovasculars, i més concretament els seus factors de risc, el component genètic juga un paper clau. Els gens que s'han escollit per fer aquest estudi han estat per la seva rellevància en la gènesi de la patologia cardiovascular i s'han agrupat de la següent manera (Taula 26):

La regulació del **metabolisme lipídic** és un factor a tenir en compte en el desenvolupament de l'aterosclerosi. Aquest està estretament lligat a la resposta inflamatòria, ja que com s'ha comentat anteriorment un perfil dislipèmic està associat a inflamació crònica, on els lípids en excés presents al plasma poden desencadenar una resposta inflamatòria perllongada. S'han escollit una sèrie de gens implicats en diferents processos del metabolisme lipídic, així com enzims clau en la síntesi i degradació de lípids, o del metabolisme de les lipoproteïnes i una sèrie de receptors nuclears implicats en la regulació lipídica [45, 219, 220].

L'**estrès oxidatiu** o producció d'espècies reactives d'oxigen, radicals lliures entre altres, és un procés natural dins de l'organisme. La capacitat nociva d'aquestes vindrà establerta pel balanç entre la quantitat d'espècies reactives d'oxigen i les defenses antioxidants de l'organisme. Si hi ha una continua producció d'espècies reactives d'oxigen que poden fer malbé les estructures biològiques, l'organisme ha de ser capaç de contrarestar aquest efecte activant una sèrie de mecanismes antioxidants. En el moment en que es perd aquest equilibri, l'organisme serà susceptible a desenvolupar malalties lligades a estrès oxidatiu, com per exemple patologies cardiovasculars. Per tant, l'estrès oxidatiu no és només degut a una producció incontrolada d'espècies reactives d'oxigen, sinó també a una resposta mins o defectuosa dels sistemes antioxidants. En aquest apartat s'han triat gens involucrats en ambdós processos, per tal de veure com els hi afecten les proantocianidines [31].

La següent agrupació són gens involucrats en la renovació cel·lular. En aquest apartat es troben gens característics de la **proliferació cel·lular**, que és un procés natural dins de l'organisme fruit del creixement i multiplicació cel·lular. Forma part de l'angiogènesi, procés complex que comprèn diferents aspectes: degradació de la membrana basal per acció de proteases, proliferació i migració de cèl·lules endotelials, formació del lumen, reconstrucció de la membrana basal, reclutament de cèl·lules musculars llises, maduració d'aquestes i finalment el restabliment del flux sanguini. Hi ha una sèrie de factors de creixement, com *platelet derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), entre altres, que prenen part en aquest procés i que es troben alterats en estats patològics [221].

Altres gens dins d'aquesta classificació són els involucrats en la **matriu extracel·lular** que és el conjunt de material extracel·lular que forma part d'un teixit i on es troben les cèl·lules, és a dir, la substància del medi intercel·lular. En l'aterosclerosi, es formada per les cèl·lules musculars llises que han migrat de la media a l'espai subendotelial; una vegada aquí, proliferen i secreten una sèrie de proteïnes com fibrina, col·lagen o proteoglicans, donant lloc al tap fibrós [32, 46]. La lesió ateroscleròtica es caracteritza per ser un focus d'inflamació, on es poden trobar cèl·lules immunitàries com els macròfags, els quals secreten una sèrie de proteïnes anomenades "*matrix metalloproteinases*" o MMPs. Les MMPs, s'encarreguen de la remodelació i degradació de la matriu extracel·lular. Sota condicions fisiològiques la seva activitat està ben regulada a nivell transcripcional, ja sigui activant els seus zimògens, com inhibint els seus inhibidors (TIMPs). En diverses patologies, entre elles l'aterosclerosi, la regulació de les MMPs es veu alterada donant lloc a processos com una excessiva remodelació i degradació de la matriu extracel·lular o una inestabilitat de la placa d'ateroma [32, 46, 222].

I finalment gens que codifiquen per algunes de les caspases més rellevants i que prenen especial interès en la regulació de l'**apoptosi** [223], que és la forma de mort programada més comú a la cèl·lula. Les caspases són mediadores essencials dels processos d'apoptosi, encara que algunes d'elles també estan implicades en processos de maduració proteica com en el cas de mediadors del sistema immunitari del tipus de les interleuquines [224]. Per aquest motiu, errors en processos mediat per les caspases són alguns dels principals responsables del desenvolupament de tumors i malalties autoimmunes. Així per exemple, la caspasa 3, que es una caspasa efectora, pot processar les caspases 2, 6, 7 i 9. També pot actuar sobre substrats de caspases com l'enzim nuclear poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), sobre l'inhibidor (iCAD) del complex DNasa activat per caspasa (CAD), o sobre la gelsolina i la fodrina que alteren la integritat de la membrana plasmàtica [225]. A més, la caspasa 3 juga un paper central en la mediació de l'apoptosi nuclear ja que inclou la condensació de la cromatina i la fragmentació del DNA, així com la desintegració de la membrana plasmàtica.

La tercera agrupació que s'ha fet són gens involucrats en la homeòstasi sanguínia, tenint en compte gens implicats en la regulació de la pressió sanguínia i gens implicats en la regulació de la coagulació.

La **pressió sanguínia** es refereix a la força que exerceix la circulació de la sang contra els vasos sanguinis. La pressió sanguínia està regulada per diversos mecanismes [28, 29]. Un dels mecanismes clau és el sistema Renina-Angiotensia (RAS), que utilitza el ronyó per compensar les oscil·lacions de la pressió sanguínia. RAS s'encarrega de mantenir els nivells òptims de

pressió sanguínia. El principal producte d'aquest sistema és l'angiotensina II (Ang II), un potent vasoconstrictor, a més d'actuar sobre diferents dianes que poden ser perjudicials per l'organisme. L'activació de Ang II quan no és necessari, causa hipertensió, factor de risc en les patologies cardiovasculars [31, 46].

La **coagulació** és un procés complex pel qual la sang forma coàguls. És una part important dins l'hemostasi. La coagulació s'inicia quasi instantàniament després d'una lesió a l'endoteli. Immediatament, aquest dany és recobert per plaquetes, resposta primària, i simultàniament s'activa la cascada de coagulació per formar fibrina. D'aquesta manera es deté l'hemorràgia i es reparen els danys causats als vasos sanguinis. Si hi ha una desregulació d'aquest procés pot esdevenir el risc de patir hemorràgies incontrolades o per contra la formació de trombes que obstaculitzarien una correcta circulació del torrent sanguini provocant en el pitjor dels casos embòlia [226]. El sistema de coagulació té un paper crític en el desenvolupament de l'aterosclerosi. La fibrina té especial importància en la estabilitat de la placa d'ateroma, ja sigui contribuint a la massa extracel·lular de la placa ateromatosa, com promovent senyals de captura de plaquetes o cèl·lules inflamatòries. Aquest procés pot donar lloc a una inestabilitat de la placa que pot acabar en la seva ruptura, amb el consegüent inici de la cascada de coagulació i formació dels trombes que pot ocloure el vas sanguini [32, 46, 226].

La quarta i última agrupació correspon a la **inflamació o resposta inflamatòria** que és la base o la manera de manifestar-se de diferents malalties, ja que és una resposta inespecífica de l'organisme per defensar-se d'agents agressors del medi [45]. Les cèl·lules immunitàries estan presents en el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques o placa ateromatosa, i les molècules que aquestes secreten afavoreixen la progressió de la lesió i per tant una activació continua d'inflamació. És per aquest motiu que s'ha posat especial interès en gens relacionats amb la resposta inflamatòria, com citoquines o molècules quimiotàctiques, secretades inicialment com una defensa de l'organisme, però si la seva expressió es troba desregulada promouen una inflamació crònica [45, 219].

Dins d'aquest grup de resposta inflamatòria també tenen especial rellevància gens implicats en l'**adhesió cel·lular**, que és mediada per les molècules d'adhesió cel·lular (CAMs) expressades per l'endoteli activat en processos patològics [227]. Les CAMs juguen un paper clau en el reclutament de leucòcits a la zona on s'ha produït la lesió [32] ja que promouen que els leucòcits circulants migrin a l'espai subendotelial, pas important en l'inici de l'aterogènesi. L'expressió d'aquestes molècules és el resultat a estímuls inflamatoris que tenen com a focus l'endoteli. Es poden dividir en quatre famílies: immunoglobulines, com VCAM1 o ICAM1;

selectines, com SELE; les integrines; o les caderines, que són dependents de calci. Cada una d'aquestes famílies prendrà part en un punt determinat del procés d'adhesió [228].

Gene Symbol	Gene Bank	Gene Symbol	Gene Bank	Gene Symbol	Gene Bank
ALOX15	NM_001140	HMGCR	NM_000859	NOS3	NM_000603
ABCA1	NM_005502	HMGCS	NM_002130	NOX5	NM_024505
ACACA	NM_198834	HNF-4a	NM_000457	NPPA	NM_006172
ACE	NM_152831	ICAM-1	NM_000201	NPPB	NM_002521
AGT	NM_000029	IKK2	NM_001556	PDGFA	NM_002607
APOB	NM_000384	IL10	NM_000572	PLA2G7	NM_005084
APOC1	NM_001645	IL-18	NM_001562	PLAT	NM_000930
APOC2	NM_000483	IL-1b	NM_000576	PLAU	NM_002658
APOC3	NM_000040	IL4	NM_000589	PPARA	NM_005036
APOC4	NM_001646	IL-6	NM_000600	PPARG	NM_015869
APOD	NM_001647	IL-8	NM_000584	PTGS1	NM_000962
APOE	NM_000041	INF-g	NM_000619	PTGS2	NM_000963
CASP3	NM_004346	INSIG1	NM_005542	RXRa	NM_002957
CASP8	NM_033358	ITGB2	NM_000211	SAA2	NM_030754
CASP9	NM_001229	JNK2	NM_002752	SCAP	NM_012235
CD36	NM_000072	JUN	NM_002228	SELE	NM_000450
CD40	NM_001250	LDL-R	NM_000527	SERPINE1	NM_000602
CD40LG	NM_000074	LFA1	NM_002209	NROB2	NM_021969
CETP	NM_000078	LPA	NM_005577	SOAT	NM_003101
CRP	NM_000567	LPL	NM_000237	SOD1	NM_000454
CYP7A1	NM_000780	NR1H3	NM_005693	MSR1	NM_138715
EDN1	NM_001955	Mac1	NM_000632	SREBP1	NM_004176
EDN2	NM_001956	MCP-1	NM_002982	TGFB1	NM_000660
EDN3	NM_000114	MCS-F	NM_000757	TIMP-1	NM_003254
F3	NM_001993	MMP-2	NM_004530	TIMP-2	NM_003255
F7	NM_000131	MMP-3	NM_002422	TNF	NM_000594
FAS	NM_000043	MMP-9	NM_004994	VCAM-1	NM_001078
FGA	NM_000508	MPO	NM_000250	VEGFA	NM_003376
FGB	NM_005141	MTTP	NM_000253	VLA4	NM_000885
FGG	NM_021870	NFKB1	NM_003998	VwF	NM_000552
NR1H4	NM_005123	NFKBIA	NM_020529	ACTB	NM_001101
GPX1	NM_000581	NOS2A	NM_000625	GAPDH	NM_002046

**Taula 26.** Llistat de gens que constitueixen la targeta microfluídica o TLDA. El gens marcats en color negre corresponen als gens utilitzats com a controls endogens.

#### 4.5.1. Cèl·lules hepàtiques

A continuació es mostren els resultats corresponents als experiments sobre les cèl·lules hepàtiques *HepG2* mitjançant transcriptòmica dirigida amb la tècnica TLDA per valorar l'efecte dels diferents tipus de proantocianidines com l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE) a dues dosis diferents, 10 i 50 mg/l, un extracte de proantocianidines ric en oligòmers (F8) a dues dosis diferents, 10 i 50 mg/l, un monòmer (EGCG), un dímer (B2) i un trímer (C1), tots tres a una dosi de 10 mg/l. En tots els casos el tractament ha tingut una duració 9h.

Tot i els canvis aparents mostrats als gràfics, només es consideren consistents aquells que provenen d'un nivell de cicles fiable (detecció com a màxim a una Ct de 33) i amb un error relatiu entre ells vàlid (desviació estàndard  $\leq 0.3$ ).

#### 4.5.1.1. Efecte sobre el metabolisme cel·lular

Al Gràfic 42 s'indiquen els nivells de mRNA de gens involucrats en el **metabolisme lipídic** i l'**estrès oxidatiu** després d'haver estat incubades amb GSPE a 10 i 50 mg/l, F8 a 10 i 50 mg/l, i 10 mg/l dels compostos purs EGCG, procianidina B2 i procianidina C1. Després del tractament a 50 mg/l de GSPE i F8, s'aprecia una repressió generalitzada dels gens implicats en el metabolisme lipídic i lipoproteic, exceptuant la sobreexpressió significativa de HMGCS (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1*) i LDL-R (*low density lipoprotein receptor*), mentre que a la dosi de 10 mg/l de GSPE, F8 i dels compostos purs no s'aprecien canvis rellevants.

Hi ha molts estudis adreçats a elucidar els efectes hipolipidèmics de les procianidines. El fetge és l'òrgan principal en el manteniment de l'homeòstasi lipídica, fet que fa que el fetge sigui un focus d'estudi com a diana de les procianidines [23, 52].

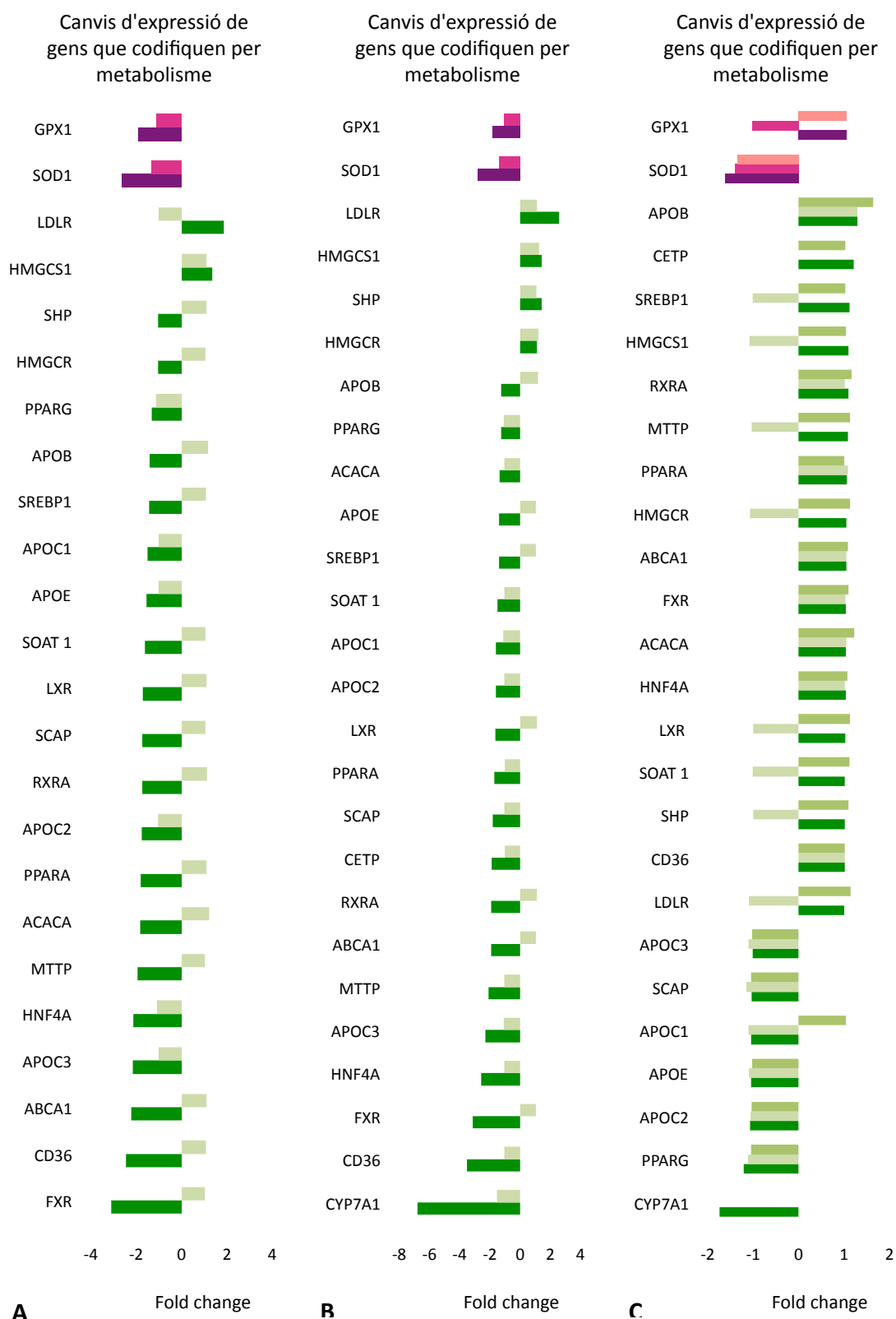
Els resultats obtinguts en referència al metabolisme lipídic es correlacionen amb els obtinguts en altres treballs realitzats dins del nostre grup de recerca, amb experiments *in vivo*, rates mascles Wistar, i *in vitro*, la mateixa línia cel·lular, arribant a la conclusió que l'administració del GSPE pot millorar dràsticament el perfil lipídic i mantenir l'homeòstasi lipídica [52]. Els nostres resultats són suggerents en el sentit que mostren una modificació de la maquinària genètica que explica en part la disminució dels nivells circulants de TG que hem observat en estudis *in vivo* de tractament amb procianidines [52] i confirmen un cop més el potencial d'aquestes molècules per corregir una de les primeres causes que semblen condicionar la patologia cardiovascular.

Els receptors nuclears són un grup de factors de transcripció que tenen un paper crític en la regulació de l'expressió gènica i de les funcions fisiològiques, interaccionant directament amb gens diana [229]. Els resultats obtinguts en aquest treball mostren la capacitat del GSPE i F8 sobre l'expressió dels gens dels receptors nuclears a les cèl·lules hepàtiques, apreciand-se una supressió generalitzada d'aquests quan la dosi utilitzada és de 50 mg/l. El receptor nuclear SHP pràcticament no es troba afectat. Aquests resultats no es correlacionen exactament amb els obtinguts en el nostre grup en experiments *in vivo*, segurament degut a que les condicions experimentals no són les mateixes [52]. El paper que juguen aquests receptors en el metabolisme lipídic i lipoproteic és fonamental. Així per exemple, LXRA promou l'activació de la síntesi d'àcids grassos i triglicèrids mentre que FXR és un efectiu repressor de la lipogènesi

[230, 231]. L'efecte exercit per GSPE i F8 sobre aquests receptors nuclears posaria de manifest la possibilitat de considerar els receptors nuclears com a dianes de les proantocianidines, proporcionant d'aquesta manera mecanismes d'actuació de les proantocianidines vers les funcions fisiològiques. Això condicionaria la capacitat d'aquests de funcionar com a biomarcadors de patologies cardiovasculars.

Hi ha molts estudis adreçats a comprendre el mecanisme pel qual els polifenols actuen sobre l'organisme proporcionant efectes cardioprotectors [23, 232]. Una de les propietats dels polifenols àmpliament estudiada és la seva capacitat antioxidant. L'estrès oxidatiu i la producció de radicals lliures (ROS) en excés juga un paper molt important en la patogènesi de diverses malalties com l'aterosclerosi, precursora de les malalties cardiovasculars [80]. El propi organisme té mecanismes de defensa antioxidants com l'enzim Superòxid dismutasa depenent de coure i zinc (SOD1), i la Glutatió peroxidasa (GPx). El gen que codifica per l'enzim antioxidant SOD1 (superòxid dismutasa 1) es troba reprimat en totes les condicions, encara que aquesta repressió és més accentuada a la dosi de 50 mg/l. En el cas de GPx1 (glutatió peroxidasa 1), s'observa una sobreexpressió amb la dosi de 50 mg/l tant amb GSPE com amb F8. A les dosis de 10 mg/l de GSPE i F8 i amb els compostos purs, no s'aprecien canvis rellevants. En estudis anteriors en el nostre grup, utilitzant la línia cel·lular *HepG2* i una dosi de GSPE de 50 mg/l, amb un temps d'incubació de 24h, hi ha una sobreexpressió de tots dos gens [80]. Aquests resultats indiquen que a temps intermedis en *HepG2* hi ha repressió, la qual cosa no és positiva. Aquest fet es podria entendre com un efecte rebot. Donat que no hi ha dades a temps anteriors a 9h, podria donar-se el cas que hi hagués hagut una inducció de l'expressió, provocant la fabricació de la proteïna que produeix l'efecte. La presència de proteïna a nivells normals provocaria la repressió del gen que la codifica per evitar la síntesi de proteïna que en aquest moment no és necessària.





**Gràfic 42.** A. Classificació de gens involucrats en el metabolisme cel·lular després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb GSPE. ■ Metabolisme lipídic (50 mg/l) ■ Metabolisme lipídic (10 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (50 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (10 mg/l) B. Classificació de gens involucrats en el metabolisme cel·lular després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb F8. ■ Metabolisme lipídic (50 mg/l) ■ Metabolisme lipídic (10 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (50 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (10 mg/l) C. Classificació de gens involucrats en el metabolisme

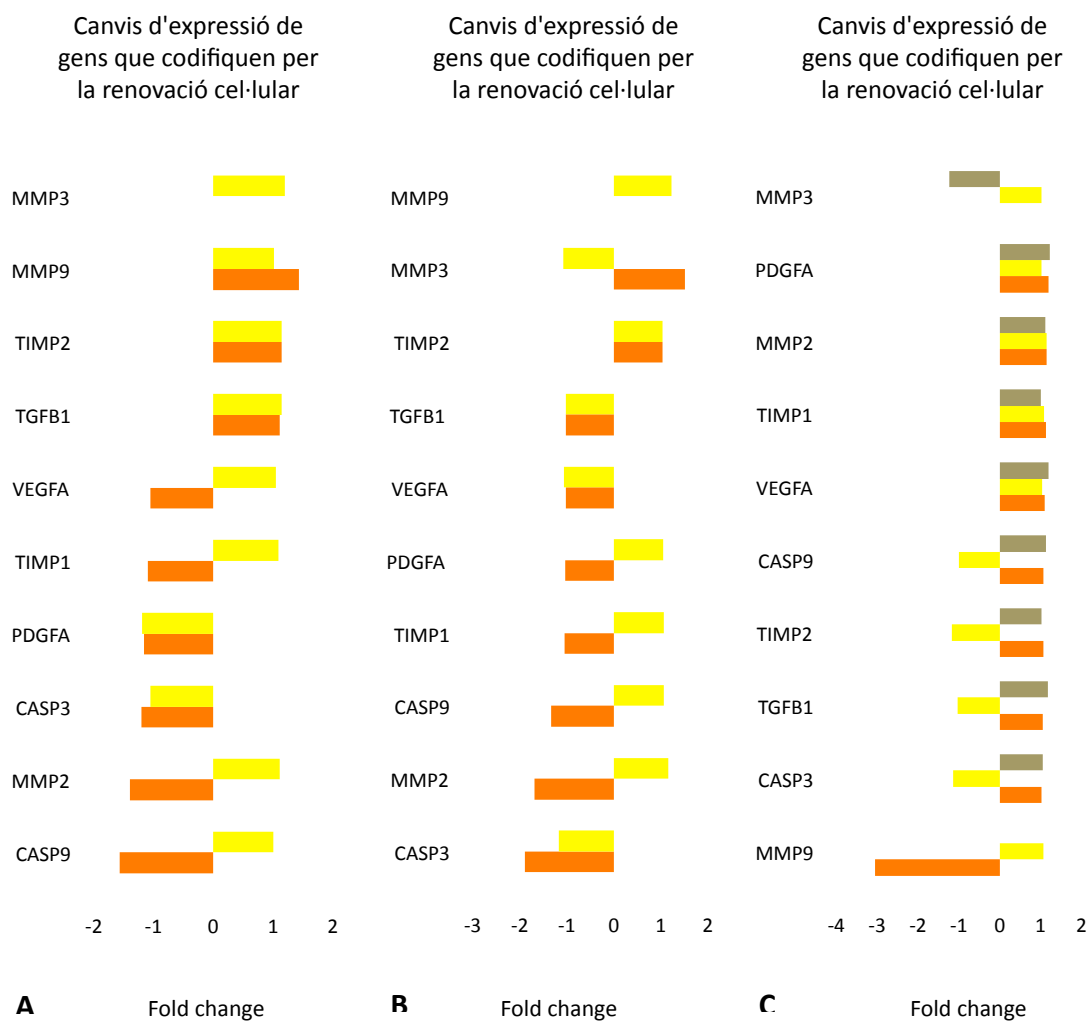
cel·lular després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb diferents molècules pures. ■ Metabolisme lipídic (EGCG 10 mg/l) ■ Metabolisme lipídic (B2 10 mg/l) ■ Metabolisme lipídic (C1 10 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (EGCG 10 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (B2 10 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (C1 10 mg/l).

#### 4.5.1.2. Efecte sobre la renovació cel·lular

El Gràfic 43 mostra els nivells de mRNA de gens involucrats en la **renovació cel·lular**, on es troben gens de proliferació cel·lular, matriu extracel·lular i apoptosi, després que les cèl·lules fossin incubades amb GSPE a 10 i 50 mg/l, F8 a 10 i 50 mg/l, i 10 mg/l dels compostos purs EGCG, procianidina B2 i procianidina C1. No s'observen canvis molt marcats amb cap dels tractaments utilitzats, encara que les dosis de 10 mg/l de GSPE, F8 i dels compostos purs semblen tenir menys efectivitat. El canvi més significatiu és la repressió de la caspasa 9 (CASP9) amb la dosi de 50 mg/l, tant amb GSPE com amb F8. Aquesta caspasa està implicada en l'inici de l'apoptosi cel·lular. Es pot destacar també una lleugera repressió de la caspasa 3 (CASP3) després del tractament amb 50 mg/l de GSPE. Aquesta repressió és més important després del tractament amb 50 mg/l de F8. La caspasa 3 juga un paper clau en la mediació de l'apoptosi nuclear com s'ha comentat anteriorment. Els compostos purs no fan cap efecte sobre les caspases a la dosi utilitzada.

Una activació massiva de l'apoptosi està implicada en patologies hepàtiques com la disfunció hepàtica fulminant [247], en aquesta malaltia hi ha una activació de les caspases, entre elles la caspasa 9. Els nostres resultats mostren una disminució de l'expressió de la CASP9, fet positiu tenint en compte les implicacions que podria comportar. Estudis realitzats amb procianidines de poma [233] mostren com aquestes estarien implicades en una inhibició de la proliferació cel·lular associada al mecanisme apoptòtic de la via intrínseca a la mitocòndria, mitjançant una pèrdua en el potencial de la membrana mitocondrial i a l'activació de la caspasa 3.

4 RESULTATS i DISCUSSIÓ

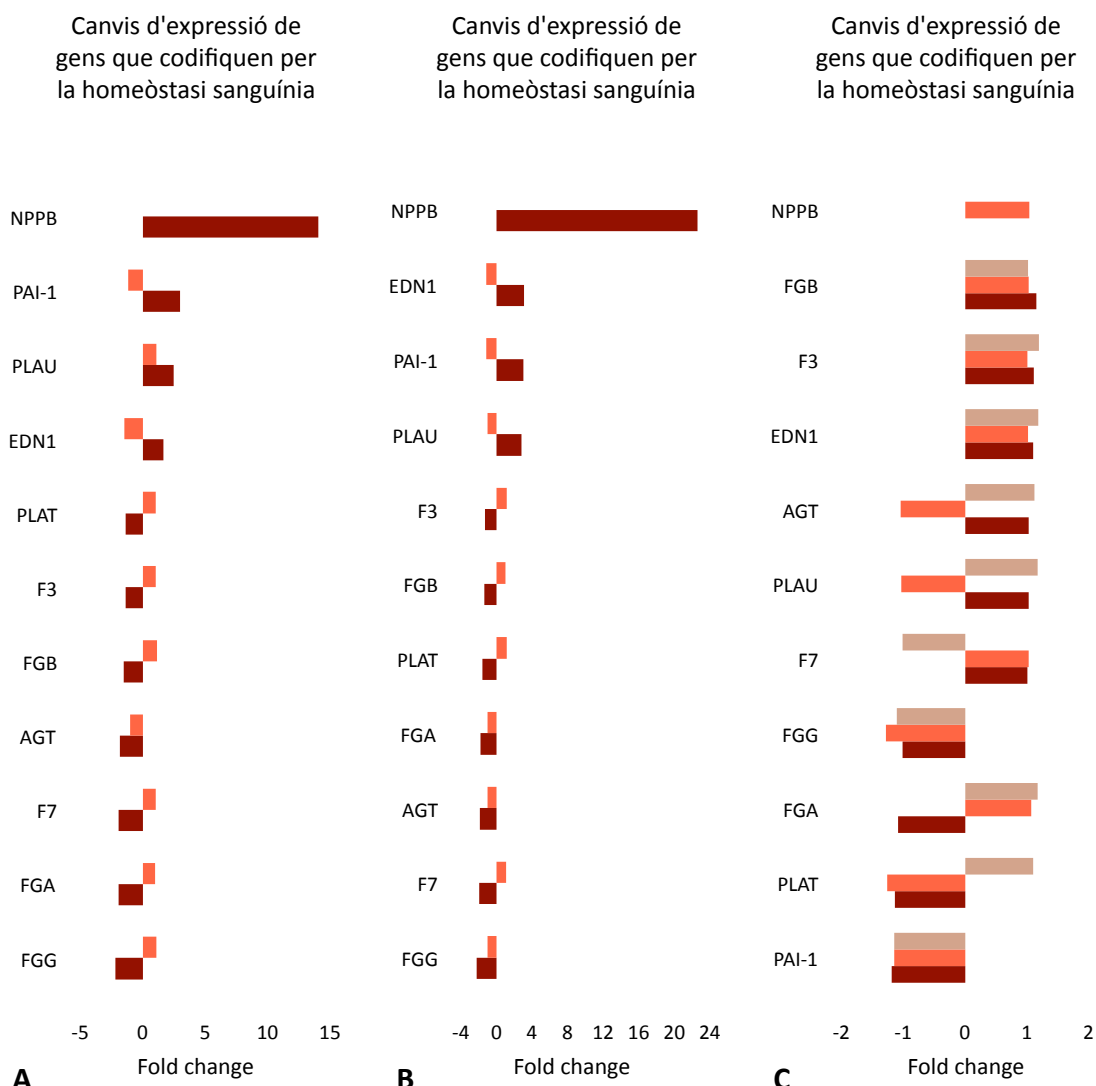


**Gràfic 43.** A. Classificació de gens involucrats en la renovació cel·lular després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb GSPE. ■ Renovació cel·lular (50 mg/l) ■ Renovació cel·lular (10 mg/l) B. Classificació de gens involucrats en la renovació cel·lular després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb F8. ■ Renovació cel·lular (50 mg/l) ■ Renovació cel·lular (10 mg/l) C. Classificació de gens involucrats en la renovació cel·lular després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb diferents molècules pures. ■ Renovació cel·lular (EGCG 10 mg/l) ■ Renovació cel·lular (B2 10 mg/l) ■ Renovació cel·lular (C1 10 mg/l).

**4.5.1.3. Efecte sobre la homeòstasi sanguínia**

Al Gràfic 44 s'indiquen els nivells de mRNA de gens involucrats en la **homeòstasi sanguínia**, trobant gens involucrats en regulació de la pressió sanguínia i gens implicats en la coagulació, després que les cèl·lules fossin incubades amb GSPE a 10 i 50 mg/l, F8 a 10 i 50 mg/l, i 10 mg/l dels compostos purs EGCG, procianidina B2 i procianidina C1. El gen corresponent a l'angiotensinogen (AGT) presenta una forta repressió després del tractament amb la dosi de 50 mg/l de GSPE i F8, mentre que amb la dosi de 10 mg/l de GSPE, F8 i dels compostos purs no experimenta cap mena de canvi. Cal destacar l'expressió oposada del gen de l'endotelina 1 (EDN1). Mentre que amb la dosi més elevada de GSPE pateix una repressió superior al 50%,

amb la dosi més petita, pateix una sobreexpressió de casi el 50%. S'observa un fet similar amb F8, encara que no tant marcat. La dosi superior augmenta la seva expressió 3 vegades respecte al control, mentre que la dosi inferior perfila una lleugera repressió. Els compostos purs EGCG i procianidina C1 exerceixen una tendència a la sobreexpressió encara que no gaire marcada. Majoritàriament i amb el tractament de GSPE i F8 amb 50 mg/l, els gens implicats en la homeòstasi sanguínia pateixen una repressió a excepció del gen activador de plasminogen uroquinasa (PLAU), implicat en la fibrinòlisi, i el seu inhibidor el gen activador-inhibidor de plasminogen (PAI-1) i el precursor del pèptid natriurètic tipus B (NPPB), tots tres amb una marcada sobreexpressió. S'aprecia una repressió dels gens codificants pels factors de coagulació F3 i F7, responsables de l'activació de la trombina i per tant de la cascada de la coagulació. Els gens codificants per fibrinogen, precursor de la fibrina i responsable de la formació del coàgul també es troben reprimits. La fibrina, producte del fibrinogen, és un dels components majoritaris de les lesions ateroscleròtiques. La producció excessiva de fibrinogen per part del fetge faria augmentar els nivells plasmàtics d'aquest, contribuint al desenvolupament de la placa d'ateroma. Els resultats obtinguts suggereixen que GSPE i F8 podrien actuar inhibint la producció de fibrinogen protegint en certa manera l'acumulació d'aquest a la superfície de l'endoteli [226]. El canvis observats posen de manifest que el tractament amb GSPE i F8 només és efectiu a la dosi de 50 mg/l, exercint efectes en el mateix sentit i amb el mateix grau d'intensitat, mentre que la dosi de 10 mg/l de GSPE, F8 i dels compostos purs sembla no tenir efectes manifestos.



**Gràfic 44. A.** Classificació de gens involucrats en la homeòstasi sanguínia després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb GSPE. ■ Homeòstasi sanguínia (50 mg/l) ■ Homeòstasi sanguínia (10 mg/l) **B.** Classificació de gens involucrats en la homeòstasi sanguínia després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb F8. ■ Homeòstasi sanguínia (50 mg/l) ■ Homeòstasi sanguínia (10 mg/l) **C.** Classificació de gens involucrats en la homeòstasi sanguínia després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb diferents molècules pures. ■ Homeòstasi sanguínia (EGCG 10 mg/l) ■ Homeòstasi sanguínia (B2 10 mg/l) ■ Homeòstasi sanguínia (C1 10 mg/l).

#### 4.5.1.4. Efecte sobre la resposta immunitària

El Gràfic 45 mostra els nivells de mRNA de gens involucrats en la **resposta inflamatòria** i gens que codifiquen per l'**adhesió cel·lular** després d'haver estat incubades amb GSPE a 10 i 50 mg/l, F8 a 10 i 50 mg/l, i 10 mg/l dels compostos purs EGCG, procianidina B2 i procianidina C1. Els canvis són principalment deguts a la dosi més elevada tant de GSPE com de F8, ja que els canvis d'expressió deguts a la dosi de 10 mg/l de tots els tractaments són pràcticament inapreciables. Per la dosi de 50 mg/l, de GSPE i F8, s'observa una sobreexpressió manifesta dels gens que codifiquen per la proteïna activadora 1 (AP-1) i la interleuquina 8 (IL8). Aquest

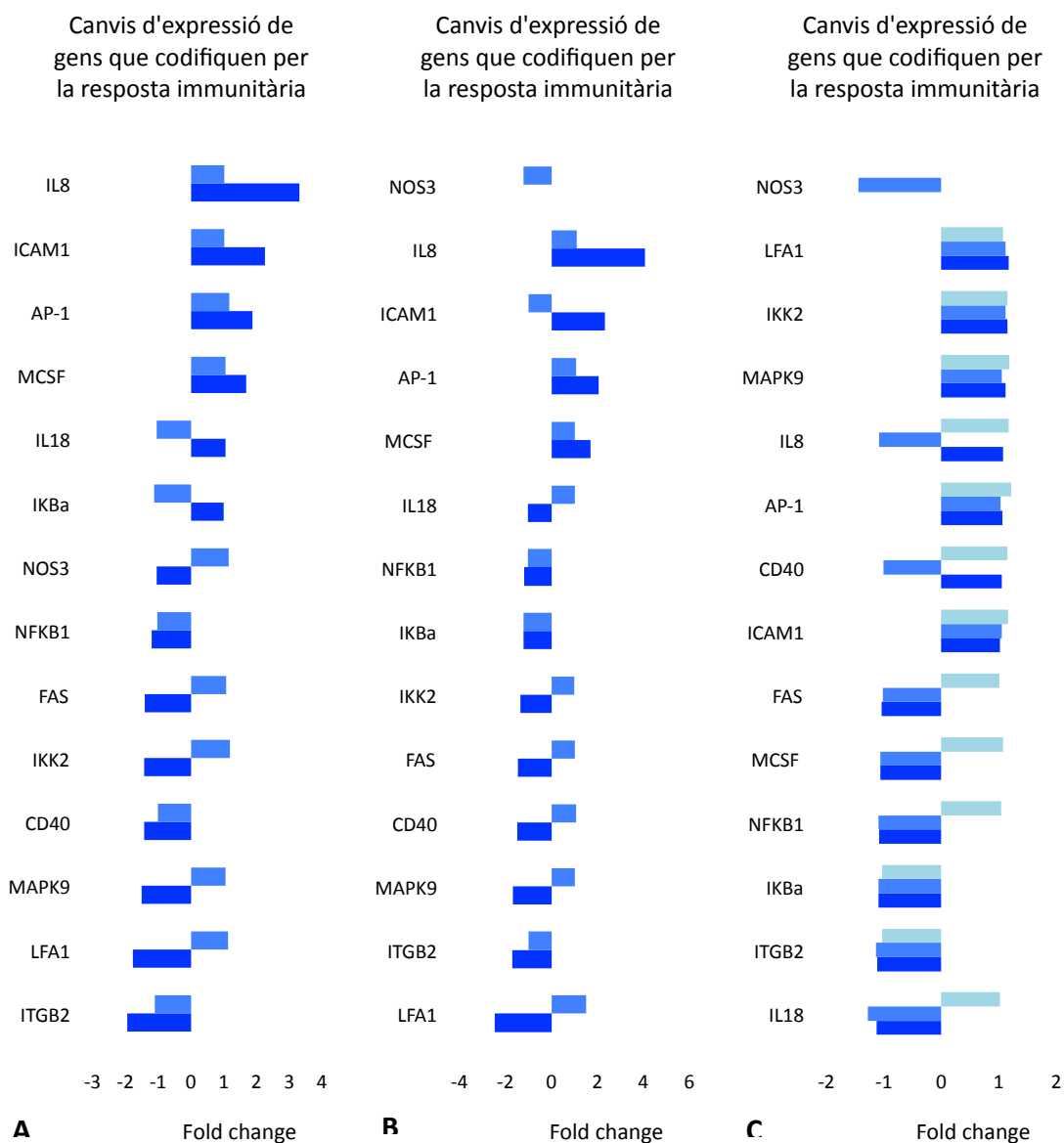
últim té un expressió de 3 i 4 vegades respecte al control. El gen de MAPK9 pateix una lleugera disminució. Per altra banda, s'observa una forta sobreexpressió de la molècula d'adhesió intercel·lular 1 (ICAM1), gairebé 2,5 vegades respecte al control i una important disminució de la integrina beta 2 (ITGB2) i la integrina alfa L (LFA1).

La forta sobreexpressió dels gens IL8 i AP-1 després del tractament amb 50 mg/l de GSPE i F8 representa un resultat negatiu des de la perspectiva de les proantocianidines com a beneficioses en relació a les patologies cardiovasculars ja que ambdós gens estan implicats en el desenvolupament de diverses patologies. S'ha de tenir en compte que AP-1 és un factor de transcripció i un augment a nivell d'expressió gènica no té perquè significar un augment de la seva activitat de manera que no exerciria les seves múltiples funcions [234]. Les MAPKs són reguladores essencials de processos fisiològics i patològics i estan implicades en el desenvolupament de gran quantitat de patologies com aterosclerosi, diabetis, embòlia, Parkinson o Alzheimer. La inhibició de la via de les MAPKs podria suprimir l'evolució de la malaltia, encara que una inhibició incontrolada també jugaria en contra dels processos fisiològics on estan implicades. La capacitat d'actuació que tenen les MAPKs les converteix en dianes interessants pel tractament de diverses patologies. Les dades que s'han obtingut de MAPK9 en les cèl·lules hepàtiques mostren una repressió manifesta d'aquest gen. Aquest efecte perfila GSPE i F8 com moduladors emergents de les MAPKs encara que s'hauria de fer un anàlisi més detallat per confirmar definitivament aquests resultats [235].

En les cèl·lules hepàtiques un augment en l'expressió de molècules d'adhesió està relacionat amb lesions hepàtiques. Els nostres resultats mostren una forta sobreexpressió de ICAM1, mentre que ITGB2 i LFA1 estan reprimits. Una sobreexpressió de ICAM1 promouria l'adhesió de neutròfils, però perquè la seva transmigració tingués lloc, és necessari que les integrines també estiguin expressades. La sobreexpressió de ICAM1 de totes maneres és un resultat negatiu [236-239] des del punt de vista de la possible utilització de GSPE i F8.

De la mateixa manera que en els apartats anteriors, qui sembla tenir un clar efecte sobre els gens relacionats amb les patologies cardiovasculars són els extractes de GSPE i F8 a la dosi de 50 mg/l, mostrant efectes pràcticament idèntics. Aquest fet els situa com a potents moduladors de gens implicats en processos patològics associats a les malalties cardiovasculars.

## 4. RESULTATS i DISCUSSIÓ



**Gràfic 45. A.** Classificació de gens involucrats en la resposta immunitària després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb GSPE. ■ Resposta immunitària (50 mg/l) ■ Resposta immunitària (10 mg/l) **B.** Classificació de gens involucrats en la resposta immunitària després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb F8. ■ Resposta immunitària (50 mg/l) ■ Resposta immunitària (10 mg/l) **C.** Classificació de gens involucrats en la resposta immunitària després del tractament de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* amb diferents molècules pures. ■ Resposta immunitària (EGCG 10 mg/l) ■ Resposta immunitària (B2 10 mg/l) ■ Resposta immunitària (C1 10 mg/l).

### 4.5.1.5. Confirmació dels resultats per PCR quantitativa a temps real

L'anàlisi de PCR quantitativa a temps real s'ha fet amb les mostres de RNA de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* després de ser tractades amb una dosi de 50 o 10 mg/l tant de l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE) o l'extracte de proantocianidines ric en oligòmers (F8). No s'ha fet després del tractament amb les diferents molècules pures EGCG, procianidina B2 i procianidina C1 donat que no s'observen canvis després de l'anàlisi amb TLDA. Els gens seleccionats han estat en els quatre casos la proteïna microsomal transferidora de triglicèrids

(MTTP) i el factor nuclear 4 alfa d'hepatòcits (HNF4A), que és un receptor nuclear. Aquests dos gens estan involucrats segons la nostra classificació en el metabolisme lipídic. En tots dos casos, els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi de PCR confirmen els resultats obtinguts amb les TLDA. En el cas del tractament amb la dosi més gran de tots dos extractes, es confirma de manera significativa (test de la t de Student  $p < 0,05$ ) la repressió de tots dos gens (Taula 27).

Gens	Control	GSPE 50 mg/kg	F8 50 mg/kg
MTTP	1,023 ± 0,023	0,545 ± 0,012*	0,446 ± 0,003*
HNF4A	0,994 ± 0,015	0,375 ± 0,018*	0,310 ± 0,013*

Gens	Control	GSPE 10 mg/kg	F8 10 mg/kg
MTTP	1,008 ± 0,048	0,916 ± 0,037	0,812 ± 0,046*
HNF4A	1,010 ± 0,050	0,849 ± 0,023	0,788 ± 0,049*

**Taula 27.** Efecte del tractament amb GSPE i Fracció 8 50 i 10 mg/l durant 9h *HepG2* sobre els nivells de mRNA a fetge de diferents gens. Els resultats mostren la mitjana ± SEM (n=3). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents, \* $p < 0,05$ .

L'efecte de la fracció F8, que és una fracció de GSPE, sembla ser més efectiva que el mateix extracte GSPE. Per altra banda, quan la dosi que s'utilitza és la de 10 mg/l pels dos extractes, només hi ha resultats de repressió significatius (test de la t de Student  $p < 0,05$ ) quan el tractament és amb F8. Aquests resultats posarien de manifest que un dels principals responsables de l'extracte GSPE podria ser la fracció F8. Quan les cèl·lules han estat tractades únicament amb molècules pures presents a l'extracte complet, com són l'EGCG, la procianidina B2 i la procianidina C1, no s'han apreciat canvis manifestos en l'expressió gènica. Una interpretació possible seria la necessitat d'una barreja efectiva d'aquests compostos, actuant d'aquesta manera en sinergia. És per això que la fracció F8, que conté bàsicament dímers i trímers, sí que fa l'efecte observat quan el tractament és amb l'extracte complet.

#### 4.5.2. Cèl·lules endotelials

A continuació es mostren els resultats corresponents als experiments sobre les cèl·lules endotelials *HUVEC* mitjançant transcriptòmica dirigida amb la tècnica TLDA per valorar l'efecte d'un extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE) a 25 mg/l, i un extracte de proantocianidines ric en oligòmers (F8) a una dosi de 25 mg/l i un temps d'incubació de 2h.

Tot i els canvis aparents mostrats als gràfics, només es consideren consistents aquells que provenen d'un nivell de cicles fiable (detecció com a màxim a una Ct de 33) i amb un error relatiu entre ells vàlid (desviació estàndard  $\leq 0.3$ ).

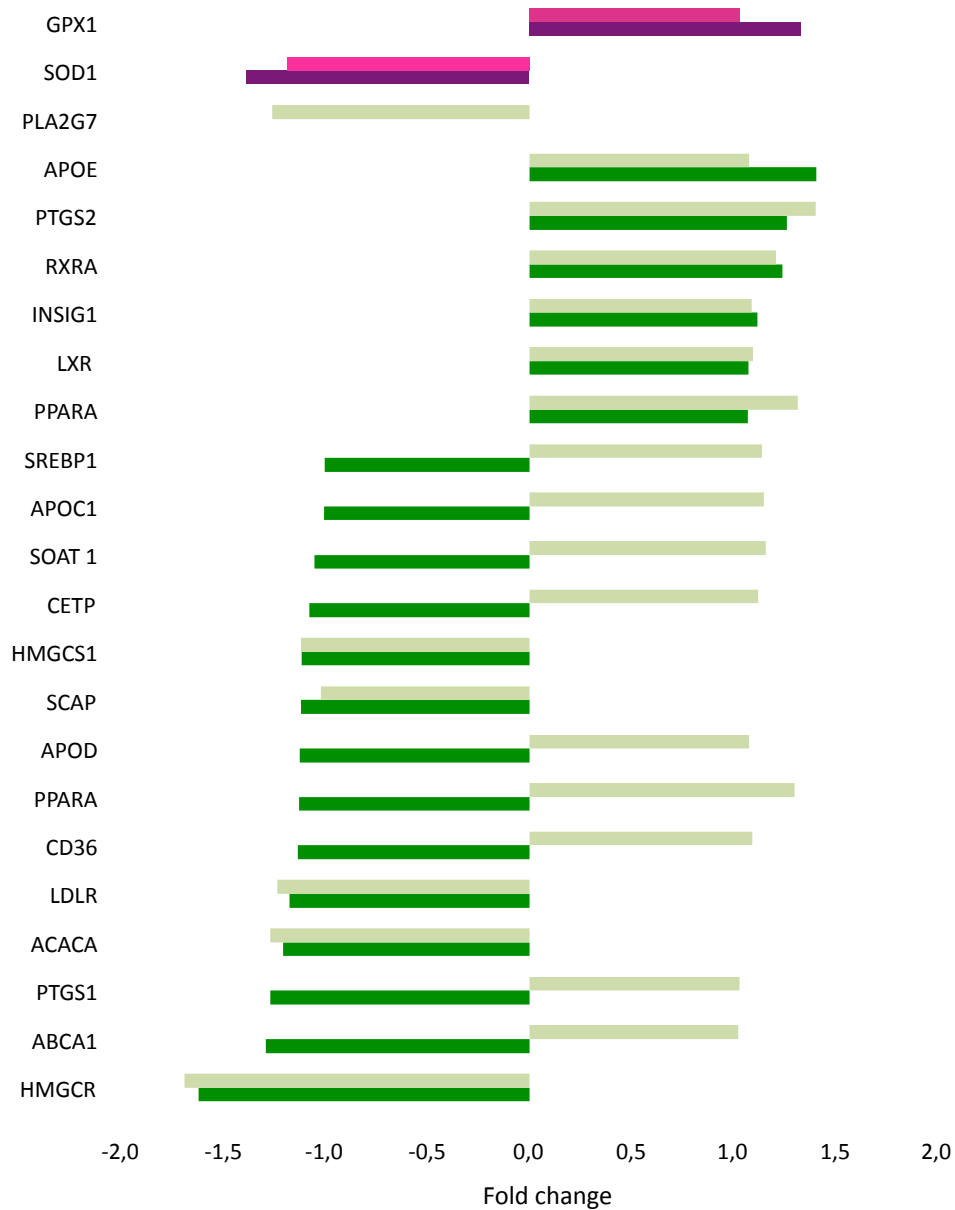


#### 4.5.2.1. Efecte sobre el metabolisme cel·lular

Al Gràfic 46 s'indiquen els nivells de mRNA de gens involucrats en el **metabolisme lipídic** i l'**estrès oxidatiu** després d'haver estat incubades amb GSPE i F8. No s'observen canvis contundents amb cap dels dos tractaments. Amb tots dos extractes hi ha una repressió marcada de HMGCR (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase*), codificant per l'enzim limitant en la síntesi de colesterol, i una lleugera repressió de ACACA (*acetyl-CoA carboxylase alpha*), limitant en la síntesi d'àcids grassos. Amb GSPE també s'aprecia una repressió de ABCA1 (*ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1*), important en l'eflux de colesterol i formació de lipoproteïnes HDL, i amb la fracció F8 hi ha una lleugera repressió de LDL-R (*low density lipoprotein receptor*), receptor de colesterol LDL, el qual té gran capacitat aterogènica. El receptor nuclear de retinoid alfa (RXRA) i la prostaglandina endoperòxid sintasa 2 induïble (PTGS2) estan sobreexpressats en tots dos casos. Per la prostaglandina endoperòxid sintasa 1 constitutiva (PTGS1) hi ha un repressió només després de ser tractada amb GSPE. Els receptors nuclears proliferador de peroxisoma-activat alfa i gamma (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ ) pateixen una clara sobreexpressió només després del tractament amb la fracció F8, mentre que amb el tractament de GSPE no hi ha canvis apreciables.

Pel que fa als gens involucrats en l'**estrès oxidatiu**, després del tractament amb GSPE la superòxid dismutasa 1 (SOD1) està rerpimida amb els dos tractaments, gairebé un 40% després del tractament amb GSPE. La glutatió peroxidasa (GPx) es troba sobreexpressada només després del tractament amb GSPE.

Canvis d'expressió de gens que codifiquen per metabolisme



**Gràfic 46.** Classificació de gens involucrats en el metabolisme cel·lular després del tractament de les cèl·lules endotelials *HUVEC* amb GSPE o F8. ■ Metabolisme lipídic (GSPE 25 mg/l) ■ Metabolisme lipídic (F8 25 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (GSPE 25 mg/l) ■ Estrès oxidatiu (F8 25 mg/l).

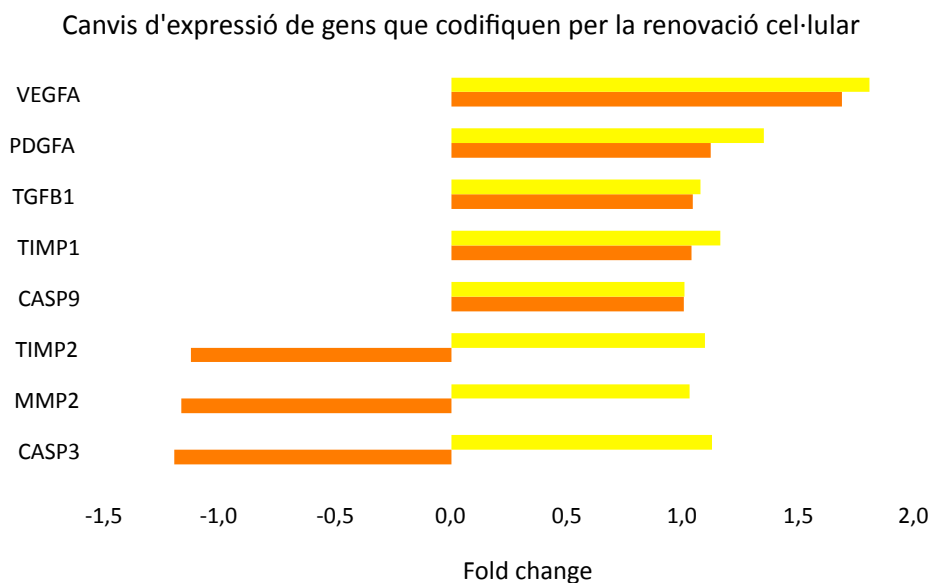
**4.5.2.2. Efecte sobre la renovació cel·lular**

El Gràfic 47 mostra els nivells de mRNA de gens involucrats en la **renovació cel·lular** després que les cèl·lules hagin estat incubades amb GSPE i fracció F8.

Amb cap dels dos tractaments s'aprecien canvis significatius. Només destacar la sobreexpressió en tots dos casos del factor de creixement endotelial vascular alfa (VEGFA),

prop del 70% en el cas del tractament de GSPE, i del 80% amb F8.

L'angiogènesi és un procés fisiològic que implica la formació de nous vasos sanguinis a partir dels ja preexistents. És un procés normal pel creixement i desenvolupament, tot i que un descontrol d'aquest està implicat en processos patològics [45]. VEGF és un dels majors contribuïdors dins l'angiogènesi. Una sobreexpressió controlada de VEGF podria tenir un paper terapèutic en la formació de nous vasos sanguinis quan l'endoteli ha patit danys.



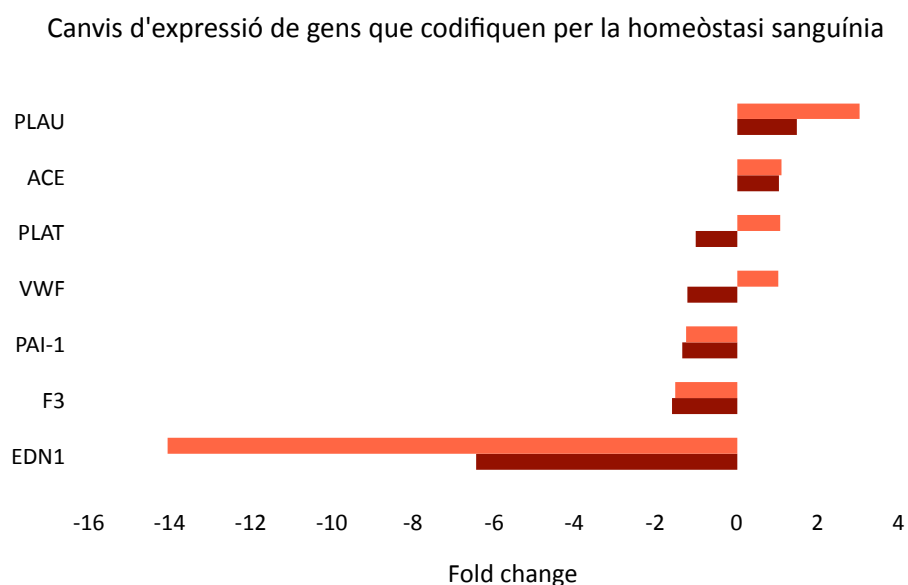
**Gràfic 47.** Classificació de gens involucrats en la renovació cel·lular després del tractament de les cèl·lules endotelials *HUVEC* amb GSPE o F8. ■ Renovació cel·lular (GSPE 25 mg/l) ■ Renovació cel·lular (F8 25 mg/l).

#### 4.5.2.3. Efecte sobre la homeòstasi sanguínia

El Gràfic 48 mostra els nivells de mRNA de gens involucrats en la **homeòstasi sanguínia** després que les cèl·lules hagin estat incubades amb GSPE i fracció F8. S'observa una forta repressió del gen codificant per l'endotelina 1, un potent vasoconstrictor, sobretot després del tractament amb la fracció F8. S'aprecia una forta repressió en tots dos casos i de la mateixa intensitat dels gens codificants pel factor tissular (F3), responsable de l'activació de la trombina i per tant de la cascada de la coagulació, i l'activador-inhibidor de plasminogen (PAI-1). D'altra banda, PLAU, implicat en la fibrinòlisi, es troba sobreexpressat tant per GSPE com per F8, més fortament després del tractament amb F8.

L'endoteli juga un paper vital en l'homeòstasi vascular, en la regulació del to vascular, en la proliferació de les cèl·lules musculars llises, en la migració trans-endotelial dels leucòcits, a més de la trombosis i la trombòlisi. La disfunció endotelial es defineix com una pèrdua parcial o completa de l'equilibri entre vasoconstrictors i vasodilatadors, factors que promouen o

inhibeixen el creixement, factors proaterogènics i antiaterogènics, així com de factors procoagulants i anticoagulants; de manera que la disfunció endotelial es considera crucial en el desenvolupament de l'aterosclerosi [240]. El gen de l'endotelina 1 és un potent vasoconstrictor i regulador del flux sanguini. La seva expressió es troba elevada en algunes patologies com la hipertensió [241]. Aquest gen experimenta una forta repressió en les cèl·lules endotelials *HUVEC* després dels dos tractaments de proantocianidines. Aquests resultats situarien a les proantocianidines com a moduladores de la pressió sanguínia, ja que poden actuar sobre gens clau en el desenvolupament de la hipertensió. El procés de la coagulació també és de vital importància dins del sistema vascular, ja que té un paper crucial en la reparació dels danys causats en aquest. En un estudi realitzat en cèl·lules *HUVEC* s'observa un perfil similar a l'obtingut després de ser tractades amb compostos polifenòlics, observant una augment dels nivells de mRNA dels gens fibrinolítics PLAT i PLAU, atribuint part dels beneficis cardioprotectors d'aquests compostos a la capacitat de promoure la fibrinòlisi, evitant la formació d'un coàgul que obstaculitzaria el pas del flux sanguini [242].



**Gràfic 48.** Classificació de gens involucrats en la homeòstasi sanguínia després del tractament de les cèl·lules endotelials *HUVEC* amb GSPE o F8. ■ Homeòstasi sanguínia (GSPE 25 mg/l) ■ Homeòstasi sanguínia (F8 25 mg/l).

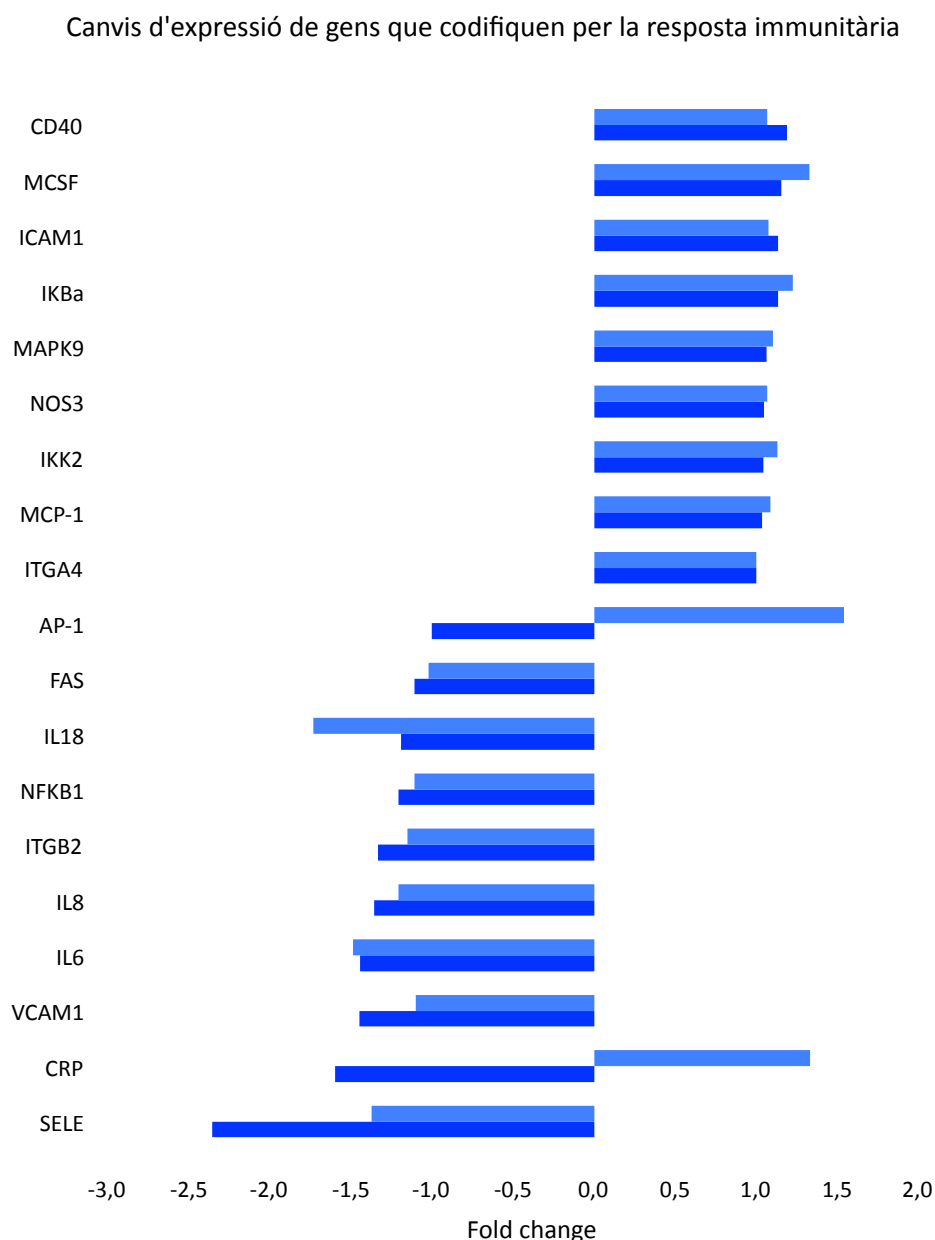
#### 4.5.2.4. Efecte sobre la resposta inflamatòria

El Gràfic 49 mostra els nivells de mRNA de gens involucrats en la **resposta inflamatòria** després d'haver estat incubades amb GSPE i fracció F8. S'observa una repressió marcada amb els dos tractaments dels gens de la interleuquina 6 (IL6) i la interleuquina 8 (IL8), tots dos mediadors inflamatoris. La proteïna C reactiva (CRP) pateix efectes contraposats, mentre que experimenta una forta repressió després del tractament amb GSPE, la fracció F8 indueix una

sobreexpressió manifesta. Els gens que codifiquen per la proteïna activadora 1 (AP-1) i per la interleuquina 18 (IL18) estan afectats només pel tractament amb F8, observant-se una inducció de AP-1 i una inhibició de la IL18. Referent als gens involucrats en l'**adhesió cel·lular** cal destacar la repressió de la selectina (SELE) i la molècula d'adherència de la cèl·lula vascular 1 (VCAM1) després dels dos tractaments.

Hi ha una estreta relació entre inflamació i malaltia cardiovascular, ja que la inflamació incrementa el risc de patir aquesta malaltia [220]. De fet, hom considera avui les lesions ateroscleròtiques com el resultat d'una inflamació crònica [46]. El paper que tenen IL6 i IL8 a l'endoteli és fonamental degut a la seva implicació en el desenvolupament de la patologia cardiovascular, ja que tots dos són mediadors inflamatoris. La funció de IL8 és actuar com a factor quimiotàctic regulant el trànsit de leucòcits i l'angiogènesi. La seva sobreexpressió està relacionada amb l'infart de miocardi [243]. D'altra banda IL6 té especial importància en la inflamació sistèmica, actuant com a regulador de la resposta de fase aguda, a més, és l'única citoquina capaç d'estimular la síntesi de totes les proteïnes de fase aguda implicades en la resposta inflamatòria. Això li confereix un paper clau en la unió entre la seva expressió i la patologia cardiovascular [220]. Els resultats anteriors mostren una clara repressió del gens codificants per IL6 i IL8 després dels dos tractaments, això indica el paper antiinflamatori de les proantocianidines sobre les cèl·lules endotelials.

L'activació de l'endoteli vascular provoca un increment en l'expressió de les molècules d'adhesió. Aquest fet promou l'adhesió i transmigració de leucòcits a l'endoteli amb la conseqüent acumulació d'aquests a l'espai subendotelial desenvolupant la placa d'ateroma. La incubació de cèl·lules endotelials amb GSPE i fracció F8 provoca canvis d'expressió importants de les molècules d'adhesió, sobretot de VCAM1 i SELE. En un estudi realitzat de la mateixa manera amb cèl·lules *HUVEC*, els compostos antioxidants presents en l'oli d'oliva exerceixen els mateixos efectes sobre VCAM1 [244]. Aquests resultats posen de manifest el paper protector de les procianidines front el dany vascular.



**Gràfic 49.** Classificació de gens involucrats en la resposta immunitària després del tractament de les cèl·lules endotelials *HUVEC* amb GSPE i F8. ■ Resposta immunitària (GSE 25 mg/l) ■ Resposta immunitària (F8 25 mg/l).

#### 4.5.2.5. Confirmació dels resultats per PCR quantitativa a temps real

L'anàlisi de PCR quantitativa a temps real s'ha fet amb les mostres de RNA de les cèl·lules endotelials *HUVEC* després de ser tractades amb una dosi de 25 mg/l tant de l'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm (GSPE) o l'extracte de proantocianidines ric en oligòmers (F8). Els gens seleccionats han estat la interleuquina 6 (IL6), la molècula d'adherència de la cèl·lula vascular 1 (VCAM1), la molècula d'adherència intercel·lular 1 (ICAM1) i la selectina (SELE). El primer del gens, IL6, està involucrat en la inflamació sistèmica, actuant com a

#### 4 RESULTATS i DISCUSSIÓ

regulador de la resposta de fase aguda, mentre que els altres tres són gens que codifiquen per molècules d'adhesió cel·lular. Els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi de PCR confirmen els resultats obtinguts amb les TLDA, sent clarament significatius després del tractament amb GSPE. Amb el tractament de la fracció F8 només hi ha significativitat per IL6. En tots els casos el test estadístic que s'ha seguit és un test de la t de Student amb  $p < 0,05$  (Taula 28).

Gens	Control	GSPE 25 mg/kg	Control	F8 25 mg/kg
IL6	1,008 ± 0,084	0,561 ± 0,03*	1,001 ± 0,023	0,673 ± 0,002*
VCAM1	1,008 ± 0,183	0,527 ± 0,067*	1,015 ± 0,124	0,887 ± 0,050
ICAM1	1,002 ± 0,044	1,706 ± 0,079*	1,006 ± 0,078	1,137 ± 0,029
SELE	1,001 ± 0,038	0,376 ± 0,009*	1,002 ± 0,047	0,803 ± 0,085

**Taula 28.** Efecte del tractament amb GSPE i Fracció 8 25 mg/l durant 2h *HUVEC* sobre els nivells de mRNA a fetge de diferents gens. Els resultats mostren la mitjana ± SEM (n=3). L'anàlisi estadística es va fer amb el test de la t de Student per mostres independents, \* $p < 0,05$ .

L'efecte de la fracció F8, que és una fracció de GSPE, és molt similar a l'efecte provocat per extracte GSPE, però no sempre és més efectiu com passava amb les cèl·lules hepàtiques *HepG2*. Aquests resultats podrien indicar que part de l'efecte provocat per GSPE és degut a la fracció 8, ja que quan s'utilitzen a la mateixa dosi els canvis d'expressió gènica són pràcticament idèntics.

## 5. CONCLUSIONS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

**1. Dosis agudes d'extracte de proantocianidines condicionen en fetge de rata canvis importants en el metabolisme dels lipids i tenen una acció proapoptòtica i antiinflamatòria.**

L'administració d'una dosi aguda d'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm de 250 mg/kg indueix uns canvis significatius en l'expressió de 134 gens a fetge de rata. Els resultats indiquen una adaptació metabòlica rellevant marcada per un canvi important de l'expressió de SREPB1, fet que implica un augment de la lipogènesi a fetge. Aquesta dosi també provoca una acció proapoptòtica intrínseca a la mitocòndria tal com mostren els resultats d'expressió gènica i els nivells de citocrom c i HSP70 a fetge. D'altra banda, exerceix un efecte antiinflamatori per la inhibició del receptor de interleuquina 6 (IL6Ra) a nivell d'expressió gènica i una disminució de la proteïna C reactiva (CRP) a plasma.

**2. Els efectes d'un extracte de proantocianidines de pinyol de raïm no són dosi dependent en tractament crònic. Dosis baixes tenen un marcat efecte proapoptòtic, mentre que dosis moderades inhibeixen la fosforilació oxidativa i afecten el metabolisme dels fosfolípids. Les dosis baixes i moderades tenen un clar efecte supressor de la resposta immune.**

L'administració d'una dosi crònica d'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm de 5 i 25 mg/kg, dosis moderades, no és dosi-dependent pel que fa als canvis d'expressió gènica a fetge de rata.

L'administració d'una dosi crònica d'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm de 5 mg/kg, dosi que està per sota del consum habitual de proantocianidines, indueix canvis significatius en l'expressió de 155 gens a fetge de rata. Els resultats indiquen que exerceix un efecte proapoptòtic per la via extrínseca a la mitocòndria tal com mostren els resultats d'expressió gènica a fetge.

L'administració d'una dosi crònica d'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm de 25 mg/kg, una dosi moderada, indueix canvis significatius en l'expressió de 317 gens a fetge de rata. S'observen una sèrie de canvis bioquímics significatius destacant una clara inhibició del procés de fosforilació oxidativa mitocondrial. Tanmateix és rellevant una clara alteració del metabolisme dels fosfolípids i una clara inducció de la via de síntesi de l'àcid araquidònic.

Tant la dosi de 5 com la de 25 mg/kg es constata un efecte supressor de la resposta immunitària centrada en el sistema del complement.

## 5. CONCLUSIONS

- 3. Hi ha un clar efecte dual en l'efecte de diferents formes químiques de proantocianidines sobre cèl·lules *FAO* en cultiu. El monòmer d'epicatequina afecta principalment el cycle cel·lular mentre que les formes oligomèriques actuen modulant el metabolisme i tenen un clar efecte antiinflamatori.**

L'administració d'una dosi de 50 mg/l d'epicatequina indueix canvis significatius sobre l'expressió de 13 gens en cèl·lules *FAO*. Els gens afectats indiquen un clar efecte modulador del cycle cel·lular.

L'administració d'una dosi de 10 mg/l de dímer de catequina indueix canvis significatius sobre l'expressió de 84 gens en cèl·lules *FAO*. L'administració d'una dosi de 50 mg/l de trímer de catequina indueix canvis significatius sobre l'expressió de 144 gens en cèl·lules *FAO*.

Totes dues molècules exerceixen efectes anabòlics comuns sobre diferents punts de control de la gluconeogènesi i la síntesi d'àcids grassos, activant-los; i sobre la lipogènesi, reprimint-la. D'altra banda, també exerceixen un efecte antiinflamatori reprimint l'expressió dels gens codificants pel transductor de senyal d'interleuquina 6 (gp130), i del factor de transcripció NFκB1.

- 4. L'extracte de proantocianidines de pinyol de raïm i una fracció d'aquest extracte ric en formes dimèriques i trimèriques modifica l'expressió d'un seguit de gens de les cèl·lules hepàtiques *HepG2* i de les cèl·lules endotelials *HUVEC* canviant el funcionament cel·lular en sentit favorable a prevenir o pal·liar els efectes patològics associats a les malalties cardiovasculars.**

**1. Acute doses of proanthocyanidins extract induce significant changes on the liver of the rat on lipid metabolism and have proapoptotic and anti-inflammatory actions.**

The administration of an acute dose of grape seed proanthocyanidins extract of 250 mg/kg induces a significant change on the expression of 134 genes in the liver of the rat. The results indicate a relevant metabolic adaptation characterized by a significant change of SREPB1 expression, which implies an increase of lipogenesis in the liver. This dose also causes a proapoptotic action by the mitochondrial intrinsic pathway, as shown in the results of the gene expression and the levels of cytochrome c and HSP70 in the liver. On the other hand, it has an anti-inflammatory effect due to the inhibition of the interleukin 6 receptor (IL6Ra) gene expression level and it shows a decrease of C-reactive protein (CRP) in plasma.

**2. The effects of an extract of proanthocyanidins are not dose-dependent on chronic treatment. Low doses have a marked proapoptotic effect, whereas moderate doses inhibit oxidative phosphorylation and affect the metabolism of phospholipids. Both low and moderate doses have a clear suppressor effect of the immune response.**

Changes on the gene expression in the liver of the rat are not dose-dependent when administrating chronic doses of grape seed proanthocyanidins extract of 5 and 25 mg/kg.

The administration of a chronic dose of grape seed proanthocyanidins extract of 5 mg/kg, which is lower than the regular consumption of proanthocyanidins, induces significant changes on the expression of 155 genes in the liver of the rat. The results indicate a proapoptotic effect exerted by the mitochondrial extrinsic pathway, as shown in the results of the gene expression in the liver.

The administration of a chronic dose of grape seed proanthocyanidins extract of 25 mg/kg, a moderate dose, induces significant changes on the expression of 317 genes in the liver of the rat. There is a significant number of biochemical changes highlighting a clear inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation process. It is also relevant a clear change on the metabolism of phospholipids and a clear induction of the synthesis pathway of arachidonic acid.

Both doses of 5 and 25 mg/kg have shown a suppressive effect of the immune response focused on the complement system.

## 5. CONCLUSIONS

- 3. Clearly there is a dual effect on the effect of different chemical forms of proanthocyanidins on FAO cells in culture. Epicatechin monomer mainly affects the cell cycle while the oligomeric forms act by modulating metabolism and have a clear anti-inflammatory effect.**

The administration of a dose of 50 mg/l of epicatechin induces significant changes on the expression of 13 genes in FAO cells. The affected genes indicate a modulatory effect of the cell cycle.

The administration of a dose of 10 mg/l catechin dimer induces significant changes on the expression of 84 genes in FAO cells. The administration of a dose of 50 mg/l of catechin trimer induces significant changes on the expression of 144 genes in FAO cells.

Both molecules exert common anabolic effects on different control points of gluconeogenesis and fatty acid synthesis, activating them, and lipogenesis, repressing it. On the other hand, also have an anti-inflammatory effect by suppressing the expression of genes that code for signal transducer of interleukin-6 (gp130) and the transcription factor NFκB.

- 4. The grape seed proanthocyanidins extract and a fraction of this extract rich in dimeric and trimeric forms modify the expression of a number of genes in HepG2 liver cells and HUVEC endothelial cells by changing cell function in a favorable manner to prevent or mitigate the pathological effects associated with cardiovascular diseases.**

## 6. ANNEX 1

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

## 6.1. Resposta a un tractament agut de 250 mg/kg amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm

### 6.1.1. Metabolisme cel·lular

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme lipídic</b>				
LOC500761	similar to apolipoprotein F	500761	-3,618	0,013
Lypla3	lysophospholipase 3	361401	-1,526	0,015
Srebf1	sterol regulatory element binding factor 1	78968	1,550	0,019
Slc27a5	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5	79111	1,780	0,003
Mboat2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	313997	1,912	0,006
<b>Metabolisme glucídic</b>				
Tktl2_pred	transketolase-like 2 (predicted)	290685	1,563	0,001
Manea	mannosidase, endo-alpha	140808	1,616	0,024
Gla	galactosidase, alpha	363494	1,793	0,005
<b>Metabolisme de xenobiòtics</b>				
Nat1	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	116631	-1,769	0,042
Cyp2c22	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 70	171518	-1,730	0,009
Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	25086	-1,519	0,044
Nat13	N-acetyltransferase 13	288108	-1,506	0,010
Aadac	arylacetamide deacetylase (esterase)	57300	1,593	0,018
Akr1b7	aldo-keto reductase family 1, member B7	116463	2,325	0,046
<b>Metabolisme proteic</b>				
Edem	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	297504	-1,520	0,035
Aass_pred	aminoadipate-semialdehyde synthase (predicted)	296925	-1,517	0,036
Ndfip1	Nedd4 family interacting protein 1	291609	-1,505	0,023
Gamt	guanidinoacetate methyltransferase	25257	1,518	0,009
Stk32a_pred	serine/threonine kinase 32A (predicted)	364858	1,579	0,000
Fut11	fucosyltransferase 11	286971	1,928	0,012
Dpp6	dipeptidylpeptidase 6	29272	2,129	0,000
<b>Metabolisme de nucleòtids</b>				
Cda_pred	cytidine deaminase (predicted)	362638	1,671	0,013
<b>Metabolisme energètic</b>				
Etfa	electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	300726	-1,750	0,024
Slc16a1	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1	25027	-1,659	0,024



### 6.1.2. Renovació cel·lular

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
Hspb1	heat shock 27kDa protein 1	24471	-1,968	0,038
Enc1	ectodermal-neural cortex 1	294674	-1,555	0,025
Hspca	heat shock protein 1, alpha	299331	-1,533	0,051
Csda	cold shock domain protein A	83807	-1,526	0,038
Prelid1	PRELI domain containing 1	290995	1,520	0,030
Gdnf	glial cell line derived neurotrophic factor	25453	1,526	0,010
Bdnf	brain derived neurotrophic factor	24225	1,545	0,004
Hspa4l_predicted	heat shock 70kDa protein 4-like (predicted)	294993	1,602	0,000
Sst	somatostatin	24797	1,604	0,027
Hps1	Hermansky-Pudlak syndrome 1 homolog (human)	114638	1,655	0,045
Invs	inversin	313228	1,667	0,006
Serpib5	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5	116589	1,692	0,009
Lrrn6a	leucine rich repeat neuronal 6A	315691	1,956	0,015
Sema3g	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G	290562	2,307	0,000
Tpd52	tumor protein D52	294900	3,222	0,000
<b>Regulació del cycle cel·lular</b>				
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	114851	-1,706	0,037
Cgrrf1	cell growth regulator with ring finger domain 1	116679	-1,504	0,038
Bub3	budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (S. cerevisiae)	361662	1,517	0,002
Cinp	cyclin-dependent kinase 2-interacting protein	299334	1,619	0,000
Tfdp2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	300947	1,843	0,010
Ccnyl1	cyclin Y-like 1	316452	1,964	0,000
<b>Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina</b>				
Arid1a	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	297867	1,617	0,000
<b>Regulació de la transcripció</b>				
Nrbf2	nuclear receptor binding factor 2	58839	-1,862	0,006
Med13	mediator complex subunit 13	303403	1,897	0,022
RGD1564927	similar to TGFB-induced factor 2	499929	1,985	0,013
Tfb2m	transcription factor B2, mitochondrial"	289307	2,892	0,000

### 6.1.3. Citoesquelet i processat de RNA

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Citoesquelet</b>				
Actr2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	289820	1,509	0,006

Dynll2	dynein light chain LC8-type 2	140734	1,541	0,016
Gsn	gelsolin	296654	1,575	0,046
Tmod1	tropomodulin 1	25566	1,663	0,000
Myh10	myosin, heavy chain 10, non-muscle"	79433	1,701	0,001
Myo1a	myosin IA	299509	1,716	0,011
Nefh	neurofilament, heavy polypeptide	24587	1,740	0,006
<b>Processat RNA</b>				
<b>mRNA</b>				
Aqr	aquarius homolog (mouse)	366163	2,079	0,000

#### 6.1.4. Senyalització

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Senyalització</b>				
Snf1lk	SNF1-like kinase	59329	-1,779	0,014
Srgap2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	360840	1,510	0,001
Akap9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	246150	1,541	0,011
Sh3kbp1	SH3-domain kinase binding protein 1	84357	1,541	0,012
Ret	ret proto-oncogene	24716	1,579	0,000
Syt1	synaptotagmin I	25716	1,588	0,009
Arl5b	ADP-ribosylation factor-like 5B	364788	1,595	0,004
Gpr85	G protein-coupled receptor 85	64020	1,598	0,004
Marcks1	MARCKS-like 1	81520	1,608	0,026
Csk	c-src tyrosine kinase	315707	1,649	0,028
Gtpbp1_predicted	GTP binding protein 1 (predicted)	300077	1,664	0,000
Taar7b	trace-amine-associated receptor 7b	294126	1,667	0,026
Grm1	glutamate receptor, metabotropic 1	24414	1,682	0,008
Prlr	prolactin receptor	24684	1,709	0,040
Dock8	dedicator of cytokinesis 8	499337	1,763	0,026
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	24484	1,765	0,041
Mpp4	membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4)	58808	1,785	0,022
Tspan9_predicted	tetraspanin 9 (predicted)	312728	1,796	0,000
Arhgef3_predicted	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3 (predicted)	290541	1,893	0,000
Hnmt	histamine N-methyltransferase	81676	2,355	0,000

#### 6.1.5. Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Transport</b>				
Nutf2	nuclear transport factor 2	291981	-1,572	0,043
Sfxn1	sideroflexin 1	364678	-1,540	0,019
RGD1564200_predicted	similar to hypothetical protein MGC34646 (predicted)	366311	1,512	0,000
Clcnkb	chloride channel Kb	79430	1,521	0,016
Kcnq3	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 3	29682	1,543	0,016

Mcoln1_predicted	mucolipin 1 (predicted)	288371	1,550	0,047
Slc12a2	solute carrier family 12, member 2	83629	1,575	0,001
Mrs2	MRS2 magnesium homeostasis factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	79032	1,578	0,030
Gjb6	gap junction membrane channel protein beta 6	84403	1,592	0,001
Atp6v1c1	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit C1"	299971	1,616	0,018
Slc35f2	solute carrier family 35, member F2"	300713	1,644	0,001
Kcns1	K+ voltage-gated channel, subfamily S, 1	117023	1,734	0,029
Xpo5	exportin 5	363194	1,825	0,006
<b>Homeòstasi sanguínia</b>				
Epo	erythropoietin	24335	1,591	0,001
Tfpi	tissue factor pathway inhibitor	29436	1,634	0,000
Hs2st1	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	292155	1,635	0,011
Mmrn1	multimerin 1	500152	1,689	0,001
Fgg	fibrinogen, gamma polypeptide	24367	1,897	0,001
Alad	aminolevulinatase, delta-, dehydratase	25374	2,180	0,007
<b>Resposta immunitària</b>				
Il6ra	interleukin 6 receptor, alpha	24499	-1,858	0,021
Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	24253	-1,842	0,002
Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	84386	1,525	0,043
Isg15	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K) (predicted)	298693	1,528	0,026
Ctss	cathepsin S	50654	1,534	0,033
Klrb1b	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1B	25192	1,539	0,001
Trem1_pred	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1 (predicted)	501096	1,607	0,006
Aif1	allograft inflammatory factor 1	29427	1,657	0,023
RT1-Db1	RT1 class II, locus Db1"	294270	1,810	0,044
Cd180_predicted	CD180 antigen (predicted)	294706	2,095	0,000
Tcf4	transcription factor 4	84382	2,135	0,003

#### 6.1.6. Altres

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Altres</b>				
Ubl3	ubiquitin-like 3	363869	-1,651	0,005
Dsc2	desmocollin 2	291760	-1,600	0,021
Thtpa	thiamine triphosphatase	305889	-1,539	0,000
Olr408_predicted	olfactory receptor 408 (predicted)	296672	-1,520	0,000
Fxr1	fragile X mental retardation, autosomal homolog 1	361927	1,520	0,000
Plekha5	pleckstrin homology domain containing, family A member 5	246237	1,534	0,003
MGC108823	similar to interferon-inducible GTPase	307414	1,536	0,048
Itga7	integrin, alpha 7	81008	1,542	0,000
Olr530_predicted	olfactory receptor 530 (predicted)	295786	1,542	0,026
Ivl	involucrin	60583	1,553	0,010
RGD1560040_predicted	similar to ring finger protein 2	302775	1,589	0,011

	(predicted)			
Olr1316_predicted	olfactory receptor 1316 (predicted)	405077	1,600	0,000
LOC684383	similar to C28H8.3	684383	1,609	0,026
LOC691543	hypothetical protein LOC691543	691543	1,621	0,007
Evi2a	ecotropic viral integration site 2A	685433	1,657	0,000
Commd6	COMM domain containing 6	498559	1,703	0,014
Olr135_predicted	olfactory receptor 135 (predicted)	405913	1,746	0,000
Olr434_predicted	olfactory receptor 434 (predicted)	296694	1,761	0,001
Phex	phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (hypophosphatemia, vitamin D resistant rickets)	25512	1,776	0,002
C1galt1c1	C1GALT1-specific chaperone 1	302499	1,794	0,024
Ier2	immediate early response 2	494344	1,913	0,004
Vegp2	von Ebners gland protein 2	94106	1,925	0,002
Frmd4b	FERM domain containing 4B	252858	2,113	0,000
Dpp6	dipeptidylpeptidase 6	29272	2,129	0,000
Olr484_predicted	olfactory receptor 484 (predicted)	295750	2,478	0,000
Zpbp	zona pellucida binding protein	498415	2,661	0,000
Efha2	EF hand domain family, member A2	364601	2,700	0,000

## 6.2. Resposta a un tractament crònic de 5 i 25 mg/kg amb extracte de proantocianidines de pinyol de raïm

### 6.2.1. Metabolisme cel·lular: 5 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme lipídic</b>				
Acox2	Acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain	252898	-1,412	0,047
Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	60666	-1,349	0,044
Prdx6	Peroxiredoxin 6	94167	-1,235	0,035
Rxra	Retinoid X receptor alpha	25271	-1,203	0,022
Sptlc1_predicted	Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1_predicted	361213	1,144	0,022
Hsd17b8	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	361802	1,210	0,033
Pld3	Phospholipase D family, member 3	361527	1,260	0,043
Dgat1	Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1 (mouse)	84497	1,282	0,032
Prdx3	Peroxiredoxin 3	64371	1,312	0,046
Alb	Albumin	24186	1,824	0,025
<b>Metabolisme glucídic</b>				
Mrfap1	Mof4 family associated protein 1	282585	-1,220	0,047
Man2b1	Mannosidase, alpha, class 2B, member 1	361378	-1,208	0,039
St3gal5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	83505	1,450	0,048
<b>Metabolisme de xenobiòtics</b>				
Adh4	Alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	100145871	1,339	0,032

<b>Metabolisme proteic</b>				
Fbxo7	F-box protein 7	366854	-1,436	0,038
Rps11	Ribosomal protein S11	81774	-1,267	0,016
Eef1g	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	293725	-1,216	0,026
Mrps16	Mitochondrial ribosomal protein S16	688912	-1,212	0,032
Rpl37	Ribosomal protein L37	81770	-1,211	0,026
Rpl23	Ribosomal protein L23	29282	-1,175	0,039
Amfr	Autocrine motility factor receptor	361367	-1,168	0,039
LOC300481	Similar to 40S ribosomal protein S19	300481	-1,166	0,047
RGD1560069_predicted	Similar to ribosomal protein L27	364450	-1,163	0,039
Psmc6	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	289990	-1,162	0,042
Xpnpep1	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 1, soluble	170751	1,130	0,049
Dpp8_predicted	Dipeptidylpeptidase 8_predicted	315758	1,144	0,047
Spsb2	SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2	297592	1,190	0,042
Lrrc47	Leucine rich repeat containing 47	362672	1,191	0,047
Mrpl35	Mitochondrial ribosomal protein L35	297334	1,246	0,030
Mat1a	Methionine adenosyltransferase I, alpha	25331	1,298	0,047
Ube2d3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	81920	1,305	0,033
LOC499224	Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	499224	1,327	0,033
LOC315661	Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	315661	1,330	0,047
Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	63938	1,345	0,033
Dyt1	Dystonia 1	266606	1,435	0,046
Got2	Glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)	25721	1,480	0,015
Eif4e2_predicted	Eukaryotic translation initiation factor 4E member 2_predicted	363275	1,501	0,022
Eef1a1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	171361	1,833	0,025
<b>Metabolisme de nucleòtids</b>				
Nme2	Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in	83782	-1,202	0,045
Upb1	Ureidopropionase, beta	116593	-1,166	0,010
<b>Metabolisme energètic</b>				
Sdhc	Succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein	289217	-1,374	0,039
Atp5b	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	171374	-1,286	0,036
Pdhb	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	289950	-1,221	0,045

Dlat	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	81654	1,186	0,039
RGD1562079_predicted	RGD1562079_predicted	499125	1,231	0,036
Cyb561	Cytochrome b-561	303601	1,276	0,037
Atp5a1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	65262	1,496	0,046

### 6.2.2. Renovació cel·lular: 5 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
Trap1	TNF receptor-associated protein 1	287069	-1,339	0,044
Phb2	Prohibitin 2	114766	-1,293	0,045
Tgfbi	Transforming growth factor, beta induced	116487	-1,248	0,040
LOC498793	Similar to inter-alpha-inhibitor H2 chain	498793	-1,230	0,040
Sra1	Steroid receptor RNA activator 1	252891	-1,224	0,030
Hif1a	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	29560	-1,190	0,037
Atf5	Activating transcription factor 5	282840	-1,189	0,045
Cideb	Cell death-inducing DFFA-like effector b	364388	-1,163	0,039
Rnf111_predicted	Ring finger protein 111_predicted	300813	-1,150	0,049
Dedd	Death effector domain-containing	83631	1,224	0,048
Egln1	EGL nine homolog 1 (C. elegans)	308913	1,281	0,016
Pdcd4	Programmed cell death 4	64031	1,302	0,033
Palmd	Palmdelphin	310811	1,323	0,010
MGC94600	Scotin	301013	1,330	0,044
Casp3	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease	25402	1,434	0,037
Ppp2r1b	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	315648	1,666	0,016
<b>Regulació del cycle cel·lular</b>				
Tacc2	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	309025	1,155	0,030
Cdc34_predicted	Cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)_predicted	299602	1,318	0,029
<b>Processat DNA</b>				
Rfc2	Replication factor C (activator 1) 2	116468	1,127	0,042
Acd	Adrenocortical dysplasia homolog (mouse)	307798	1,155	0,026
Ruvbl2	RuvB-like 2 (E. coli)	292907	1,175	0,048
Polg	Polymerase (DNA directed), gamma	85472	1,218	0,047
Fancc	Fanconi anemia, complementation group C	24361	1,319	0,025
MGC94542	MGC94542   similar to RIKEN cDNA 5430437P03	290631	1,343	0,032
<b>Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina</b>				
Msl3	Male-specific lethal 3 homolog	317464	1,260	0,010

	(Drosophila)			
Hdac3	Histone deacetylase 3	84578	1,305	0,038
<b>Regulació de la transcripció</b>				
Sub1	SUB1 homolog (S. cerevisiae)	192269	-1,265	0,046
Taf1c	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, C	361420	1,194	0,039
Polr2g	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G	117017	1,262	0,045
Zfp772	Zinc finger protein 772_similar to 5730403M16Rik protein	308320	1,287	0,046
Ttf2_predicted	Transcription termination factor, RNA polymerase II_predicted	295324	1,311	0,044
Med20	Mediator complex subunit 20	316209	1,382	0,038
Preb	Prolactin regulatory element binding	58842	1,441	0,040
Taf9	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	373541	1,444	0,026
Gtf3a	General transcription factor III A	246299	1,515	0,021

### 6.2.3. Citoesquelet i processat de RNA: 5 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Citoesquelet</b>				
Lypd3	Ly6/Plaur domain containing 3	60378	-1,146	0,036
Kif16b_pred	Kinesin family member 16B_predicted	311478	1,242	0,035
Mprrip	Myosin phosphatase Rho interacting protein	116504	1,250	0,047
Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	64185	1,342	0,039
<b>Processat RNA</b>				
<b>mRNA</b>				
Raly	RNA binding protein, autoantigenic (hnRNP-associated with lethal yellow homolog (mouse))	296301	-1,210	0,036
Rbm27_pred	RNA binding motif protein 27_predicted	361317	-1,185	0,048
Rbm39	RNA binding motif protein 39	362251	-1,178	0,038
Ints4_pred	Integrator complex subunit 4_predicted	308837	1,266	0,036
Parn_pred	Poly(A)-specific ribonuclease (deadenylation nuclease)_predicted	360464	1,304	0,016
Cpsf3	Cleavage and polyadenylation specificity factor 3	298916	1,360	0,037
Ppm1g	Protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform	259229	1,361	0,030
<b>tRNA</b>				
Fars2	Phenylalanyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	306879	1,172	0,036
<b>rRNA</b>				
Nol14_pred	Nucleolar protein 14_predicted	289724	1,258	0,047
<b>Helicases RNA</b>				
Ddx17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	315133	-1,268	0,016
Ddx50	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box	361848	1,127	0,045

	polypeptide 50			
--	----------------	--	--	--

#### 6.2.4. Senyalització: 5 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Senyalització</b>				
Prkaca	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	25636	-1,264	0,026
Rhoa	Ras homolog gene family, member A	117273	-1,184	0,032
Arf3	ADP-ribosylation factor 3	140940	-1,153	0,047
Mfap4	Microfibrillar-associated protein 4	287382	-1,131	0,044
Asap1_predicted	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1_predicted	314961	1,155	0,047
Csnk1g2	Casein kinase 1, gamma 2	65278	1,202	0,047
Pi4ka	Phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha	64161	1,214	0,047
Asb6	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 6	296627	1,226	0,045
Csnk2a2_predicted	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide_predicted	307641	1,241	0,022
Smad4	SMAD family member 4	50554	1,243	0,026
Ccm2	Cerebral cavernous malformation 2	305505	1,281	0,022
Ick	Intestinal cell kinase	84411	1,314	0,047
Raf1	v-raf-leukemia viral oncogene 1	24703	1,323	0,032
Prkcz	Protein kinase C, zeta	25522	1,327	0,039
Gnb1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	24400	1,522	0,037

#### 6.2.5. Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària: 5 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Transport</b>				
Slc22a18	Solute carrier family 22, member 18	309131	-1,285	0,049
Pex26	Peroxisome biogenesis factor 26	297570	-1,253	0,048
Xpo6	Exportin 6	293476	1,148	0,047
Ccs	Copper chaperone for superoxide dismutase	84485	1,211	0,039
March3	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	364878	1,222	0,044
Atp11a	ATPase, class VI, type 11A	306600	1,235	0,016
Exoc2	Exocyst complex component 2	171455	1,259	0,048
Slc17a2_pred	Solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 2_predicted	306950	1,290	0,039
Ipo13	Importin 13	116458	1,302	0,016
Bspry	B-box and SPRY domain containing	64027	1,315	0,038
Vps4a	Vacuolar protein sorting 4 homolog A (S. cerevisiae)	246772	1,317	0,016
Exoc6	Exocyst complex component 6	50556	1,338	0,042
<b>Homeòstasi sanguínia</b>				
Fgl1	Fibrinogen-like 1	246186	-1,393	0,038
Fgb	Fibrinogen beta chain	24366	-1,308	0,044



Resposta immunitària				
Tapbp1_pred	TAP binding protein-like_predicted	297602	-1,352	0,036
C1s	Complement component 1, s subcomponent	192262	-1,339	0,018
C4b	Complement component 4B (Childo blood group)	24233	-1,311	0,030
Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	29583	-1,285	0,041
H13	Histocompatibility 13	311545	-1,251	0,044
Fcn1	Ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	83517	-1,245	0,037
C3	Complement component 3	24232	-1,239	0,033
Cnpy3	Canopy 3 homolog (zebrafish)	685174	-1,201	0,039
Mlf2	Myeloid leukemia factor 2	312709	-1,191	0,030
Batf_pred	Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like_predicted	299206	-1,160	0,033
Abcf1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	85493	1,272	0,032

#### 6.2.6. Altres: 5 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
Altres				
Chodl_predicted	Chondrolectin_predicted	288289	-1,501	0,049
Akr1c12	Aldo-keto reductase family 1, member C-like 2	307091	-1,332	0,047
RGD1563437	Similar to KIAA1217	291356	-1,299	0,045
Oaf	OAF homolog (Drosophila)	315594	-1,252	0,046
Wbp2	WW domain binding protein 2	192645	-1,238	0,041
Srp72	Signal recognition particle 72kDa	498351	-1,235	0,046
Srpr	Signal recognition particle receptor ('docking protein')	315548	-1,209	0,044
R3hdm2	R3H domain containing 2	362894	-1,193	0,040
Plekhf2	Pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2	362484	-1,154	0,032
Heatr2	HEAT repeat containing 2	304332	1,135	0,045
Stard7_predicted	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 7_predicted	296128	1,177	0,038
Ppp4r1	Protein phosphatase 4, regulatory subunit 1	140943	1,183	0,047
LOC298977	Similar to zinc finger protein 277 isoform 1	298977	1,197	0,026
Toe1_predicted	Target of EGR1, member 1 (nuclear)_predicted	298443	1,198	0,047
RGD1565411_predicted	Similar to 2610317D23Rik protein	363000	1,239	0,032
Unc84b_predicted	Unc-84 homolog B (C. elegans)_predicted	315135	1,245	0,049
Sdccag3	Serologically defined colon cancer antigen 3	306322	1,255	0,030
Fam40a	LOC362012 family with sequence similarity 40, member A	362012	1,268	0,047
Fam50a_predicted	Family with sequence similarity 50,	293862	1,271	0,045

	member A_predicted			
Gpn3	GPN-loop GTPase 3	360810	1,271	0,010
Dtnb	Dystrobrevin, beta	362715	1,295	0,035
Pigq	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q	287159	1,304	0,036
Csrp2bp_predicted	CSRP2 binding protein_predicted	362224	1,340	0,033
Tmem49	Transmembrane protein 49	192129	1,356	0,033
Tcp11l2	T-complex 11 (mouse) like 2	314683	1,370	0,047
RGD1565047	Similar to Cell division cycle 34 homolog	365006	1,417	0,011
Cldn2	Claudin 2	300920	1,496	0,047
Nhlrc3_predicted	NHL repeat containing 3_predicted	310416	1,622	0,032

### 6.2.7. Metabolisme cel·lular: 25 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme lipídic</b>				
Hsd17b11	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11	289456	-1,462	0,017
Gpd1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	60666	-1,430	0,006
Fads1	Fatty acid desaturase 1	84575	-1,374	0,041
Rxra	Retinoid X receptor alpha	25271	-1,255	0,004
Acox1	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	50681	-1,249	0,048
Mcee	Methylmalonyl CoA epimerase	293829	-1,241	0,046
Prdx6	Peroxiredoxin 6	94167	-1,236	0,044
Lcat	Lecithin cholesterol acyltransferase	24530	-1,231	0,028
Lrp1	Low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor)	299858	-1,206	0,029
Pld1	Phospholipase D1	25096	1,172	0,038
Sptlc2	Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	366697	1,175	0,030
Pld3	Phospholipase D family, member 3	361527	1,243	0,012
Cept1	Choline/ethanolamine phosphotransferase 1	310773	1,264	0,027
Iah1	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	298917	1,333	0,007
<b>Metabolisme glucídic</b>				
Man2b1	Mannosidase 2, alpha B1	361378	-1,310	0,004
Slc37a4	Solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4	29573	-1,268	0,039
Ins1	Insulin 1	24505	-1,216	0,013
H6pd	Hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	298655	-1,211	0,017
Aldoa1	Aldolase A-like 1	299052	1,188	0,025
<b>Metabolisme de xenobiòtics</b>				
Cyp4b1	Cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1	24307	1,331	0,015
Adh4	Alcohol dehydrogenase 5	100145871	1,378	0,008

Metabolisme proteic				
Fbxo7	F-box protein 7	366854	-1,396	0,000
Prodh2	Proline dehydrogenase (oxidase) 2	361538	-1,371	0,009
Ubxn4	UBX domain protein 4	304766	-1,360	0,006
Nags	N-acetylglutamate synthase	303563	-1,296	0,006
Lonp1	Lon peptidase 1, mitochondrial	170916	-1,294	0,015
Anpep	Alanyl (membrane) aminopeptidase	81641	-1,291	0,012
Bhmt2	Betaine-homocysteine methyltransferase 2	365972	-1,287	0,044
Mrps24	Mitochondrial ribosomal protein S24	498406	-1,278	0,013
Rbx1	Ring-box 1	300084	-1,269	0,037
Eif3g	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G	298700	-1,258	0,033
Rpl37	Ribosomal protein L37	81770	-1,251	0,009
Rpl32	Ribosomal protein L32	28298	-1,247	0,041
Eif3i	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I	682390	-1,244	0,033
Amfr	Autocrine motility factor receptor	361367	-1,243	0,021
Skp1	S-phase kinase-associated protein 1	287280	-1,236	0,037
Usp9x_predicted	Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked_predicted	363445	-1,233	0,023
Dnpep	Aspartyl aminopeptidase	301529	-1,230	0,008
Psmc6	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	289990	-1,227	0,037
Uba52	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	64156	-1,219	0,004
Psm4	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4	29671	-1,217	0,013
Eif3c	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	293484	-1,216	0,027
LOC641316	Similar to aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1	641316	-1,215	0,041
Eef1g	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	293725	-1,200	0,005
Fau	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed	29752	-1,195	0,037
Cct7	Chaperonin containing Tcp1, subunit 7 (eta)	297406	-1,192	0,019
Rps4x	Ribosomal protein S4, X-linked	29426	-1,183	0,029
Pfdn5_predicted	Prefoldin subunit 5_predicted	300257	-1,169	0,039
Rpl23	Ribosomal protein L23	29282	-1,161	0,017
RGD1306148	Similar to KIAA0368	313196	-1,153	0,041
Rnf111	Ring finger protein 111	300813	-1,145	0,016
Rps7	Ribosomal protein S7	29258	-1,142	0,017
LOC304240	Similar to N-terminal acetyltransferase complex ARD1 subunit homolog A	304240	1,138	0,032
Eif4a1	Eukaryotic translation initiation factor 4A1	287436	1,184	0,033
Sae1	SUMO1 activating enzyme subunit 1	308384	1,190	0,040
Spsb2	SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2	297592	1,197	0,019
RGD1565509_predicted	Similar to ribosomal protein	364699	1,207	0,015

	S2_predicted			
Sspl2a_predicted	Signal peptide peptidase-like 2A_predicted	311401	1,219	0,014
Wsb2	WD repeat and SOCS box-containing 2	288692	1,232	0,035
Cct2	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	299809	1,235	0,043
Lap3	Leucine aminopeptidase 3	289668	1,238	0,031
RGD1564425_predicted	Similar to Proteasome subunit beta type 3 (Proteasome theta chain)_predicted	296169	1,295	0,017
Eif3s6ip	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	300069	1,298	0,037
Ube2d3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	81920	1,310	0,001
LOC314123	Similar to Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (Transaminase A) (Glutamate oxaloacetate transaminase 2)	314123	1,330	0,035
LOC315661	Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	315661	1,339	0,006
Got2	Glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)	25721	1,345	0,035
Gatm	Glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	81660	1,348	0,011
Rps2	Ribosomal protein S2	83789	1,356	0,001
LOC689668	Similar to 40S ribosomal protein S2	689668	1,376	0,003
RGD1562399_predicted	Similar to 40S ribosomal protein S2_predicted	301438	1,376	0,004
Eif4e2_predicted	Eukaryotic translation initiation factor 4E member 2_predicted	363275	1,473	0,002
LOC688473	Similar to 40S ribosomal protein S2	688473	1,487	0,000
RGD1560400_predicted	Similar to ribosomal protein S2_predicted	296582	1,499	0,000
LOC364713	Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	364713	1,649	0,002
LOC499224	Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	499224	1,706	0,015
Eef1a1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	171361	1,783	0,000
<b>Metabolisme de núcleotids</b>				
Upb1	ureidopropionase, beta	116593	-1,188	0,009
Uck1_pred	Uridine-cytidine kinase 1-like 1_predicted	499956	1,258	0,012
<b>Metabolisme energètic</b>				
Cabc1	Chaperone, ABC1 activity of bc1 complex homolog (S. pombe)	360887	-1,353	0,049
Sdhc	Succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein	289217	-1,343	0,007
Ndufs7	NADH dehydrogenase (ubiquinone)	362837	-1,331	0,005

	Fe-S protein 7			
Atp5b	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	171374	-1,277	0,028
Uqcrcq	Ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII	497902	-1,256	0,029
Ndufa10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10	678759	-1,246	0,012
Ndufb5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5	294964	-1,234	0,045
Atp6v0c	ATPase, H+ transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c	170667	-1,219	0,017
Ndufa3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3	691001	-1,216	0,027
Sdhd	Succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	363061	-1,188	0,023
Nadk	NAD kinase	100125370	-1,167	0,048
Atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1	291969	1,204	0,041
Atp6v1c1	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit C1	299971	1,233	0,017
Atp1a1	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide	24211	1,267	0,041
Atp5a1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	65262	1,419	0,025
Uqcrcfs1	Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	291103	1,461	0,023

### 6.2.8. Renovació cel·lular: 25 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
Txnip	Thioredoxin interacting protein	117514	-1,339	0,005
Cideb	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B	364388	-1,330	0,029
Phb2	Prohibitin 2	114766	-1,328	0,017
Trap1	TNF receptor-associated protein 1	287069	-1,312	0,010
Tgfb1	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 precursor	116487	-1,303	0,005
Itih1	Inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 1	306251	-1,256	0,028
Hspb8	Heat shock protein B8	113906	-1,254	0,006
Col18a1	Collagen, type XVIII, alpha 1	85251	-1,253	0,017
Pphn1	Periphilin 1	366975	-1,243	0,020
Txnrd1	Thioredoxin reductase 1	58819	-1,241	0,020
LOC498793	Similar to inter-alpha-inhibitor H2 chain	498793	-1,233	0,049
Clu	Clusterin	24854	-1,218	0,010
Ggnbp2	Gametogenetin binding protein 2	360584	-1,212	0,033
RGD1311605_predicted	Similar to apoptosis related protein	298841	-1,210	0,048

	APR-3; p18 protein_predicted			
Hdgf	Hepatoma-derived growth factor	114499	-1,208	0,037
Ctsl1	Cathepsin L1	25697	-1,202	0,047
Edf1	Endothelial differentiation-related factor 1	296570	-1,150	0,023
Safb	Scaffold attachment factor B	64196	1,171	0,035
Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	84353	1,176	0,047
Poldip3	Polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 3	315170	1,183	0,033
App	Amyloid beta (A4) precursor protein	54226	1,198	0,046
Atg4c	ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)	313391	1,204	0,043
Muted_predicted	Muted homolog (mouse)_predicted	306868	1,214	0,045
Rnf114	Ring finger protein 114	362277	1,272	0,020
Pdcd4	Programmed cell death 4	64031	1,275	0,007
Dram2	DNA-damage regulated autophagy modulator 2	362011	1,277	0,046
Palmd	Palmdelphin	310811	1,289	0,026
Foxk2_predicted	Forkhead box K2	303753	1,295	0,015
MGC94600	Scotin	301013	1,325	0,017
Tp53bp1	Tumor protein p53 binding protein 1	296099	1,328	0,007
Fem1b	fem-1 homolog b (C. elegans)	315745	1,378	0,011
Tsnax	Translin-associated factor X	64028	1,396	0,023
Dnajb1_predicted	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	361384	1,438	0,017
Ppp2r1b	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	315648	1,550	0,025
<b>Regulació del cycle cel·lular</b>				
Anapc11	Anaphase promoting complex subunit 11	498030	-1,200	0,027
Cenpb_predicted	Centromere protein B_predicted	362217	1,220	0,046
Anapc4	Anaphase promoting complex subunit 4	305420	1,257	0,012
Ccndbp1	Cyclin D-type binding-protein 1	362201	1,281	0,041
Spin1	Spindlin 1	361217	1,456	0,048
<b>Processat de DNA</b>				
Msh5	MutS homolog 5 (E. coli)	294252	-1,183	0,018
MGC94542	Similar to RIKEN cDNA 5430437P03	290631	1,264	0,038
Top1	Topoisomerase (DNA) I	64550	1,279	0,003
Smarce1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	303518	1,440	0,002
<b>Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina</b>				
Hist1h2ac	Histone cluster 1, H2ac	306962	-1,185	0,037
Hist1h2an	Histone cluster 1, H2an	306970	-1,149	0,046
Msl3	male-specific lethal 3 homolog (Drosophila)	317464	1,196	0,015
Rbbp7	Retinoblastoma binding protein 7	83712	1,269	0,035
Hat1	Histone acetyltransferase 1	296501	1,274	0,020
Hdac3	Histone deacetylase 3	84578	1,300	0,034
<b>Regulació de la transcripció</b>				
Nfia	Nuclear factor I/A	25492	-1,324	0,024
Gmeb2	Glucocorticoid modulatory element	83635	-1,281	0,034

	binding protein 2			
Sin3a_predicted	SIN3 homolog A, transcription regulator (yeast)_predicted	363067	-1,271	0,034
LOC502710	Similar to Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 3 homolog (Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-4 specific MLL3)	502710	-1,258	0,020
Gatad2a	GATA zinc finger domain containing 2A	290669	-1,244	0,027
Rnf10	Ring finger protein 10	288710	-1,244	0,024
Rreb1_predicted	Ras responsive element binding protein 1_predicted	306873	-1,230	0,021
Matr3	Matrin 3	29150	-1,216	0,015
Btaf1_predicted	RGD1564130_predicted	368042	-1,213	0,031
Znf575	Zinc finger protein 575	308430	-1,201	0,017
Crebzf	CREB/ATF bZIP transcription factor	293112	-1,199	0,027
Arid4b	AT rich interactive domain 4B (Rbp1 like)	84481	-1,192	0,027
Cbfa2t2_predicted	Core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2, translocated to, 2 (human)_predicted	296293	-1,175	0,029
Med1_predicted	Mediator complex subunit 1_predicted	497991	-1,126	0,049
Btf3	Basic transcription factor 3	294680	-1,116	0,034
Med19_predicted	Mediator complex subunit 19_predicted	311165	-1,091	0,014
Taf1c	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, C	361420	1,124	0,041
Usf1	Upstream transcription factor 1	83586	1,174	0,017
Med4	Mediator complex subunit 4	306030	1,240	0,046
Cnot8	CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	363603	1,245	0,019
Ttf2_predicted	Transcription termination factor, RNA polymerase II_predicted	295324	1,263	0,017
Polr2g	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G	117017	1,264	0,005
Tgs1	Trimethylguanosine synthase homolog (S. cerevisiae)	312947	1,270	0,005
Med20	Mediator complex subunit 20	316209	1,335	0,017
Gtf3a	General transcription factor III A	246299	1,369	0,005

### 6.2.9. Citoesquelet i processat de RNA: 25 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Citoesquelet</b>				
Pls3	Plastin 3 (T-isoform)	81748	-1,205	0,018
Cnn3	Calponin 3, acidic	54321	-1,151	0,035
Kif16b_predicted	Kinesin family member 16B	311478	1,251	0,027
Mprp	Myosin phosphatase Rho interacting protein	116504	1,255	0,018
Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	64185	1,461	0,023
<b>Processat RNA</b>				
<b>mRNA</b>				
Hnrnpul1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	361522	-1,264	0,047

Sfrs3	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	361814	-1,244	0,033
Raly	RNA binding protein, autoantigenic (hnRNP-associated with lethal yellow homolog (mouse))	296301	-1,224	0,008
Cpsf6	Cleavage and polyadenylation specific factor 6	299811	-1,190	0,017
Ints4_predicted	Integrator complex subunit 4	308837	1,196	0,046
Parn_predicted	Poly(A)-specific ribonuclease (deadenylation nuclease)_predicted	360464	1,220	0,029
Ppm1g	Protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform	259229	1,267	0,012
Hnrpl1_predicted	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	313842	1,322	0,015
Cpsf3	Cleavage and polyadenylation specificity factor 3	298916	1,344	0,007
<b>rRNA</b>				
Gnl3l	Guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like	100034253	-1,212	0,016
<b>Helicases RNA</b>				
Ddx17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	315133	-1,221	0,008

#### 6.2.10. Senyalització: 25 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Senyalització</b>				
Igfals	Insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit	79438	-1,337	0,015
Gsk3a	Glycogen synthase kinase 3 alpha	50686	-1,332	0,004
Prkaca	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	25636	-1,285	0,007
Rassf3	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 3	362886	-1,283	0,045
Cops4	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 4 (Arabidopsis)	360915	-1,265	0,026
Inpp5b	Inositol polyphosphate-5-phosphatase B	362590	-1,248	0,028
LOC365949	Similar to nemo like kinase	365949	-1,244	0,003
Csnk2b	Casein kinase 2, beta subunit	81650	-1,238	0,036
Igfbp4	Insulin-like growth factor binding protein 4	360622	-1,226	0,041
Git2	G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2	304546	-1,219	0,033
Arhgdia	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	360678	-1,206	0,035
Robld3	Roadblock domain containing 3	295234	-1,175	0,047
Rhoa	Ras homolog gene family, member A	117273	-1,174	0,046
Arf3	ADP-ribosylation factor 3	140940	-1,163	0,007
Csnk1g2	Casein kinase 1, gamma 2	65278	1,149	0,025
Ptk2	Protein tyrosine kinase 2	25614	1,155	0,038
Axin1	Axin 1	79257	1,163	0,042
Prkch	Protein kinase C, eta	81749	1,178	0,044
Asap1_predicted	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin	314961	1,202	0,016



	repeat and PH domain			
Smad2	SMAD family member 2	29357	1,206	0,017
Smad4	SMAD family member 4	50554	1,232	0,007
Ptptra	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	25167	1,252	0,035
Prkd3	Protein kinase D3	313834	1,254	0,046
Rhoc	Ras homolog gene family, member C	295342	1,257	0,025
Arf1	ADP-ribosylation factor 1	64310	1,312	0,004
Map2k1ip1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1	362045	1,331	0,025
Rasgrp3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	313874	1,385	0,016
Gnb1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	24400	1,466	0,004

### 6.2.11. Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària: 25 mg/kg

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Transport</b>				
Tmem37	Transmembrane protein 37	245953	-1,339	0,035
Slc22a18	Solute carrier family 22, member 18	309131	-1,331	0,035
Tcn2	Transcobalamin 2	64365	-1,316	0,017
Slc20a2	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2	29502	-1,286	0,012
Lman2	Lectin, mannose-binding 2	290994	-1,247	0,027
Timm13	Translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	252928	-1,247	0,046
Dnm1	Dynamin 1	140694	-1,226	0,028
Vapa	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A	58857	-1,186	0,021
Sec24a_predicted	SEC24 family, member A (S. cerevisiae)_predicted	287275	-1,171	0,045
Anxa6	Annexin A6	79125	-1,171	0,020
Bloc1s1	Biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 1	288785	-1,168	0,033
Atp8b2	ATPase, class I, type 8B, member 2	361984	-1,164	0,014
Sh3bp4	SH3-domain binding protein 4	64634	-1,157	0,046
Stx8	Syntaxin 8	59074	-1,150	0,007
Snx14	Sorting nexin 14	315871	-1,143	0,015
Dnajc14	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 14	114481	1,124	0,041
Gga1	Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1	300066	1,144	0,045
Gosr2	Golgi SNAP receptor complex member 2	64154	1,179	0,026
Vps54	Vacuolar protein sorting 54 homolog (S. cerevisiae)	286932	1,208	0,017
Slc12a5	Solute carrier family 12 (potassium-chloride transporter), member 5	171373	1,218	0,037
Arcn1	Archain 1	300674	1,231	0,023
Vps4a	Vacuolar protein sorting 4 homolog A (S. cerevisiae)	246772	1,235	0,037
LOC606294	Hypothetical protein LOC606294	606294	1,239	0,005

Anxa4	Annexin A4	79124	1,245	0,045
Exoc2	Exocyst complex component 2	171455	1,250	0,016
Ipo13	Importin 13	116458	1,268	0,021
Snap23	Synaptosomal-associated protein 23	64630	1,273	0,008
Snx4_predicted	Sorting nexin 4_predicted	360725	1,285	0,001
M6pr	Mannose-6-phosphate receptor, cation dependent	312689	1,313	0,001
Exoc6	Exocyst complex component 6	50556	1,409	0,000
<b>Homeòstasi sanguínia</b>				
Fgl1	Fibrinogen-like 1	246186	-1,425	0,044
Alad	Aminolevulinate, delta-, dehydratase	25374	-1,366	0,005
Vkorc1	Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	309004	-1,323	0,044
Fgb	Fibrinogen beta chain	24366	-1,291	0,042
Cdh2	Cadherin 2	83501	-1,209	0,044
Hbs1l	Hbs1-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	293408	1,248	0,027
Emcn	Endomucin	295490	1,341	0,014
<b>Resposta immunitària</b>				
C4b	Complement component 4B (Childo blood group)	24233	-1,307	0,041
C1s	Complement component 1, s subcomponent	192262	-1,302	0,046
C3	Complement component 3	24232	-1,236	0,018
Fcn1	Ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	83517	-1,218	0,039
Masp2	Mannan-binding lectin serine peptidase 2	64459	-1,212	0,032
Peli1	Pellino 1	305549	-1,211	0,006
C5	Complement component 5	362119	-1,206	0,007
Abcf1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	85493	1,223	0,042
Mrc1_predicted	Mannose receptor, C type 1_predicted	291327	1,271	0,041
LOC498276	Fc gamma receptor II beta	498276	1,323	0,033
Vsig4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	312102	1,330	0,015
Sectm1a	Secreted and transmembrane 1A	287885	1,342	0,037
Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	116591	1,386	0,017

**6.2.12. Altres: 25 mg/kg**

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Altres</b>				
Akr1cl2	Aldo-keto reductase family 1, member C-like 2	307091	-1,428	0,025
Dhrs4	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	266686	-1,373	0,035
Ppa1	Pyrophosphatase (inorganic) 1	294504	-1,340	0,007
Smoc1	SPARC related modular calcium binding 1	314280	-1,333	0,017
LOC680367	Similar to Urinary protein 3 precursor (RUP-3)	680367	-1,312	0,008
Ssna1	Sjogren syndrome nuclear autoantigen 1	311802	-1,284	0,021

Wbscr27	Williams Beuren syndrome chromosome region 27	688407	-1,283	0,035
Wbp2	WW domain binding protein 2	192645	-1,277	0,021
Wdr74	WD repeat domain 74	690229	-1,275	0,025
Olr183_predicted	Olfactory receptor 183_predicted	293328	-1,270	0,026
RGD1305679	RGD1305679	361228	-1,265	0,040
Nucb1	Nucleobindin 1	84595	-1,261	0,012
Oaf	OAF homolog (Drosophila)	315594	-1,257	0,025
Scgb2a2	Secretoglobin, family 2A, member 2	361725	-1,241	0,031
Psrc2	Proline/serine-rich coiled-coil 2	314836	-1,234	0,021
RGD1563437	Similar to KIAA1217	291356	-1,224	0,015
Immt	Inner membrane protein, mitochondrial	312444	-1,223	0,033
RGD1310352	Similar to HTGN29 protein; keratinocytes associated transmembrane protein 2	303122	-1,222	0,046
Utx_predicted	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome_predicted	100310845	-1,222	0,025
Nudt14_predicted	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14_predicted	299346	-1,222	0,021
Pogz	Pogo transposable element with ZNF domain	310658	-1,217	0,019
Phf20l1	PHD finger protein 20-like 1	314964	-1,216	0,017
Mtmr1	Myotubularin related protein 1	317296	-1,215	0,027
Shfm1	Split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1	680532	-1,211	0,015
Tmem134	Transmembrane protein 134	361695	-1,206	0,003
LOC501529	Similar to poly(rC) binding protein 2	501529	-1,178	0,049
RGD1303130	Kidney predominant protein NCU-G1	295231	-1,170	0,027
Ier5	Immediate early response 5	498256	-1,166	0,045
Ttc33	Tetratricopeptide repeat domain 33	294774	-1,161	0,039
Tmem87b_predicted	Transmembrane protein 87B_predicted	362212	-1,157	0,041
Cldn19	Claudin 19	298487	-1,138	0,033
Cnrip1	Cannabinoid receptor interacting protein 1	364208	1,119	0,037
Eed_predicted	Embryonic ectoderm development_predicted	293104	1,179	0,035
Mfsd5_predicted	Major facilitator superfamily domain containing 5_predicted	315329	1,180	0,012
LOC678715	Similar to MORF-related gene X	678715	1,199	0,041
LOC688133	Similar to mbt domain containing 1	688133	1,200	0,027
Sh2bpm1	SH2-B PH domain containing signaling mediator 1	89817	1,200	0,035
Fam96a	Family with sequence similarity 96, member A	300797	1,207	0,039
Spag7_predicted	Sperm associated antigen 7_predicted	303260	1,214	0,028
Fam50a_predicted	Family with sequence similarity 50, member A_predicted	293862	1,224	0,027
Pde6d_predicted	Phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta_predicted	363272	1,229	0,009
Akirin1	Akirin 1	595134	1,245	0,048
Dtnb	Dystrobrevin, beta	362715	1,276	0,040
Fam40a	Family with sequence similarity 40,	362012	1,284	0,042

	member A			
RGD1565047	RGD1565047	365006	1,290	0,041
Smek1_predicted	SMEK homolog 1, suppressor of mek1 (Dictyostelium)_predicted	314388	1,291	0,010
Dennd5a	DENN/MADD domain containing 5A	308942	1,298	0,001
Pigq	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q	287159	1,317	0,013
Tmco6_predicted	Transmembrane and coiled-coil domains 6_predicted	291661	1,336	0,016
Tmem49	Transmembrane protein 49	192129	1,375	0,039
Tcp11l2	T-complex 11 (mouse) like 2	314683	1,483	0,000
Tmem9b_predicted	TMEM9 domain family, member B_predicted	293415	1,494	0,001
Spg21	Spastic paraplegia 21 homolog (human)	300791	1,509	0,000
Nhlrc3_predicted	NHL repeat containing 3_predicted	310416	1,677	0,001

### 6.3. Identificació de les molècules responsables dels efectes de les proantocianidines en un model cel·lular: epicatequina, dímer i trímer

#### 6.3.1. Totes les classificacions: epicatequina

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme proteic</b>				
RGD1560523_predicted	Similar to S-adenosylmethionine synthetase gamma form (Methionine adenosyltransferase) (predicted)	498211	1,582	0,001
RGD1561841_predicted	Similar to ribosomal protein L31 (predicted)	310388	1,759	0,002
Ubd	Ubiquitin D	29168	1,818	0,000
Mat2a	Methionine adenosyltransferase II, alpha	171347	3,470	0,000
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
Fath	Fat tumor suppressor homolog (Drosophila)	83720	-1,578	0,022
Trib3	Tribbles homolog 3 (Drosophila)	246273	1,467	0,002
<b>Regulació del cycle cel·lular</b>				
Mtus1	Mitochondrial tumor suppressor 1	306487	-1,459	0,003
G0s2	G0/G1 switch gene 2	289388	1,422	0,027
Cdkn1b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	83571	1,426	0,002
<b>Processat RNA</b>				
<b>mRNA</b>				
Rbm19_predicted	RNA binding motif protein 19 (predicted)	304512	-1,411	0,004
<b>tRNA</b>				
Pop1_predicted	Processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP family, (S. cerevisiae) (predicted)	315045	-1,400	0,046
<b>Transport</b>				
Atp6v0a1	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A1	29757	-1,408	0,010
Aqp2	Aquaporin 2	25386	-1,407	0,037

### 6.3.2. Metabolisme cel·lular: Dímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme lipídic</b>				
Abcd3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	25270	1,581	0,000
Lpin2	lipin 2	316737	1,752	0,000
Snf1lk	SNF1-like kinase	59329	1,759	0,000
Mte1	mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1	192272	1,949	0,027
<b>Metabolisme glucídic</b>				
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	362282	1,651	0,013
Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	24778	1,731	0,003
<b>Metabolisme de xenobiòtics</b>				
LOC286989	UDP-glucuronosyltransferase	286989	-2,111	0,000
<b>Metabolisme proteic</b>				
Rrs1_pred	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) (predicted)	297784	-1,505	0,011
LOC364646	similar to chaperonin containing TCP1, subunit 6A isoform a	364646	1,538	0,004
RGD1564744_pred	similar to 60S acidic ribosomal protein P1 (predicted)	314652	1,541	0,003
Aldh6a1	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1	81708	1,581	0,032
Rps26	ribosomal protein S26	27139	1,909	0,000
Stt3a_pred	similar to integral membrane protein 1 (predicted)	500972	2,041	0,001
<b>Metabolisme energètic</b>				
Lactb	lactamase, beta"	300803	-1,779	0,042
Pdia4	protein disulfide isomerase associated 4	116598	2,085	0,002
Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11	301123	3,485	0,004

### 6.3.3. Renovació cel·lular: Dímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
Foxe1	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	192274	-2,423	0,010
Krthb3	keratin, hair, basic, 3	300246	-1,788	0,018
Tnfrsf12a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	302965	-1,668	0,002
Gspt1	G1 to S phase transition 1	24420	-1,553	0,007
Dyrk2	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	314862	1,500	0,003
Egln3	EGL nine homolog 3 ( <i>C. elegans</i> )	54702	1,503	0,004
Ctnnb1	catenin (cadherin associated protein), beta 1	84353	1,557	0,008

Ppp3r1	protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)	29748	1,557	0,003
Sertad3	SERTA domain containing 3	499108	1,571	0,001
Tmem123	transmembrane protein 123	363013	1,591	0,000
Hsp90b1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	362862	1,668	0,012
Sertad2	SERTA domain containing 2	498423	1,959	0,000
<b>Regulació del cycle cel·lular</b>				
LOC288165	similar to PEST-containing nuclear protein	288165	1,609	0,004
Ccni_pred	cyclin I (predicted)	289500	1,765	0,001
Sept7	septin 7	64551	1,768	0,001
Cdkn2d	similar to cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	494444	1,788	0,006
<b>Processat DNA</b>				
Rad23a	RAD23a homolog (S. cerevisiae)	361381	-1,577	0,023
Mcm5_pred	minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) (predicted)	291885	-1,542	0,021
Parg	poly (ADP-ribose) glycohydrolase	83507	1,526	0,010
Top1	topoisomerase (DNA) I	64550	1,610	0,016
Rexo4	REX4, RNA exonuclease 4 homolog (S. cerevisiae)	311826	1,622	0,003
Hmgb1	high mobility group box 1	25459	1,664	0,000
<b>Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina</b>				
Rbbp4	retinoblastoma binding protein 4	313048	1,515	0,008
<b>Regulació de la transcripció</b>				
LOC499624	similar to TSC22 domain family protein 2 (TSC22-related-inducible leucine zipper protein 4)	499624	1,523	0,002
Rcor2	REST corepressor 2	305811	1,648	0,005
Tsc22d3	TSC22 domain family 3	83514	1,672	0,000
Phox2b_pred	paired-like homeobox 2b (predicted)	364152	1,800	0,003
RGD1561961_pred	similar to IQ motif and WD repeats 1 (predicted)	289181	1,924	0,000

#### 6.3.4. Citoesquelet i processat de RNA: Dímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Citoesquelet</b>				
Cald1	caldesmon 1	25687	1,566	0,010
Ppp4c	protein phosphatase 4, catalytic subunit	171366	1,594	0,016
Kif21a_pred	kinesin family member 21A (predicted)	300158	1,639	0,012
<b>Processat RNA</b>				
<b>mRNA</b>				
LOC308650	similar to Murine homolog of human ftp-3	308650	1,581	0,009
Thoc4	THO complex 4	690585	1,613	0,004
Csde1	cold shock domain containing E1, RNA binding"	117180	1,654	0,000
Sfrs12ip1	SFRS12-interacting protein 1	361888	2,912	0,020

rRNA				
Exosc3_predicted	exosome component 3 (predicted)	313243	1,671	0,000
LOC257642	rRNA promoter binding protein	257642	2,022	0,023
Helicases RNA				
Ddx3x	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked	317335	1,594	0,014

### 6.3.5. Senyalització: Dímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
Senyalització				
Rab15	RAB15, member RAS oncogene family	299156	-1,813	0,029
Raf1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	24703	-1,552	0,006
Irs2	insulin receptor substrate 2	29376	1,516	0,034
Gdi2	GDP dissociation inhibitor 2	29662	1,558	0,002
RGD1565940_predicted	similar to ADP-ribosylation factor-like 10B (predicted)	498234	1,605	0,001
Tm4sf12	transmembrane 4 superfamily member 12	362326	1,820	0,003

### 6.3.6. Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària: Dímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
Transport				
RGD1565367	similar to Solute carrier family 23, member 2 (Sodium-dependent vitamin C transporter 2)"	312226	-3,046	0,025
Sv2b	synaptic vesicle glycoprotein 2b	117556	-1,592	0,050
Atp2c1	ATPase, Ca <sup>++</sup> -sequestering	170699	1,589	0,003
Tmed7	transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	252889	1,609	0,028
Mk1	Mk1 protein	171436	1,664	0,010
Ergic1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1	287177	1,794	0,009
Homeòstasi sanguínia				
Tfrc	transferrin receptor	64678	1,632	0,014
Adm	adrenomedullin	25026	1,689	0,004
Prpc_predicted	prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) (predicted)	293118	1,865	0,003
Hba-a2	hemoglobin alpha, adult chain 2	25632	2,227	0,019
Resposta immunitària				
Il6ra	interleukin 6 receptor, alpha	24499	1,508	0,006

### 6.3.7. Altres: Dímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
Altres				
Zdhc18	zinc finger, DHHC domain containing 18	362613	-2,218	0,010

RGD1308699	similar to 1700060H10Rik protein	309790	-2,124	0,034
Armc6_predicted	armadillo repeat containing 6 (predicted)	306352	-1,661	0,002
Klhdc5	kelch domain containing 5	500367	-1,557	0,002
Trim26	tripartite motif-containing 26	309586	-1,519	0,028
RGD1311526_predicted	similar to RIKEN cDNA 5630401D24 (predicted)	289159	-1,516	0,010
Anp32e	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	361999	1,507	0,014
Hypk	Huntingtin interacting protein K	311359	1,507	0,009
Ppp1r14a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	114004	1,520	0,017
Calb1	calbindin 1	83839	1,702	0,000
Sh3bgrl_predicted	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like (predicted)	302363	1,757	0,010
RGD1566242_predicted	similar to RIKEN cDNA 1500009M05 (predicted)	295457	1,790	0,008
Spcs3	signal peptidase complex subunit 3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	680782	1,895	0,000

### 6.3.8. Metabolisme cel·lular: Trimer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme lipídic</b>				
Alb	Albumin	24186	-1,654	0,002
Cdig2	Cdig2 protein	266732	-1,521	0,006
Etnk1_pred	Ethanolamine kinase 1 (predicted)	312828	-1,518	0,027
Mbtps1	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	89842	-1,512	0,002
Abcd3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	25270	1,530	0,000
RGD1565715_pred	Similar to low density lipoprotein receptor-related protein binding protein (predicted)	361149	1,595	0,000
Mte1	Mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1	192272	1,769	0,049
Lpin2	Lipin 2	316737	1,826	0,000
Snf1lk	SNF1-like kinase	59329	1,937	0,000
<b>Metabolisme glucídic</b>				
LOC498793	Similar to inter-alpha-inhibitor H2 chain	498793	-1,614	0,015
B4galt6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	65196	1,505	0,002
Man2a1	Mannosidase 2, alpha 1	25478	1,515	0,009
Slc2a1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	24778	1,536	0,012
LOC299907	Similar to Ext1	299907	1,579	0,031
<b>Metabolisme de xenobiòtics</b>				
Nat13	N-acetyltransferase 13	288108	1,569	0,001
<b>Metabolisme proteic</b>				
Eif3s10	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	292148	-1,800	0,017
Ubx2	UBX domain containing 2	304766	-1,675	0,036



RGD1563905_pred	Similar to ribosomal protein L19 (predicted)	292882	-1,578	0,003
Ube2g2_pred	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (predicted)	294331	-1,534	0,047
Rrs1_pred	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae) (predicted)	297784	-1,529	0,009
Atg16l1_pred	ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae) (predicted)	363278	-1,502	0,003
Pctk2	PCTAIRE-motif protein kinase 2	314743	1,500	0,002
Rbx1	Ring-box 1	300084	1,536	0,049
Fbxl5_pred	F-box and leucine-rich repeat protein 5 (predicted)	305424	1,582	0,003
LOC294513	Similar to DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12	294513	1,625	0,001
RGD1564744_pred	Similar to 60S acidic ribosomal protein P1 (predicted)	314652	1,692	0,001
RGD1561841_pred	Similar to ribosomal protein L31 (predicted)	310388	1,699	0,002
Rps26	Ribosomal protein S26	27139	1,834	0,000
Ubd	Ubiquitin D	29168	1,999	0,000
Stt3a_pred	Similar to integral membrane protein 1 (predicted)	500972	2,022	0,001
<b>Metabolisme energètic</b>				
Lactb	Lactamase, beta	300803	-2,393	0,007
Aldh9a1	Aldehyde dehydrogenase family 9, subfamily A1	64040	-1,554	0,006
Atp5g2	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C2 (subunit 9)"	171082	1,564	0,001
Ndufa7_pred	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7 (B14.5a) (predicted)	299643	1,627	0,000
Pdia4	Protein disulfide isomerase associated 4	116598	1,639	0,014
Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11	301123	6,788	0,000

### 6.3.9. Renovació cel·lular: Trímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
Foxe1	Forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	192274	-3,171	0,002
Gspt1	G1 to S phase transition 1	24420	-1,724	0,002
Nisch	Nischarin	306255	-1,549	0,001
Alms1_pred	Alstrom syndrome 1 (predicted)	297408	-1,522	0,002
Tp53	Tumor protein p53	24842	-1,519	0,001
LOC308950	Similar to heat shock protein 1 (chaperonin)	308950	-1,517	0,004
Foxa2	Forkhead box A2	25099	1,504	0,002
Hif1a	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	29560	1,507	0,001
MGC108974	Similar to replication protein-binding	499108	1,522	0,002

	trans-activator RBT1			
Tmem123	Transmembrane protein 123	363013	1,551	0,001
Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	84353	1,565	0,001
Mmp28_pred	Matrix metalloproteinase 28 (epilysin) (predicted)	303384	1,688	0,025
Ppp3r1	Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)	29748	1,939	0,000
Sertad2	SERTA domain containing 2	498423	2,088	0,000
<b>Regulació del cicle cel·lular</b>				
Mcm2_pred	Minichromosome maintenance deficient 2 mitotin ( <i>S. cerevisiae</i> ) (predicted)	312538	-1,621	0,009
Klh22_pred	Kelch-like 22 ( <i>Drosophila</i> ) (predicted)	303792	-1,582	0,017
Setd8	Similar to SET domain-containing protein	689820	-1,564	0,017
Npepps	Aminopeptidase puromycin sensitive	50558	-1,544	0,001
Paxip1	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	311944	-1,500	0,009
Nek1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 11	315978	1,536	0,001
G0s2	G0/G1 switch gene 2	289388	1,553	0,010
LOC288165	Similar to PEST-containing nuclear protein	288165	1,607	0,004
Sept7	Septin 7	64551	1,715	0,001
Cdkn2d	Similar to cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	494444	1,875	0,004
<b>Processat DNA</b>				
Mcm5_pred	Minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 ( <i>S. cerevisiae</i> ) (predicted)	291885	-1,666	0,010
Ssrp1	Structure specific recognition protein 1	81785	-1,586	0,009
Mcm6	Minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, <i>S. pombe</i> ) ( <i>S. cerevisiae</i> )	29685	-1,557	0,001
Rad23a	RAD23a homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	361381	-1,533	0,030
Hmgb1	High mobility group box 1	25459	1,806	0,000
<b>Histones/Helicases/Remodelació de la cromatina</b>				
Chd4	Chromodomain helicase DNA binding protein 4	117535	-1,791	0,004
Rbbp4	Similar to retinoblastoma binding protein 4	685491	1,518	0,003
<b>Regulació de la transcripció</b>				
RGD1310358_pred	Similar to NNX3 (predicted)	308537	-1,716	0,005
Gtf2ird1	General transcription factor II I repeat domain-containing 1	246770	-1,526	0,003
RGD1309054_pred	Similar to FKSG26 protein (predicted)	292082	-1,518	0,028
Zfp180	Zinc finger protein 180	246279	-1,517	0,004
Fubp1	Far upstream element (FUSE) binding protein 1	654496	1,528	0,003
Med19	Mediator complex subunit 19	311165	1,575	0,000
LOC499624	Similar to TSC22 domain family protein 2 (TSC22-related-inducible)	499624	1,693	0,000

	leucine zipper protein 4)			
Tsc22d3	TSC22 domain family 3	83514	1,714	0,000
RGD1561961_pred	Similar to IQ motif and WD repeats 1 (predicted)	289181	1,840	0,000

### 6.3.10. Citoesquelet i processat de RNA: Trímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Citoesquelet</b>				
Tpm3	Tropomyosin 3, gamma	117557	-1,543	0,018
Flnb_pred	Filamin, beta (predicted)	306204	-1,514	0,010
Ppp4c	Protein phosphatase 4, catalytic subunit	171366	1,516	0,025
Wdr1	WD repeat domain 1	360950	1,539	0,003
<b>Processat RNA</b>				
<b>mRNA</b>				
Pabpc4	Poly A binding protein, cytoplasmic 4	298510	-1,711	0,030
Hnrpa3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	362152	-1,545	0,002
Fus	Fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human)	317385	-1,542	0,025
Ptbp1	Polypyrimidine tract binding protein 1	29497	-1,537	0,002
Sf3b2_pred	Splicing factor 3b, subunit 2 (predicted)	293671	-1,515	0,004
LOC360760	Similar to PABP-dependent poly(A) nuclease 3	360760	1,516	0,002
Hnrpu	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	117280	1,526	0,001
Thoc4	THO complex 4	690585	1,611	0,004
Csde1	Cold shock domain containing E1, RNA binding	117180	1,618	0,000
Pcf11_pred	Cleavage and polyadenylation factor subunit homolog (S. cerevisiae) (predicted)	361605	1,752	0,001
Snrp70_pred	U1 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A (predicted)	361574	1,844	0,002
Sfrs12ip1	SFRS12-interacting protein 1	361888	3,285	0,012
<b>tRNA</b>				
Gars	Glycyl-tRNA synthetase	297113	-1,524	0,019
<b>rRNA</b>				
Exosc3_pred	Exosome component 3 (predicted)	313243	1,860	0,000
LOC503325	Hypothetical protein LOC503325	503325	2,238	0,013
<b>Helicases RNA</b>				
Ddx31_pred	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 31 (predicted)	311835	-1,501	0,005

### 6.3.11. Senyalització: Trímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Senyalització</b>				
Rab15	RAB15, member RAS oncogene family	299156	-1,856	0,025

Gna12	Guanine nucleotide binding protein, alpha 12	81663	-1,569	0,001
Gapvd1_pred	GTPase activating protein and VPS9 domains 1 (predicted)	311880	-1,528	0,003
Acp2	Acid phosphatase 2, lysosomal	24162	-1,518	0,011
Hspa8	Heat shock protein 8	24468	-1,503	0,003
LOC679385	Similar to heat shock protein 8	679385	-1,501	0,001
Rala	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)	81757	1,500	0,005
Gdi2	GDP dissociation inhibitor 2	29662	1,507	0,003
Rab6a	RAB6A, member RAS oncogene family	84379	1,566	0,031
Dusp6	Dual specificity phosphatase 6	116663	1,594	0,000
Tm4sf12	Transmembrane 4 superfamily member 12	362326	1,695	0,005
Arhgef3_pred	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3 (predicted)	290541	1,717	0,006
RGD1565940_pred	Similar to ADP-ribosylation factor-like 10B (predicted)	498234	1,788	0,000

### 6.3.12. Transport, homeòstasi sanguínia i resposta immunitària: Trímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Transport</b>				
RGD1565367	Similar to Solute carrier family 23, member 2 (Sodium-dependent vitamin C transporter 2)"	312226	-3,427	0,017
Sv2b	Synaptic vesicle glycoprotein 2b	117556	-1,935	0,012
Gga2	Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2	293455	-1,661	0,020
Atp1a1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide	24211	-1,648	0,006
Xpo6	Exportin 6	293476	-1,636	0,014
Nedd4a	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4A	25489	-1,591	0,001
Lman2l_pred	Lectin, mannose-binding 2-like (predicted)	301343	-1,571	0,000
Sec23b_pred	SEC23B ( <i>S. cerevisiae</i> ) (predicted)	362226	-1,551	0,003
Slc28a2	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	60423	1,518	0,027
Cdw92	CDW92 antigen	85254	1,582	0,010
LOC680782	Similar to signal peptidase complex subunit 3 homolog	680782	1,911	0,000
<b>Homeòstasi sanguínia</b>				
Adm	Adrenomedullin	25026	1,580	0,006
Prcp_pred	Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) (predicted)	293118	1,614	0,010
Hba-a2	Hemoglobin alpha, adult chain 2	25632	2,533	0,010
<b>Resposta immunitària</b>				
Rnf125_pred	Ring finger protein 125 (predicted)	361296	-1,921	0,001
Tcf4	Transcription factor 4	84382	1,711	0,001

### 6.3.13. Altres: Trímer

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change	p.val
<b>Altres</b>				
Zdhhc18	Zinc finger, DHHC domain containing 18	362613	-2,238	0,009
Klhdc5	Kelch domain containing 5	500367	-1,617	0,002
Immt	Inner membrane protein, mitochondrial	312444	-1,563	0,018
LOC361335	Hypothetical protein LOC361335	361335	-1,545	0,031
Ahi1	Abelson helper integration site 1	308923	-1,539	0,004
RGD1308290_pred	Similar to RIKEN cDNA 5730454B08 (predicted)	360845	-1,523	0,001
Tmem43	Transmembrane protein 43	362401	-1,505	0,001
Anp32e	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E"	361999	1,523	0,012
Rsb1_pred	Rosbin, round spermatid basic protein 1 (predicted)	310749	1,549	0,026
LOC689399	Hypothetical protein LOC689399	689399	1,602	0,041
Spcs3	Signal peptidase complex subunit 3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	680782	1,656	0,006
RGD1311457_pred	Similar to RIKEN cDNA 2310003F16 (predicted)	311359	1,698	0,002
RGD1559748_pred	Similar to Palate lung and nasal carcinoma-like protein precursor (Tongue plunc-like protein) (predicted)	311559	1,715	0,000
Ifit2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	294091	1,758	0,026
Calb1	Calbindin 1	83839	1,767	0,001
Sh3bgrl_pred	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like (predicted)	302363	1,875	0,006
RGD1566242_pred	Similar to RIKEN cDNA 1500009M05 (predicted)	295457	1,977	0,004

## 6.4. Utilització d'un model de transcriptòmica dirigida per la identificació de gens diana

### 6.4.1. Metabolisme cel·lular: HepG2

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change GSPE 50 mg/l	Fold-Change GSPE 10 mg/l
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme lipídic</b>				
FXR	Farnesoid X receptor	9971	-3,108	1,030
CD36	Thrombospondin receptor	948	-2,464	1,076
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	19	-2,226	1,100
APOC3	Apolipoprotein C3	345	-2,146	-1,024
HNF4A	Hepatic nuclear factor 4 alpha	3172	-2,123	-1,077
MTPP	Microsomal triglyceride transfer protein	4547	-1,938	1,034

ACACA	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	31	-1,838	1,214
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	5465	-1,799	1,108
APOC2	Apolipoprotein C2	344	-1,748	-1,027
RXRA	Retinoid X receptor, alpha	6256	-1,736	1,123
SCAP	SREBP cleavage activating protein	22937	-1,726	1,041
LXR	Liver X receptor	10062	-1,722	1,097
SOAT 1	Sterol O-acyltransferase	6646	-1,624	1,055
APOE	Apolipoprotein E	348	-1,560	-1,007
APOC1	Apolipoprotein C1	341	-1,511	-1,016
SREBP1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	6720	-1,438	1,072
APOB	Apolipoprotein B	338	-1,418	1,160
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	5468	-1,317	-1,120
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	3156	-1,039	1,058
SHP	Small heterodimer partner	8431	-1,031	1,107
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	3157	1,348	1,108
LDLR	Low density lipoprotein receptor	3949	1,865	-1,004
CETP	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	1071	-	-
CYP7A1	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	1581	-	-
<b>Estrès oxidatiu</b>				
SOD1	Superoxide dismutase 1	6647	-2,627	-1,325
GPX1	Glutathione peroxidase 1	2876	-1,889	-1,091

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change F8 50 mg/l	Fold-Change F8 10 mg/l
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme lipídic</b>				
CYP7A1	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	1581	-6,812	-1,536
CD36	Thrombospondin receptor	948	-3,521	-1,063
FXR	Farnesoid X receptor	9971	-3,142	1,055
HNF4A	Hepatic nuclear factor 4 alpha	3172	-2,578	-1,037
APOC3	Apolipoprotein C3	345	-2,297	-1,091
MTTP	Microsomal triglyceride transfer protein	4547	-2,085	-1,044
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	19	-1,935	1,055
RXRA	Retinoid X receptor, alpha	6256	-1,904	1,113
CETP	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	1071	-1,888	-1,029
SCAP	SREBP cleavage activating protein	22937	-1,802	-1,064
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	5465	-1,713	-1,014
LXR	Liver X receptor	10062	-1,640	1,120
APOC2	Apolipoprotein C2	344	-1,618	-1,042
APOC1	Apolipoprotein C1	341	-1,593	-1,124

SOAT 1	Sterol O-acyltransferase	6646	-1,513	-1,048
SREBP1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	6720	-1,414	1,024
APOE	Apolipoprotein E	348	-1,403	1,034
ACACA	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	31	-1,366	-1,062
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	5468	-1,270	-1,089
APOB	Apolipoprotein B	338	-1,255	1,173
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	3156	1,102	1,202
SHP	Small heterodimer partner	8431	1,426	1,076
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	3157	1,428	1,260
LDLR	Low density lipoprotein receptor	3949	2,586	1,097
<b>Estrès oxidatiu</b>				
SOD1	Superoxide dismutase 1	6647	-2,810	-1,398
GPX1	Glutathione peroxidase 1	2876	-1,848	-1,045

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	FC EGCG 10 mg/l	FC B2 10 mg/l	FC C1 10 mg/l
<b>Metabolisme</b>					
<b>Metabolime lipídic</b>					
CYP7A1	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	1581	-1,748	-	-
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	5468	-1,210	-1,115	-1,047
APOC2	Apolipoprotein C2	344	-1,068	-1,056	-1,031
APOE	Apolipoprotein E	348	-1,051	-1,089	-1,025
APOC1	Apolipoprotein C1	341	-1,042	-1,101	1,034
SCAP	SREBP cleavage activating protein	22937	-1,037	-1,147	-1,049
APOC3	Apolipoprotein C3	345	-1,016	-1,102	-1,020
LDLR	Low density lipoprotein receptor	3949	1,004	-1,099	1,138
CD36	Thrombospondin receptor	948	1,010	1,019	1,018
SHP	Small heterodimer partner	8431	1,016	-1,002	1,091
SOAT 1	Sterol O-acyltransferase	6646	1,019	-1,011	1,124
LXR	Liver X receptor	10062	1,025	-1,005	1,126
HNF4A	Hepatic nuclear factor 4 alpha	3172	1,033	1,012	1,068
ACACA	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	31	1,036	1,051	1,220
FXR	Farnesoid X receptor	9971	1,040	1,029	1,093
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	19	1,045	1,052	1,088
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	3156	1,050	-1,066	1,135
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	5465	1,063	1,086	1,006
MTPP	Microsomal triglyceride transfer protein	4547	1,081	-1,041	1,133
RXRA	Retinoid X receptor, alpha	6256	1,091	1,020	1,167
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	3157	1,091	-1,077	1,043
SREBP1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	6720	1,115	-1,016	1,022

CETP	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	1071	1,217	-	1,032
APOB	Apolipoprotein B	338	1,298	1,298	1,640
<b>Estrès oxidatiu</b>					
SOD1	Superoxide dismutase 1	6647	-1,613	-1,404	-1,346
GPX1	Glutathione peroxidase 1	2876	1,057	-1,027	1,059

#### 6.4.2. Renovació cel·lular: HepG2

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change GSPE 50 mg/l	Fold-Change GSPE 10 mg/l
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
CASP9	Caspase 9	842	-1,572	1,003
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	4313	-1,392	1,115
CASP3	Caspase 3	836	-1,202	-1,049
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	5154	-1,164	-1,190
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1)	7076	-1,093	1,086
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A)	7422	-1,050	1,050
TGFB1	Transforming growth factor beta 1)	7040	1,106	1,146
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2)	7077	1,141	1,139
MMP9	Matrix metalloproteinase 9)	4318	1,434	1,017
MMP3	Matrix metalloproteinase 3)	4314	-	1,196

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change F8 50 mg/l	Fold-Change F8 10 mg/l
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
CASP3	Caspase 3	836	-1,899	-1,172
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	4313	-1,688	1,162
CASP9	Caspase 9	842	-1,333	1,067
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	7076	-1,052	1,065
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	5154	-1,039	1,047
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	7422	-1,027	-1,063
TGFB1	Transforming growth factor beta 1	7040	-1,018	-1,016
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	7077	1,030	1,029
MMP3	Matrix metalloproteinase 3	4314	1,510	-1,072
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	4318	-	1,218

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	FC EGCG 10 mg/l	FC B2 10 mg/l	FC C1 10 mg/l
<b>Renovació cel·lular</b>					
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>					
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	4318	-3,053	1,075	-
CASP3	Caspase 3	836	1,025	-1,134	1,056



TGFB1	Transforming growth factor beta 1	7040	1,059	-1,039	1,186
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	7077	1,065	-1,170	1,015
CASP9	Caspase 9	842	1,071	-1,002	1,124
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	7422	1,100	1,036	1,202
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	7076	1,138	1,078	1,007
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	4313	1,147	1,152	1,120
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	5154	1,201	1,019	1,228
MMP3	Matrix metalloproteinase 3	4314	-	1,020	-1,243

#### 6.4.3. Homeòstasi sanguínia: HepG2

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change GSPE 50 mg/l	Fold-Change GSPE 10 mg/l
<b>Homeòstasi sanguínia</b>				
FGG	Fibrinogen gamma chain	2266	-2,199	1,088
FGA	Fibrinogen alpha chain	2243	-1,946	1,013
F7	Coagulation factor VII	2155	-1,942	1,035
AGT	Angiotensinogen	183	-1,831	-1,022
FGB	Fibrinogen beta chain	2244	-1,530	1,157
F3	Tissue factor	2152	-1,387	1,019
PLAT	Tissue plasminogen activator	5327	-1,374	1,036
EDN1	Endothelin 1	1906	1,666	-1,446
PLAU	Urokinase plasminogen activator	5328	2,463	1,114
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	5054	3,001	-1,156
NPPB	Natriuretic peptide precursor B	4879	14,060	-

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change F8 50 mg/l	Fold-Change F8 10 mg/l
<b>Homeòstasi sanguínia</b>				
FGG	Fibrinogen gamma chain	2266	-2,234	-1,037
F7	Coagulation factor VII	2155	-1,939	1,108
AGT	Angiotensinogen	183	-1,849	-1,034
FGA	Fibrinogen alpha chain	2243	-1,765	-1,010
PLAT	Tissue plasminogen activator	5327	-1,558	1,127
FGB	Fibrinogen beta chain	2244	-1,352	1,030
F3	Tissue factor	2152	-1,307	1,118
PLAU	Urokinase plasminogen activator	5328	2,782	-1,008
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	5054	3,009	-1,122
EDN1	Endothelin 1	1906	3,104	-1,150
NPPB	Natriuretic peptide precursor B	4879	22,575	-

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	FC EGCG 10 mg/l	FC B2 10 mg/l	FC C1 10 mg/l
<b>Homeòstasi sanguínia</b>					
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	5054	-1,182	-1,143	-1,145
PLAT	Tissue plasminogen activator	5327	-1,137	-1,255	1,103
FGA	Fibrinogen alpha chain	2243	-1,084	1,072	1,172
FGG	Fibrinogen gamma chain	2266	-1,014	-1,278	-1,108
F7	Coagulation factor VII	2155	1,005	1,030	-1,006
PLAU	Urokinase plasminogen activator	5328	1,027	-1,036	1,180
AGT	Angiotensinogen	183	1,032	-1,040	1,127
EDN1	Endothelin 1	1906	1,108	1,017	1,184
F3	Tissue factor	2152	1,112	1,009	1,197
FGB	Fibrinogen beta chain	2244	1,151	1,036	1,017
NPPB	Natriuretic peptide precursor B	4879	-	1,042	-

#### 6.4.4. Resposta inflamatòria: HepG2

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change GSPE 50 mg/l	Fold-Change GSPE 10 mg/l
<b>Resposta inflamatòria</b>				
ITGB2	Integrin, beta 2	3689	-1,944	-1,102
LFA1	Integrin, alpha L	3683	-1,775	1,125
MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9	5601	-1,497	1,051
CD40	TNF receptor superfamily member 5	958	-1,425	-1,014
IKK2	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	3551	-1,425	1,197
FAS	TNF receptor superfamily, member 6	355	-1,409	1,069
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	4790	-1,198	-1,036
NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	4846	-1,052	1,144
IKBa	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4792	1,004	-1,126
IL18	Interleukin 18	3606	1,062	-1,040
MCSF	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	1435	1,690	1,061
AP-1	Activator protein 1	3725	1,880	1,176
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	3383	2,264	1,016
IL8	Interleukin 8	3576	3,311	1,011

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change F8 50 mg/l	Fold-Change F8 10 mg/l
<b>Resposta inflamatòria</b>				
LFA1	Integrin, alpha L	3683	-2,479	1,508
ITGB2	Integrin, beta 2	3689	-1,696	-1,004
MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9	5601	-1,669	1,033
CD40	TNF receptor superfamily member 5	958	-1,479	1,086

FAS	TNF receptor superfamily, member 6	355	-1,449	1,028
IKK2	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	3551	-1,351	1,001
IKBa	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4792	-1,224	-1,204
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	4790	-1,183	-1,018
IL18	Interleukin 18	3606	-1,013	1,014
MCSF	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	1435	1,701	1,029
AP-1	Activator protein 1	3725	2,052	1,087
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	3383	2,335	-1,007
IL8	Interleukin 8	3576	4,078	1,113
NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	4846	-	-1,212

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	FC EGCG 10 mg/l	FC B2 10 mg/l	FC C1 10 mg/l
<b>Resposta inflamatòria</b>					
IL18	Interleukin 18	3606	-1,124	-1,278	1,020
ITGB2	Integrin, beta 2	3689	-1,115	-1,132	-1,031
IKBa	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4792	-1,096	-1,099	-1,023
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	4790	-1,078	-1,091	1,041
MCSF	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	1435	-1,056	-1,063	1,078
FAS	TNF receptor superfamily, member 6	355	-1,041	-1,019	1,011
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	3383	1,023	1,052	1,164
CD40	TNF receptor superfamily member 5	958	1,056	-1,006	1,151
AP-1	Activator protein 1	3725	1,063	1,026	1,220
IL8	Interleukin 8	3576	1,074	-1,085	1,177
MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9	5601	1,119	1,052	1,185
IKK2	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	3551	1,147	1,122	1,145
LFA1	Integrin, alpha L	3683	1,173	1,121	1,069
NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	4846	-	-1,437	-

#### 6.4.5. Metabolisme cel·lular: HUVEC

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change GSPE 25 mg/l	Fold-Change F8 25 mg/l
<b>Metabolisme</b>				
<b>Metabolisme lipídic</b>				
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	3156	-1,621	-1,691
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A	19	-1,292	1,023

	(ABC1), member 1			
ACACA	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	31	-1,206	-1,270
LDLR	Low density lipoprotein receptor	3949	-1,175	-1,234
CD36	Thrombospondin receptor	948	-1,135	1,093
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	5465	-1,130	1,300
APOD	Apolipoprotein D	347	-1,124	1,078
SCAP	SREBP cleavage activating protein	22937	-1,119	-1,021
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	3157	-1,116	-1,119
CETP	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	1071	-1,079	1,123
SOAT 1	Sterol O-acyltransferase	6646	-1,052	1,161
APOC1	Apolipoprotein C1	341	-1,007	1,151
SREBP1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	6720	-1,002	1,142
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	5465	1,070	1,318
LXR	Liver X receptor	10062	1,074	1,096
INSIG1	Insulin induced gene 1	3638	1,120	1,091
RXRA	Retinoid X receptor, alpha	6256	1,241	1,210
PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	5742	-1,270	1,030
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	5743	1,263	1,405
APOE	Apolipoprotein E	348	1,408	1,079
PLA2G7	Phospholipase A2, group VII	7941	-	-1,260
<b>Estrès oxidatiu</b>				
SOD1	Superoxide dismutase 1	6647	-1,386	-1,189
GPX1	Glutathione peroxidase 1	2876	-1,270	1,030

#### 6.4.6. Renovació cel·lular: HUVEC

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change GSPE 25 mg/l	Fold-Change F8 25 mg/l
<b>Renovació cel·lular</b>				
<b>Apoptosi/Diferenciació/Proliferació/Creixement</b>				
CASP3	Caspase 3	836	-1,197	1,127
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	4313	-1,166	1,029
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	7077	-1,124	1,095
CASP9	Caspase 9	842	1,006	1,009
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	7076	1,037	1,163
TGFB1	Transforming growth factor beta 1	7040	1,042	1,076
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	5154	1,120	1,352
VEGFA	Vascular endothelial growth factor	7422	1,687	1,807

#### 6.4.7. Homeòstasi sanguínia: HUVEC

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change GSPE 25 mg/l	Fold-Change F8 25 mg/l
<b>Homeòstasi sanguínia</b>				
EDN1	Endothelin 1	1906	-6,444	-14,061
F3	Tissue factor	2152	-1,605	-1,528
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	5054	-1,352	-1,259
VWF	Von Willebrand factor	7450	-1,225	1,014
PLAT	Tissue plasminogen activator	5327	-1,019	1,065
ACE	Angiotensin I converting enzyme	1636	1,033	1,097
PLAU	Urokinase plasminogen activator	5328	1,468	3,026

#### 6.4.8. Resposta inflamatòria: HUVEC

Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Fold-Change GSPE 25 mg/l	Fold-Change F8 25 mg/l
<b>Resposta inflamatòria</b>				
SELE	Selectin E	6401	-2,358	-1,374
CRP	C-reactive protein	1401	-1,596	1,331
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	7412	-1,448	-1,100
IL6	Interleukin 6	3569	-1,445	-1,489
IL8	Interleukin 8	3576	-1,356	-1,208
ITGB2	Integrin, beta 2	3689	-1,335	-1,153
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1)	4790	-1,209	-1,109
IL18	Interleukin 18	3606	-1,192	-1,731
FAS	TNF receptor superfamily, member 6	355	-1,109	-1,023
AP-1	Activator protein 1	3725	-1,001	1,543
ITGA4	Integrin, alpha 4	3676	1,000	1,000
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	6347	1,038	1,087
IKK2	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	3551	1,045	1,131
NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	4846	1,049	1,067
MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9	5601	1,064	1,104
IKBa	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4792	1,133	1,227
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	3383	1,134	1,075
MCSF	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	1435	1,156	1,330
CD40	TNF receptor superfamily member 5	958	1,192	1,069

## 7. ANNEX 2

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

## Capítulo 3

### Nutrigenómica y alimentos

Sabina Díaz\*, Isabel Baiges\*\* y Lluís Arola\*\*\*

Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Universidad Rovira i Virgili de Tarragona

\* Investigadora en formación del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili.

\*\* Investigadora del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili.

\*\*\* Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Rovira i Virgili. Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Campus Sescelades. (C/ Marcel·lí Domingo, s/n. 43007. Tarragona). lluis.arola@urv.cat

#### Resumen

Entre los alimentos actuales con mayor potencial industrial está el grupo de los denominados alimentos funcionales, aquellos que son efectivos en la prevención y mejora de patologías concretas. Para la calificación de un alimento como funcional es imprescindible evaluar su eficacia cuando está listo para el consumo humano.

Los sistemas de evaluación de eficacia son diversos: siguen un proceso que comienza con estudios in vitro, continúa in vivo, con animales experimentales, y termina con estudios de intervención en humanos. Es un proceso largo y de coste elevado que debe realizarse cuando el alimento está terminado. Para evitar fracasos y reducir los estudios de intervención a los casos imprescindibles, hay que disponer de metodologías que permitan predecir, con la mayor seguridad posible, la futura eficacia del alimento que está en producción.

Los conocimientos actuales de la nutrigenómica, ciencia que estudia la interacción de los nutrientes con los genes, han permitido constatar que hay muchos genes cuya expresión es sensible a la presencia de determinados principios activos en los alimentos. Del estudio de su modificación se obtienen conclusiones significativas para comprender la interacción de moléculas bioactivas con los procesos patológicos.

Combinando el estudio de la expresión de genes clave en patologías concretas con marcadores de punto final de procesos metabólicos, es posible diseñar un sistema de evaluación de eficacia de alta fiabilidad y bajo coste relativo. En este estudio se propone una metodología utilizable y se demuestra su interés científico e industrial.



## **Alimentos funcionales**

La interrelación entre alimentos y salud es, hoy por hoy, una evidencia científica que ha conducido a la industria de los alimentos, a la comunidad científica, a las organizaciones de consumidores y las autoridades sanitarias a interesarse por las posibilidades de utilizar los alimentos como vehículo para mantener y promover un buen estado de salud y bienestar, así como para reducir el riesgo de sufrir determinados tipos de enfermedades. Una correcta alimentación es esencial para este propósito, aunque a menudo no suficiente. Los avances científicos, especialmente en Japón en la segunda mitad del siglo pasado, llevaron a establecer que los alimentos pueden utilizarse, más allá de sus valores intrínsecos en nutrición, como vehículos para administrar sustancias bioactivas que modifiquen procesos bioquímicos o fisiológicos y mejoren el estado de salud.

De aquí nace el concepto de alimento funcional, una tipología de alimentos que, utilizando una definición de consenso en la Unión Europea derivada del proyecto FUFOS (1), se corresponde con aquellos alimentos para los que se puede demostrar satisfactoriamente que ejercen un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que su consumo resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas. Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos, y deben producir sus efectos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta. Un alimento funcional puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido un componente, o un alimento al que se le ha quitado un componente mediante procesos tecnológicos o biológicos; también puede tratarse de un alimento en el que se ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes, o cualquier combinación de estas posibilidades.

En la Europa actual la interrelación entre nutrición óptima y vida sana está ganando aceptación pública, y los consumidores están buscando cada vez más información sobre los alimentos que compran. La industria alimentaria quiere aprovechar los conocimientos generados en ciencia básica de alimentos y está invirtiendo en proyectos de innovación, especialmente en el campo de los alimentos funcionales (2), aunque para la inversión industrial tan solo es un incentivo real un alimento del que se puedan trasladar los efectos positivos sobre la salud a los consumidores de manera satisfactoria. De aquí surge la necesidad de crear alegaciones que permitan certificar los efectos de los alimentos sobre la salud de forma creíble para los consumidores. Resulta evidente que la evolución y desarrollo de los alimentos funcionales ha de ir acompañada de sistemas de control y seguimiento para garantizar que las alegaciones se utilicen para promover la salud pública y la protección de

los consumidores contra la información que pueda ser falsa o errónea (3).

En 2006, el Parlamento Europeo aprobó una legislación para regular las alegaciones de salud para los alimentos (4) que establece que deben ser científicamente probadas y claras, y no ambiguas para los consumidores. Una alegación se define como cualquier mensaje o representación que afirme, sugiera o implique que un alimento tiene características particulares. Las “alegaciones nutricionales” hacen referencia a la energía que aportan y a los nutrientes u otras sustancias que contengan o no contengan. Las “alegaciones de salud” refieren la existencia de una interrelación entre un alimento o uno de sus componentes y la salud. La normativa prohíbe, con alguna excepción, la utilización de alegaciones nutricionales o de salud que no tengan establecidos “perfiles nutricionales” (por ejemplo, alto en sal, rico en ácidos grasos saturados), perfiles que deben ser definidos a partir de conocimientos científicos sobre dieta, nutrición y su relación con la salud y, especialmente, sobre el papel de nutrientes y otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico en las patologías crónicas.

La aplicación de la nueva regulación europea impone pues unas nuevas reglas del juego para la industria de los alimentos: para comercializar productos como alimentos funcionales hay que garantizar, con una base científica sólida, su relación con la salud de los consumidores, es decir, hay que haber demostrado su eficacia.

#### **Eficacia de los alimentos funcionales**

Habitualmente, el diseño de un nuevo alimento funcional comienza a partir de conclusiones de estudios epidemiológicos que correlacionan dietas particulares con prevalencia de determinadas patologías en poblaciones representativas. En ocasiones, el análisis diferencial de la dieta permite identificar sustancias bioactivas utilizables en la producción de alimentos a partir de las cuales es posible plantear un nuevo alimento funcional. Tras identificar la sustancia bioactiva de interés, en primer lugar habrá que comprobar si es segura con los procedimientos bien estandarizados de la industria farmacéutica. En segundo lugar habrá que determinar en sistemas in vitro cuál es su diana bioquímica y qué efectos ejerce sobre ella en relación con el proceso patológico para el que la sustancia en estudio tiene interés. Posteriormente habrá que aumentar el nivel de complejidad pasando a estudios in vivo con animales experimentales para validar los estudios in vitro. En este punto, surge la necesidad de utilizar “biomarcadores”, entendidos como una característica que es objetivamente medible y evaluable como indicador de un proceso biológico normal, de un proceso patológico o de una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (5). Los

biomarcadores se han convertido en un elemento esencial en la ciencia de la nutrición para demostrar, en estudios de intervención –es decir, en estudios en humanos–, los efectos de nutrientes o sustancias bioactivas en un periodo de tiempo razonable y con un coste también moderado, aunque la información que aportan es parcial y, en ocasiones insuficiente, y hay que buscar combinaciones de biomarcadores u otras estrategias para obtener información concluyente (6). La comunidad científica europea acepta un sistema de biomarcadores de complejidad creciente (7) que permiten obtener conclusiones fiables de los estudios de intervención en humanos, que son habitualmente concluyentes para fijar las bases científicas de las alegaciones nutricionales y de salud. Es un proceso largo y costoso que no puede aplicarse hasta que un nuevo alimento esté terminado y sea directamente utilizable para el consumo humano.

Durante el proceso de diseño de un nuevo alimento, la industria necesita sistemas de validación de eficacia que permitan predecir, con la máxima seguridad, los resultados de la utilización de planteamientos innovadores. Hay que poder prever el potencial de sustancias bioactivas para utilizarlas en la producción de alimentos funcionales, y hay que poder seguir su evolución a lo largo de las operaciones necesarias para la fabricación del alimento. No es posible realizar estudios completos en cada momento del proceso por lo que es necesario diseñar estrategias metodológicas que, con la máxima fiabilidad posible, permitan predecir los resultados finales. Evidentemente, hay que comprobar la eficacia de productos terminados y hay que hacerlo mediante estudios de intervención en poblaciones representativas y con rigor estadístico, pero no es viable ni tiene sentido realizar estudios de intervención durante el proceso de fabricación.

En la última década, la ciencia de la nutrición ha comprendido que los efectos de la nutrición sobre la salud y la enfermedad no pueden entenderse sin un profundo conocimiento sobre cómo actúan los nutrientes a nivel molecular. Los factores que llevan a esta conclusión son tres (8): el primero se deriva de los proyectos de secuenciación completa de genomas que permiten visualizar la importancia de los genes en nutrición cuando se demuestra que los nutrientes afectan directamente la expresión génica. El segundo esta basado en la evidencia de que los micro y macronutrientes son potentes señales que influyen en el funcionamiento celular y juegan un importante papel en el control homeostático. El tercero se deriva del conocimiento de que la predisposición genética tiene un papel significativo en el desarrollo de las tres principales causas de mortalidad ligadas a la dieta, como son la patología cardiovascular, la diabetes tipo 2 y el cáncer. De aquí surge la nutrigenómica, ciencia que trata de estudiar las influencias de la nutrición sobre el genoma (9, 10, 11). Desde la

perspectiva de la nutrigenómica, los nutrientes son señales de la dieta que son detectadas por sistemas de sensores celulares, como pueden ser los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, que modulan la expresión génica, la expresión proteica y, consiguientemente, la producción de metabolitos. La nutrigenómica trata de identificar genes que influyen en el riesgo de las patologías relacionadas con la dieta a gran escala y de entender el mecanismo que está en la base de la predisposición genética.

Las tecnologías “ómicas” que son la base metodológica de la nutrigenómica, no son tan solo necesarias para el desarrollo del estudio de la interacción genes-nutrientes sino que también, en el contexto de la ciencia de la nutrición, pueden utilizarse como biomarcadores de la predisposición individual y de la eficacia de nutrientes o ingredientes (12). Aunque son especialmente útiles para, desde una visión de sistema, visualizar diferencias entre grupos, su desarrollo metodológico permite utilizarlas para la producción de alimentos funcionales en la fase de diseño, utilizando como biomarcadores genes clave en la interacción de nutrientes o ingredientes con el metabolismo que varían sus niveles de expresión en una situación patológica.

#### **Biomarcadores para el desarrollo de alimentos funcionales**

Según nuestra hipótesis, un sistema eficiente para seguir la eficacia de los alimentos funcionales durante su diseño industrial puede consistir en identificar genes clave con expresión sensible a nutrientes o sustancias bioactivas y utilizarlos en sistemas in vitro como biomarcadores que permitan, de forma rápida y relativamente económica, predecir su interés en la prevención o mejora de estados patológicos durante el desarrollo del producto. Para obtener conclusiones consistentes, hay que utilizar en paralelo biomarcadores de proceso; es decir, hay que poder controlar procesos metabólicos clave, no únicamente cuantificando metabolitos de punto final, sino especialmente siguiendo procesos dinámicos que permitan obtener información sobre la modificación de vías o procesos metabólicos significativos.

La metodología que hemos diseñado tiene dos fases y consiste, en primer lugar, en seleccionar un sistema celular óptimo como modelo experimental según la patología que se desee prevenir o paliar. En la primera fase, en la que se trabaja con marcadores de proceso, se trata de identificar procesos clave en las patologías en estudio para poder seguirlos experimentalmente, por ejemplo, captación de glucosa por células de tejidos periféricos en el estudio de la diabetes tipo 2. En la segunda fase, relativa a la utilización de marcadores génicos, hay que empezar identificando los genes de interés. En principio un estudio

bibliogràfic es suficient en esta fase, aunque puede completarse con la realizaci3n de arrays de alta densidad para conocer los genes que alteran su expresi3n cuando las c3lulas son tratadas con la substancia bioactiva en estudio. A partir de esta informaci3n hay que seleccionar los genes que se utilizarán como biomarcadores para construir un array de baja densidad con los genes biomarcadores mediante el que se pueda evaluar los cambios en la expresi3n g3nica de los genes seleccionados en c3lulas tratadas con las sustancias bioactivas en estudio. Antes del array de baja densidad, hay que fijar las condiciones experimentales, lo que puede hacerse seleccionando genes clave y valorando su expresi3n mediante PCR real time para fijar la concentraci3n de la sustancia bioactiva y el tiempo 3ptimos para observar un efecto determinado.

### **Proantocianidinas y metabolismo lipídico**

Diversos estudios (13, 14, 15) han mostrado que las proantocianidinas presentes en la dieta son biomol3culas activas. Actúan como cardioprotectoras (16), antioxidantes (17), antigenot3xicas (18), antiinflamatorias (19) y anticancerígenas (20). La acci3n protectora de las proantocianidinas puede extenderse a alteraciones metab3licas que son factores de riesgo para las patologías cardiovasculares, como la resistencia a la insulina, dislipemia, hipertensi3n arterial y obesidad, colectivamente agrupadas como s3ndrome metab3lico. Son, por tanto, mol3culas potencialmente utilizables en la prevenci3n de estas patologías.

En este contexto y utilizando la metodología descrita, nuestro grupo ha estudiado el potencial de las proantocianidinas como mol3culas correctoras de las alteraciones del metabolismo lipídico. En trabajos previos observamos una disminuci3n del 50% en los niveles circulantes de triacilgliceroles en ratas, cinco horas despu3s de la administraci3n de un extracto de proantocianidinas de pepita de uva (GSPE), junto con una positiva alteraci3n de la distribuci3n del colesterol ligado a lipoproteínas (21). Partimos de una evidencia experimental obtenida en estudios in vivo y queremos demostrar que utilizando nuestra propuesta metodol3gica podemos llegar a la misma conclusi3n mediante un sistema in vitro.

Por una parte, usamos lo que hemos denominado marcadores de proceso. En este caso, hemos cuantificado la s3ntesis de novo de triacilgliceroles y colesterol por c3lulas hepáticas HepG2 y su secreci3n al medio. El tratamiento de las c3lulas con proantocianidinas a dosis moderadas, de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 1, nos indica que se produce una disminuci3n del 83% de la secreci3n de triacilgliceroles al medio y una disminuci3n del 48% de la secreci3n de colesterol total, un resultado notable que concuerda con los resultados obtenidos in vivo y que confirma el inter3s de las proantocianidinas como

principio activo utilizable en alimentación funcional para corregir dislipemias. Sin embargo, es un resultado insuficiente para validar la metodología propuesta, pero que aún así nos sirve, in vitro, como marcador de proceso.

Para completar la metodología, utilizamos en paralelo los biomarcadores genéticos, analizando la expresión de genes clave del metabolismo de los lípidos y de su control. La intención es encontrar perfiles de expresión condicionados por las proantocianidinas que permitan predecir un efecto positivo en relación con la corrección de las dislipemias. De este modo, dispondremos de un procedimiento más rápido y práctico con el que seguir la elaboración de alimentos funcionales con proantocianidinas.

La selección de genes clave que puedan servirnos como biomarcadores no es una tarea sencilla, ya que ha de centrarse en un número pequeño y representativo. Hemos utilizado información bibliográfica de forma exhaustiva y, también, las conclusiones a las que han llegado los fabricantes de arrays de baja densidad para pruebas diagnósticas en clínica. Al final, hemos elegido un conjunto significativo de genes directamente implicados en el metabolismo y transporte de lípidos, y los genes que codifican los receptores nucleares relacionados con el metabolismo lipídico, ya que pensamos que son candidatos especialmente sugerentes por su doble condición de interactuar con los nutrientes y con el ADN.

La expresión de los genes varía mucho con el tiempo por lo que es necesario fijar bien el momento de su estudio. Para no tener que realizar arrays de baja densidad para concretar el tiempo de estudio, seleccionamos algún gen que consideramos clave en el proceso y evaluamos su respuesta a tiempos cortos y largos. Lógicamente, la elección de un único tiempo conlleva pérdida de información porque no todos los genes responden a la misma velocidad, pero la necesaria simplificación del proceso obliga a limitar las condiciones experimentales. El mismo proceso nos sirve para fijar la concentración de trabajo óptima de la sustancia bioactiva. Si se trata de entender mecanismos, lógicamente, habrá que analizar los resultados con mayor profundidad, pero no es este el objetivo del presente trabajo.

Para el caso ejemplo que nos ocupa, hemos seleccionado un gen que consideramos clave en el metabolismo del colesterol, el que codifica la proteína Nieman-Pick C1 like1 (NPC1L1), una proteína que tiene un papel crítico en la absorción de colesterol en el intestino y que también se expresa en células hepáticas donde puede facilitar la captación de colesterol libre del medio y modular su excreción en forma de ácidos biliares (22, 23). Los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla 1, nos llevaron a seleccionar un tiempo largo de 9 horas y

una dosis media de 50 mg/l.

Fijadas las condiciones de trabajo, realizamos un array de baja densidad con los genes y resultados referidos en las Figuras 2 y 3. En relación con los genes biomarcadores del metabolismo y transporte de lípidos, se observa (Figura 2) una represión generalizada de todos ellos en nuestro modelo de células HepG2. Únicamente los genes que codifican para la sintetasa del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA y para el receptor de LDL se encuentran significativamente sobre expresados, mientras que no se observa ninguna variación en el gen de la reductasa del 3-hidroxi-3-metilglutarilCoA.

Estos resultados son sugerentes, ya que indican una disminución en la síntesis de lípidos, un aumento en su degradación y una cierta inhibición de los procesos que permiten su excreción celular, especialmente por lo que al colesterol se refiere. También sugieren una modificación del transporte de colesterol en un sentido positivo para corregir una situación de dislipemia. Concuerdan con los resultados in vivo y los obtenidos in vitro con marcadores de proceso.

En relación con los genes que codifican para los receptores nucleares (Figura 3) se observa una represión generalizada para todos los genes estudiados excepto para el gen que codifica para SHP. Los resultados obtenidos indican que las proantocianidinas son capaces de alterar la expresión de estos genes, importantes en el contexto de regulación del metabolismo como respuesta a la presencia de nutrientes. Los receptores analizados modifican su expresión en el mismo sentido que anteriormente se ha comentado: disminuyendo la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles.

Sin duda es posible e interesante profundizar en el sentido de los sugerentes cambios de expresión génica reseñados, pero sin embargo este trabajo no tiene ese propósito. Nuestra intención es proponer una metodología, una estrategia novedosa para el diseño de alimentos funcionales que añade valor a la nutrigenómica. Los resultados obtenidos demuestran que es una metodología utilizable para las proantocianidinas y las dislipemias. Habrá que probar otras sustancias bioactivas en esta u otras situaciones patológicas para poder generalizar esta conclusión.

Agradecimientos: La realización del presente trabajo ha sido posible por la financiación obtenida del proyecto CENIT MET-DEV-FUN.

## Bibliografia

1. Diplock AT, Aggett PJ, Aswell M, Bornet F, Fern EB and Roberfroid MB (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br J Nutr.* 81 Suppl 1: S1-27.
2. [http://etp.ciaa.be/documents/general\\_presentation.pdf](http://etp.ciaa.be/documents/general_presentation.pdf)
3. Palou A, Pico C and Bonet ML (2004). Food safety and functional foods in the European Union: obesity as a paradigmatic example for novel food development. *Nutr Rev.* 62 Suppl 1: S69-181.
4. [http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/claims/common\\_position05\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/claims/common_position05_en.pdf)
5. Zeger SL (1999). Biomarkers and surrogate endpoints. *Advancing Clinical Research and Applications.* NIH & FDA Symposium. April 15-17
6. Weber P, Flühmann B, Eggersdorfer M (2006). Development of bioactive substances for functional foods – Scientific and other aspects. Heinrich M, Müller WE, Galli C (eds). *Local Mediterranean Food Plants and Nutraceuticals.* Forum Nutr. Basel, Karger, vol 59, pp 171-181
7. Aggett PJ, Antoine JM, Asp NG, Bellisle F, Contor L, Cummings JH, Howlett J, Müller DJ, Persin C, Pijls LT, Rechkemmer G, Tuijelaars S, Verhagen H. (2005). PASSCLAIM: consensus on criteria. *Eur J Nutr.*; 44 Suppl 1:i5-30
8. Müller M and Kersten S (2003). Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat. Rev. Genet.*, 4: 315-322
9. Ordovas JM and Mooser V (2004). Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr. Opin. Lipidol.*, 15: 101-108
10. van Ommen B. (2004). Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arenas. *Nutrition*, 20: 4-8.
11. Afman L and Müller M (2006). Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J. Am. Diet. Assoc.*, 106: 569-576
12. Kussmann M, Raymond F and Affolter M (2006). OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *J. Biotechnol.*, 124: 758-787
13. Arts IC, Hollman PC (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81:317S-325S.
14. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C and Jimenez L (2005). Dietary polyphenols



and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:287306.

15. Pinent M, Bladé C, Salvadó MJ, Blay M, Pujadas G, Fernandez-Larrea J, Arola L and Ardèvol A. (2006). Procyanidin effects on adipocyte-related pathologies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46: 543-550

16. Bagchi D, Sen C., Ray SD, Das OK, Bagchi M, Preuss HG and Vinson JA (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res.*, 523-524:87-97.

17. Puiggròs F, Llopiz N, Ardèvol A, Bladé C, Arola, L and Salvadó MJ (2005). Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 6080-6086

18. Llopiz N, Puiggròs F, Céspedes E, Arola L, Ardèvol A, Blade C and Salvadó MJ (2004). Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *J Agric Food Chem.*, 52: 1083-1087.

19. Li WG, Zhang X., Wu YJ and Tian X (2000). Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin.*, 22: 1117-1120.

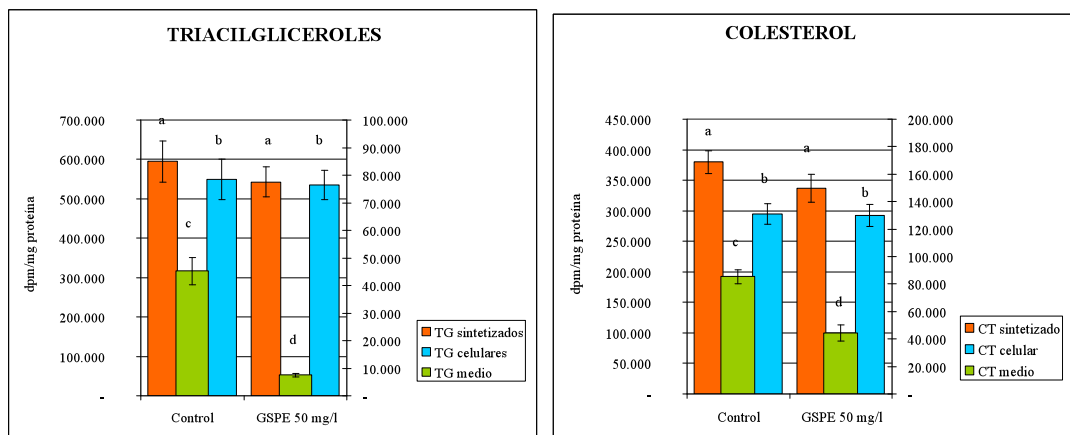
20. Agarwal C, Sharma Y, Zhao J and Agarwal R (2000). A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinases activation and inducing G1 arrest and differentiation. *Clin Cancer Res.*, 6: 2921-2930.

21. Del Bas JM, Fernández-Larrea J, Blay MT, Ardèvol A, Salvadó MJ, Arola L, Bladé C (2005). Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expresión in healthy rats. *FASEB Journal*, 19, doi: 10.1096/fj.04-3095fje, 479-481.

22. Altmann SW, Davis HR,Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N and Graziano MP (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303: 1201-1204.

23. Davies JP, Scott C, Oishi K, Liapis A and Ioannou YA (2005). Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 280: 1271012720.

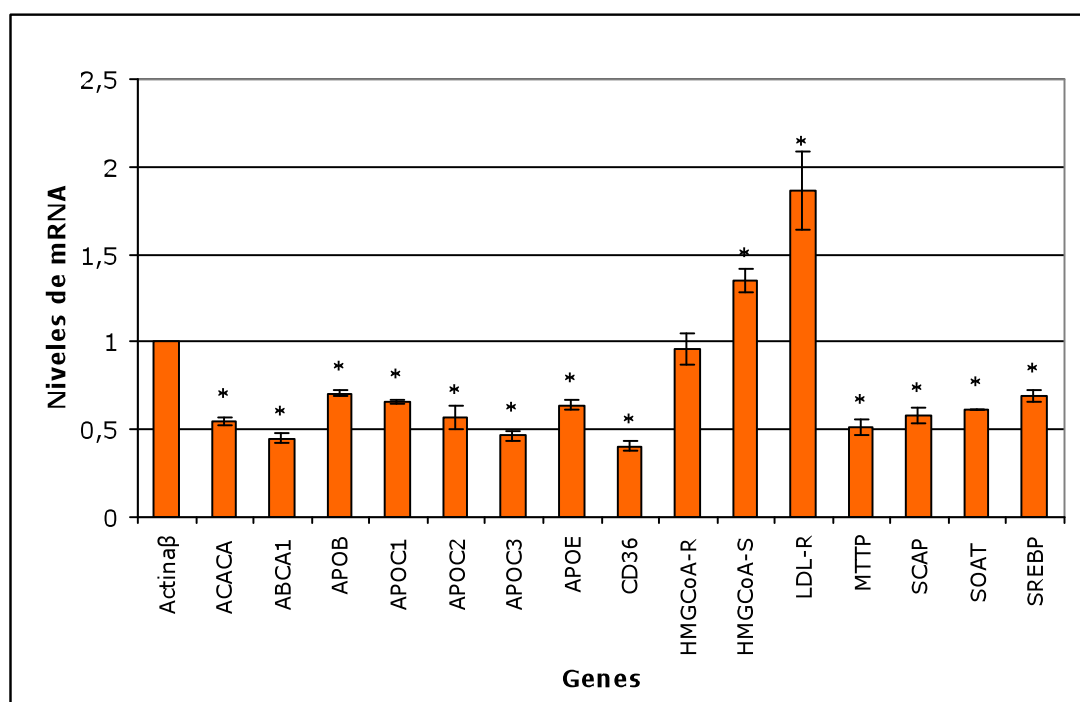
**FIGURA 1. SÍNTESIS *DE NOVO* Y SECRECIÓN DE TRIACILGLICEROS Y COLESTEROL**



Efecto del extracto de proantocianidinas de pepita de uva (GSPE) en la síntesis, contenido celular y secreción al medio de triacilgliceros y colesterol sintetizados *de novo* en cultivos *in vitro* de hepatocitos humanos de la línea celular HepG2. Las células se incubaron durante 6 horas con  $^{14}\text{C}$ -acetato sódico. Simultáneamente se trató el grupo GSPE con 50 mg/l de GSPE en 0,1% etanol (v/v) y el grupo control con 0,1% etanol (v/v).

Los lípidos se extrajeron con disolventes y se separaron por cromatografía en capa fina. Posteriormente, se cuantificó la radioactividad presente en las fracciones correspondientes a triacilgliceros y colesterol. En el eje de ordenadas se presenta la radioactividad en desintegraciones por minuto (dpm) respecto a la proteína celular. Las barras correspondientes a los triacilgliceros o al colesterol total secretados al medio se representan en el eje de ordenadas secundario (derecha). Los valores se expresan como media  $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se ha aplicado el test de la t de Student con una  $p < 0,05$ .

**FIGURA 2. EXPRESIÓN DE GENES BIOMARCADORES: METABOLISMO LIPÍDICO**

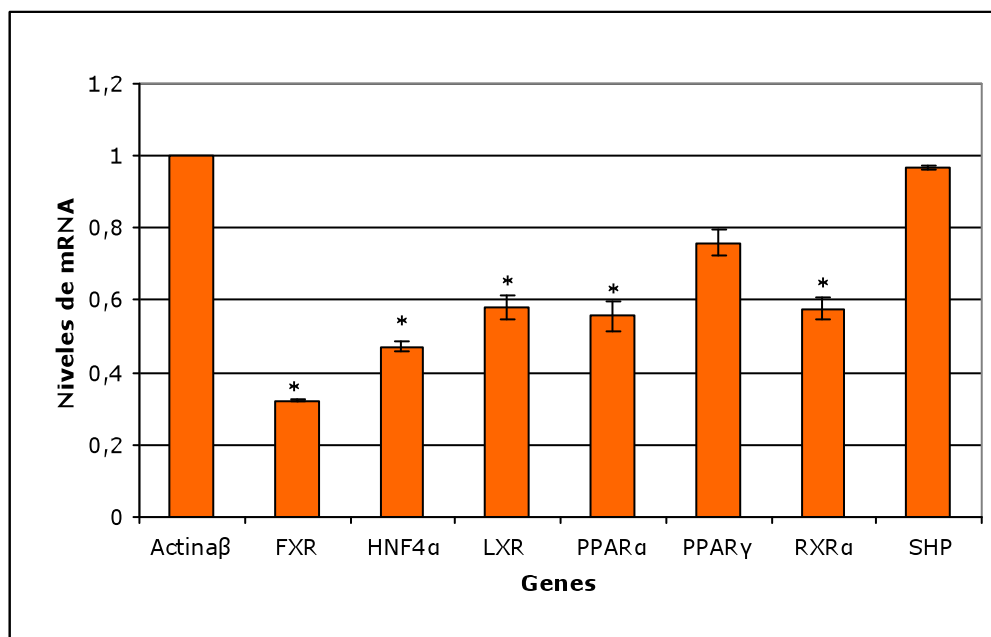


Efecto del extracto de proantociandinas de pepita de uva (GSPE) sobre los niveles de mRNA de los genes: Acetil-CoA carboxilasa (ACACA), *ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1* (ABCA1), apolipoproteína B (APOB), apolipoproteína C1 (APOC1), apolipoproteína C2 (APOC2), apolipoproteína C3 (APOC3), apolipoproteína E (APOE), receptor de trombospondina (CD36), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCoA-R), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintetasa 1 (HMGCoA-S), receptor de LDL (LDL-R), proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTTP), *SREBP cleavage activating protein* (SCAP), esteroil o-acil transferasa (SOAT) y *sterol regulatory element binding transcription factor 1* (SREBP).

Las células HepG2 fueron incubadas con una dosis de GSPE de 50 mg/l durante 9 horas. Tanto el grupo control como el tratado con GSPE contenían una concentración de etanol de 0,1% (v/v). La expresión de los genes se determina extrayendo el ARN celular, fabricando el cDNA y utilizando una tarjeta microfluidica Taqman® Low Density Array (TLDA) con la b-actina como gen de referencia.

Los valores se refieren a variación sobre el gen de referencia y se expresan como media  $\pm$  SEM. Para el análisis estadístico se ha aplicado el test de la t de Student con una  $p < 0.05$ .

**FIGURA 3. EXPRESIÓN DE GENES BIOMARCADORES: RECEPTORES NUCLEARES**



Efecto del extracto de proantocianidinas de pepita de uva (GSPE) sobre los niveles de mRNA de los genes: *farnesoid X receptor* (FXR), *hepatic nuclear factor 4 alpha* (HNF4 $\alpha$ ), *liver X receptor* (LXR), *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR $\alpha$ ), *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ), *retinoid X receptor, alpha* (RXR $\alpha$ ), *small heterodimer partner* (SHP)

Las células HepG2 fueron incubadas con una dosis de GSPE de 50 mg/l durante 9 horas. Tanto el grupo control como el tratado con GSPE contenían una concentración de etanol de 0,1% (v/v). La expresión de los genes se determina extrayendo el ARN celular, fabricando el cDNA y utilizando una tarjeta microfluidica Taqman® Low Density Array (TLDA) con la b-actina como gen de referencia.

Los valores se refieren a variación sobre el gen de referencia y se expresan como media  $\pm$  SEM. Para el análisis estadístico se ha aplicado el test de la t de Student con una  $p < 0.05$ .

**TABLA 1. EXPRESIÓN DEL GEN DE LA NIEMAN-PICK C1 LIKE 1**

0 mg/l GSPE		50 mg/l GSPE		150 mg/l GSPE	
1 hora	9 horas	1 hora	9 horas	1 hora	9 horas
0,99 <sup>a</sup> ± 0,08	0,99 <sup>a</sup> ± 0,03	0,87 <sup>a</sup> ± 0,07	0,64 <sup>b</sup> ± 0,11	0,87 <sup>a</sup> ± 0,08	0,63 <sup>b</sup> ± 0,02

Efecto del extracto de proantocianidinas de pepita de uva (GSPE) sobre los niveles de mRNA de *Nieman-Pick C1 like1* (NPC1L1) en células HepG2.

Las células HepG2 fueron incubadas con una dosis de GSPE de 50 mg/l durante 9 horas. Tanto el grupo control como el tratado con GSPE contenían una concentración de etanol de 0,1% (v/v). La expresión de los genes se determina extrayendo el ARN celular, fabricando el cDNA y realizando una PCR cuantitativa a tiempo real a partir de 20 ng de cDNA utilizando sondas Taqman® y b-actina como gen de referencia.

Los valores se refieren a variación sobre el gen de referencia y se expresan como media ± SEM. Para el análisis estadístico se ha aplicado una ANOVA de un factor con una  $p < 0.05$ , utilizando el test de Scheffé para discriminación a posteriori.

## 8. ANNEX 3

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

### 8.1. Llegenda obtinguda amb el programa MetaCore

Enzymes	G protein Adaptor/regulators	Generic classes	Localization	Mechanisms
<p><b>Generic Enzyme</b></p> <p><b>Kinase</b></p> <p>Generic kinase</p> <p>Protein kinase</p> <p>Lipid kinase</p> <p><b>Phosphatase</b></p> <p>Generic phosphatase</p> <p>Protein phosphatase</p> <p>Lipid phosphatase</p> <p><b>Phospholipase</b></p> <p>Generic phospholipase</p> <p><b>Protease</b></p> <p>Generic protease</p> <p>Metalloprotease</p> <p><b>GTPase</b></p> <p>G-alpha</p> <p>RAS - superfamily</p>	<p>G beta/gamma</p> <p>Regulators (GDI, GAP, GEF etc.)</p> <p><b>Channels/Transporters</b></p> <p>Generic channel</p> <p>Ligand-gated ion channel</p> <p>Voltage-gated ion channel</p> <p>Transporter</p> <p><b>Blocks</b></p> <p>Normal process</p> <p>Pathological process</p> <p><b>Link legend</b></p> <p>Positive effect</p> <p>Negative effect</p> <p>Unspecified effect</p> <p>Technical link</p> <p>Disrupts in disease</p> <p>Weakens in disease</p> <p>Emerges in disease</p> <p>Enhances in disease</p> <p>Organism specific interaction</p>	<p>Protein</p> <p>Generic binding protein</p> <p>Receptor ligand</p> <p>Cell membrane glycoprotein</p> <p>Transcription factor</p> <p>DNA</p> <p>RNA</p> <p>Compound</p> <p>Inorganic ion</p> <p>Predicted metabolite or user's structure</p> <p>Reaction</p> <p><b>Receptors</b></p> <p>Generic receptor</p> <p>GPCR</p> <p>Receptors with enzyme activity</p>	<p>Mitochondria</p> <p>EPR</p> <p>Golgi</p> <p>Nucleus</p> <p>Lysosome</p> <p>Peroxisome</p> <p>Cytoplasm</p> <p>Extracellular</p> <p><b>Comments</b></p> <p>Note</p> <p>Normal process</p> <p>Pathological process</p> <p>A complex or a group</p> <p>Organism specific object</p>	<p><b>Physical interactions</b></p> <p><b>B</b> Binding</p> <p><b>C</b> Cleavage</p> <p><b>CM</b> Covalent modifications</p> <p><b>+P</b> Phosphorylation</p> <p><b>-P</b> Dephosphorylation</p> <p><b>T</b> Transformation</p> <p><b>Tn</b> Transport</p> <p><b>Z</b> Catalysis</p> <p><b>TR</b> Transcription regulation</p> <p><b>M</b> MicroRNA binding</p> <p><b>Functional interactions</b></p> <p><b>Cn</b> Competition</p> <p><b>IE</b> Influence on expression</p> <p><b>?</b> Unspecified interactions</p> <p><b>PE</b> Pharmacological effect</p> <p><b>TE</b> Toxic effect</p> <p><b>Logical relations</b></p> <p><b>GR</b> Group relation</p> <p><b>CS</b> Complex subunit</p> <p><b>SR</b> Similarity relation</p> <p>Path start</p>



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

## 9. BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011

1. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 26:1001-1043.
2. Ross JA, Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34.
3. Stevenson DE, Hurst RD. 2007. Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci* 64:2900-2916.
4. Hummer W, Schreier P. 2008. Analysis of proanthocyanidins. *Mol Nutr Food Res* 52:1381-1398.
5. Aherne SA, O'Brien NM. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18:75-81.
6. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 43:348-361.
7. Harborne JB. 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 213:15-24.
8. Aron PM, Kennedy JA. 2008. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res* 52:79-104.
9. Serrano J, Puupponen-Pimia R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. 2009. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res* 53 Suppl 2:S310-29.
10. Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L. 2005. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res* 49:159-174.
11. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230S-242S.
12. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:287-306.
13. Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C, Remesy C. 2001. Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol* 335:319-333.
14. Chang HC, Doerge DR. 2000. Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect. *Toxicol Appl Pharmacol* 168:244-252.
15. Coldham NG, Sauer MJ. 2000. Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol* 164:206-215.
16. Crespy V, Morand C, Besson C, Cotellet N, Vezin H, Demigne C, Remesy C. 2003. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G980-8.
17. da Silva Porto PA, Laranjinha JA, de Freitas VA. 2003. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochem Pharmacol* 66:947-954.

18. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 95:179-189.
19. Liu Z, Ma LP, Zhou B, Yang L, Liu ZL. 2000. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 106:53-63.
20. Lotito SB, Fraga CG. 1998. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radic Biol Med* 24:435-441.
21. Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilibert I. 1998. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radic Biol Med* 25:1057-1065.
22. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* 45:13-19.
23. Zern TL, Fernandez ML. 2005. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr* 135:2291-2294.
24. Mensink RP, Aro A, Den Hond E, German JB, Griffin BA, ten Meer HU, Mutanen M, Pannemans D, Stahl W. 2003. PASSCLAIM - Diet-related cardiovascular disease. *Eur J Nutr* 42 Suppl 1:l6-27.
25. Ordovas JM, Corella D. 2004. Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:71-118.
26. Williams K, Sniderman AD, Sattar N, D'Agostino R,Jr, Wagenknecht LE, Haffner SM. 2003. Comparison of the associations of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol with other cardiovascular risk factors in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 108:2312-2316.
27. Ordovas JM. 2006. Nutrigenetics, plasma lipids, and cardiovascular risk. *J Am Diet Assoc* 106:1074-81; quiz 1083.
28. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL,Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT,Jr, Roccella EJ, National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. 2003. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289:2560-2572.
29. Alexander RW. 1995. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25:155-161.
30. Saint-Remy A, Krzesinski JM. 2005. Optimal blood pressure level and best measurement procedure in hemodialysis patients. *Vasc Health Risk Manag* 1:235-244.
31. Kunsch C, Medford RM. 1999. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85:753-766.
32. Glass CK, Witztum JL. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503-516.

33. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 337:408-416.
34. Caballero AE. 2003. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res* 11:1278-1289.
35. Weber MA. 1996. Role of hypertension in coronary artery disease. *Am J Nephrol* 16:210-216.
36. Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB, Ferri C. 2008. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J Nutr* 138:1671-1676.
37. Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M. 2009. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 77:1053-1063.
38. Li XL, Li BY, Gao HQ, Cheng M, Xu L, Li XH, Ma YB. 2009. Effects of grape seed proanthocyanidin extracts on aortic pulse wave velocity in streptozocin induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:1348-1354.
39. Zhang TX, Niu CQ, Hu JM, Liu H, Jing HE. 2008. Vasorelaxational effects of procyanidins on rabbit aorta in vitro and decreasing arterial blood pressure in vivo. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 33:1720-1723.
40. Tanaka A. 2004. Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 11:322-329.
41. Reilly MP, Rader DJ. 2003. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation* 108:1546-1551.
42. Isomaa B. 2003. A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 73:2395-2411.
43. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. 2007. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ* 176:1113-1120.
44. Link JJ, Rohatgi A, de Lemos JA. 2007. HDL cholesterol: physiology, pathophysiology, and management. *Curr Probl Cardiol* 32:268-314.
45. Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-1695.
46. Ross R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
47. Auger C, Rouanet JM, Vanderlinde R, Bornet A, Decorde K, Lequeux N, Cristol JP, Teissedre PL. 2005. Polyphenols-enriched Chardonnay white wine and sparkling Pinot Noir red wine identically prevent early atherosclerosis in hamsters. *J Agric Food Chem* 53:9823-9829.
48. Tebib K, Besancon P, Rouanet JM. 1994. Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J Nutr* 124:2451-2457.

49. Blade C, Arola L, Salvado MJ. 2010. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 54:37-59.
50. Quesada H, del Bas JM, Pajuelo D, Diaz S, Fernandez-Larrea J, Pinent M, Arola L, Salvado MJ, Blade C. 2009. Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *Int J Obes (Lond)* 33:1007-1012.
51. Del Bas JM, Ricketts ML, Vaque M, Sala E, Quesada H, Ardevol A, Salvado MJ, Blay M, Arola L, Moore DD, Pujadas G, Fernandez-Larrea J, Blade C. 2009. Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol Nutr Food Res* 53:805-814.
52. Del Bas JM, Fernandez-Larrea J, Blay M, Ardevol A, Salvado MJ, Arola L, Blade C. 2005. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J* 19:479-481.
53. Del Bas JM, Ricketts ML, Baiges I, Quesada H, Ardevol A, Salvado MJ, Pujadas G, Blay M, Arola L, Blade C, Moore DD, Fernandez-Larrea J. 2008. Dietary procyanidins lower triglyceride levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. *Mol Nutr Food Res* 52:1172-1181.
54. Ichinose K, Kawasaki E, Eguchi K. 2007. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 27:554-564.
55. Bloomgarden ZT. 2008. Approaches to treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31:1697-1703.
56. Leahy JL. 2005. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36:197-209.
57. Riccardi G, Aggett P, Brighenti F, Delzenne N, Frayn K, Nieuwenhuizen A, Pannemans D, Theis S, Tuijtelars S, Vessby B. 2004. PASSCLAIM--body weight regulation, insulin sensitivity and diabetes risk. *Eur J Nutr* 43 Suppl 2:II7-II46.
58. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36:838-849.
59. Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC, Cheng JT. 2003. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod* 66:788-792.
60. Lee JS. 2006. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 79:1578-1584.
61. Liu IM, Tzeng TF, Liou SS, Lan TW. 2007. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. *Life Sci* 81:1479-1488.
62. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. 2008. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* 138:1677-1683.
63. Sharma B, Balomajumder C, Roy P. 2008. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 46:2376-2383.

64. Cao H, Hininger-Favier I, Kelly MA, Benaraba R, Dawson HD, Coves S, Roussel AM, Anderson RA. 2007. Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet. *J Agric Food Chem* 55:6372-6378.
65. Pinent M, Blay M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Ardevol A. 2004. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* 145:4985-4990.
66. Lee YA, Cho EJ, Yokozawa T. 2008. Effects of proanthocyanidin preparations on hyperlipidemia and other biomarkers in mouse model of type 2 diabetes. *J Agric Food Chem* 56:7781-7789.
67. Al-Awwadi NA, Araiz C, Bornet A, Delbosc S, Cristol JP, Linck N, Azay J, Teissedre PL, Cros G. 2005. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *J Agric Food Chem* 53:151-157.
68. Zhang HJ, Ji BP, Chen G, Zhou F, Luo YC, Yu HQ, Gao FY, Zhang ZP, Li HY. 2009. A combination of grape seed-derived procyanidins and gypenosides alleviates insulin resistance in mice and HepG2 cells. *J Food Sci* 74:H1-7.
69. Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-1119.
70. Puglisi MJ, Fernandez ML. 2008. Modulation of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and adiponectin by diet, exercise, and weight loss. *J Nutr* 138:2293-2296.
71. Guzik TJ, Mangalat D, Korbut R. 2006. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 57:505-528.
72. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. 2007. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56:1010-1013.
73. Guerre-Millo M. 2004. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 30:13-19.
74. Black S, Kushner I, Samols D. 2004. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 279:48487-48490.
75. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. 2000. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342:836-843.
76. Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A. 2002. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *Br J Pharmacol* 136:1058-1064.
77. Sukanuma M, Sueoka E, Sueoka N, Okabe S, Fujiki H. 2000. Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition of TNF-alpha expression. *Biofactors* 13:67-72.
78. Lee KM, Hwang MK, Lee DE, Lee KW, Lee HJ. 2010. Protective effect of quercetin against arsenite-induced COX-2 expression by targeting PI3K in rat liver epithelial cells. *J Agric Food Chem* 58:5815-5820.



79. Terra X, Valls J, Vitrac X, Merrillon JM, Arola L, Ardevol A, Blade C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvado J, Blay M. 2007. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *J Agric Food Chem* 55:4357-4365.
80. Puiggros F, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, Arola L, Salvado MJ. 2005. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *J Agric Food Chem* 53:6080-6086.
81. Keaney JF,Jr, Vita JA. 1995. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog Cardiovasc Dis* 38:129-154.
82. Roig R, Cascon E, Arola L, Blade C, Salvado MJ. 1999. Moderate red wine consumption protects the rat against oxidation in vivo. *Life Sci* 64:1517-1524.
83. Verstraeten SV, Hammerstone JF, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. 2005. Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa. *J Agric Food Chem* 53:5041-5048.
84. Llopiz N, Puiggros F, Cespedes E, Arola L, Ardevol A, Blade C, Salvado MJ. 2004. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *J Agric Food Chem* 52:1083-1087.
85. Puiggros F, Sala E, Vaque M, Ardevol A, Blay M, Fernandez-Larrea J, Arola L, Blade C, Pujadas G, Salvado MJ. 2009. In vivo, in vitro, and in silico studies of Cu/Zn-superoxide dismutase regulation by molecules in grape seed procyanidin extract. *J Agric Food Chem* 57:3934-3942.
86. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
87. Gossiau A, Chen KY. 2004. Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. *Nutrition* 20:95-102.
88. Fischer U, Schulze-Osthoff K. 2005. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 57:187-215.
89. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA. 1993. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:980-984.
90. Beere HM. 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* 115:2633-2639.
91. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. 2002. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* 62:4592-4598.
92. Zhuang H, Jiang W, Cheng W, Qian K, Dong W, Cao L, Huang Q, Li S, Dou F, Chiu JF, Fang XX, Lu M, Hua ZC. 2010. Down-regulation of HSP27 sensitizes TRAIL-resistant tumor cell to TRAIL-induced apoptosis. *Lung Cancer* 68:27-38.
93. Roy AM, Baliga MS, Elmets CA, Katiyar SK. 2005. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Neoplasia* 7:24-36.

94. Miura T, Chiba M, Kasai K, Nozaka H, Nakamura T, Shoji T, Kanda T, Ohtake Y, Sato T. 2008. Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis* 29:585-593.
95. Takayama S, Reed JC, Homma S. 2003. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 22:9041-9047.
96. Wang RE, Kao JL, Hilliard CA, Pandita RK, Roti Roti JL, Hunt CR, Taylor JS. 2009. Inhibition of heat shock induction of heat shock protein 70 and enhancement of heat shock protein 27 phosphorylation by quercetin derivatives. *J Med Chem* 52:1912-1921.
97. Tran PL, Kim SA, Choi HS, Yoon JH, Ahn SG. 2010. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 10:276.
98. Ordovas JM, Mooser V. 2004. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 15:101-108.
99. Kussmann M, Raymond F, Affolter M. 2006. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *J Biotechnol* 124:758-787.
100. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 19:1602-1616.
101. Tiret L. 2002. Gene-environment interaction: a central concept in multifactorial diseases. *Proc Nutr Soc* 61:457-463.
102. Kaput J. 2004. Diet-disease gene interactions. *Nutrition* 20:26-31.
103. Kaput J. 2005. Decoding the pyramid: a systems-biological approach to nutrigenomics. *Ann N Y Acad Sci* 1055:64-79.
104. Roche HM, Phillips C, Gibney MJ. 2005. The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. *Proc Nutr Soc* 64:371-377.
105. Kaput J, Rodriguez RL. 2004. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics* 16:166-177.
106. Trujillo E, Davis C, Milner J. 2006. Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. *J Am Diet Assoc* 106:403-413.
107. Daniel H. 2002. Genomics and proteomics: importance for the future of nutrition research. *Br J Nutr* 87 Suppl 2:S305-11.
108. DeBusk RM, Fogarty CP, Ordovas JM, Kornman KS. 2005. Nutritional genomics in practice: where do we begin? *J Am Diet Assoc* 105:589-598.
109. Gillies PJ. 2003. Nutrigenomics: the Rubicon of molecular nutrition. *J Am Diet Assoc* 103:S50-5.
110. Cortesy-Theulaz I, den Dunnen JT, Ferre P, Geurts JM, Muller M, van Belzen N, van Ommen B. 2005. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. *Ann Nutr Metab* 49:355-365.
111. Afman L, Muller M. 2006. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc* 106:569-576.

112. van Ommen B. 2004. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arenas. *Nutrition* 20:4-8.
113. Vasan RS. 2006. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 113:2335-2362.
114. Weber P. 2001. Role of biomarkers in nutritional science and industry - a comment. *Br J Nutr* 86 Suppl 1:S93-5.
115. Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. 2004. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Mol Microbiol* 53:1003-1009.
116. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
117. Kipp A, Banning A, van Schothorst EM, Meplan C, Schomburg L, Evelo C, Coort S, Gaj S, Keijer J, Hesketh J, Brigelius-Flohe R. 2009. Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon. *Mol Nutr Food Res* 53:1561-1572.
118. Smyth GK. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:Article3.
119. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.
120. Blanco E, Pignatelli M, Beltran S, Punset A, Perez-Lluch S, Serras F, Guigo R, Corominas M. 2008. Conserved chromosomal clustering of genes governed by chromatin regulators in *Drosophila*. *Genome Biol* 9:R134.
121. Tillett WS, Francis T. 1930. Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus. *J Exp Med* 52:561-571.
122. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
123. Brown MS, Goldstein JL. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331-340.
124. Elam MB, Wilcox HG, Cagen LM, Deng X, Raghow R, Kumar P, Heimberg M, Russell JC. 2001. Increased hepatic VLDL secretion, lipogenesis, and SREBP-1 expression in the corpulent JCR:LA-cp rat. *J Lipid Res* 42:2039-2048.
125. Wang SL, Du EZ, Martin TD, Davis RA. 1997. Coordinate regulation of lipogenesis, the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by sterol response element binding protein 1. *J Biol Chem* 272:19351-19358.
126. Horton JD, Shimano H, Hamilton RL, Brown MS, Goldstein JL. 1999. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmask hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. *J Clin Invest* 103:1067-1076.

127. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99:838-845.
128. Fleischmann M, Iynedjian PB. 2000. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J* 349:13-17.
129. Kim JB, Spiegelman BM. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10:1096-1107.
130. Matsukuma KE, Bennett MK, Huang J, Wang L, Gil G, Osborne TF. 2006. Coordinated control of bile acids and lipogenesis through FXR-dependent regulation of fatty acid synthase. *J Lipid Res* 47:2754-2761.
131. Sone H, Shimano H, Sakakura Y, Inoue N, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Osawa M, Suzuki H, Yokoo T, Takahashi A, Iida K, Toyoshima H, Iwama A, Yamada N. 2002. Acetyl-coenzyme A synthetase is a lipogenic enzyme controlled by SREBP-1 and energy status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E222-30.
132. Barnes PJ. 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94:557-572.
133. Chrousos GP, Kino T. 2005. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE* 2005:pe48.
134. Yudt MR, Cidlowski JA. 2002. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 16:1719-1726.
135. Xu M, Dittmar KD, Giannoukos G, Pratt WB, Simons SS, Jr. 1998. Binding of hsp90 to the glucocorticoid receptor requires a specific 7-amino acid sequence at the amino terminus of the hormone-binding domain. *J Biol Chem* 273:13918-13924.
136. Defranco DB. 2000. Role of molecular chaperones in subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors. *Kidney Int* 57:1241-1249.
137. Berg T, Didon L, Barton J, Andersson O, Nord M. 2005. Glucocorticoids increase C/EBPbeta activity in the lung epithelium via phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 334:638-645.
138. Sato Y, Nishio Y, Sekine O, Kodama K, Nagai Y, Nakamura T, Maegawa H, Kashiwagi A. 2007. Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein-beta and -delta and monocyte chemoattractant protein-1 genes in aortas from hyperinsulinaemic rats. *Diabetologia* 50:481-489.
139. Almawi WY, Melemedjian OK. 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* 71:9-15.
140. Nishizaki Y, Ishimoto Y, Hotta Y, Hosoda A, Yoshikawa H, Akamatsu M, Tamura H. 2009. Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on in vitro reporter gene assay. *Bioorg Med Chem Lett* 19:4706-4710.

141. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. 2000. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 275:25665-25671.
142. Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvado J, Arola L, Blay M. 2009. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 20:210-218.
143. Cho WC, Yip TT, Chung WS, Leung AW, Cheng CH, Yue KK. 2006. Differential expression of proteins in kidney, eye, aorta, and serum of diabetic and non-diabetic rats. *J Cell Biochem* 99:256-268.
144. Yamaguchi Y, Yamada K, Yoshikawa N, Nakamura K, Haginaka J, Kunitomo M. 2006. Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci* 79:2474-2479.
145. Sahu A, Lambris JD. 2001. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 180:35-48.
146. Mastellos D, Morikis D, Isaacs SN, Holland MC, Strey CW, Lambris JD. 2003. Complement: structure, functions, evolution, and viral molecular mimicry. *Immunol Res* 27:367-386.
147. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. 2004. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol* 25:368-373.
148. Chesne S, Villiers CL, Arlaud GJ, Lacroix MB, Colomb MG. 1982. Fluid-phase interaction of C1 inhibitor (C1 Inh) and the subcomponents C1r and C1s of the first component of complement, C1. *Biochem J* 201:61-70.
149. Lanfumey L, Hamon M. 2004. 5-HT1 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:1-10.
150. Turner JH, Garnovskaya MN, Coaxum SD, Vlasova TM, Yakutovich M, Lefler DM, Raymond JR. 2007. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and janus kinase 2 are required for activation of sodium-proton exchange by the Gi-coupled 5-hydroxytryptamine 1a receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 320:314-322.
151. Lange F, Brandt B, Tiedge M, Jonas L, Jeschke U, Pohland R, Walzel H. 2009. Galectin-1 induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway: evidence for a connection between death-receptor and mitochondrial pathways in human Jurkat T lymphocytes. *Histochem Cell Biol* 132:211-223.
152. Hsiung SC, Tamir H, Franke TF, Liu KP. 2005. Roles of extracellular signal-regulated kinase and Akt signaling in coordinating nuclear transcription factor-kappaB-dependent cell survival after serotonin 1A receptor activation. *J Neurochem* 95:1653-1666.
153. Abdouh M, Albert PR, Drobetsky E, Filep JG, Kouassi E. 2004. 5-HT1A-mediated promotion of mitogen-activated T and B cell survival and proliferation is associated with increased translocation of NF-kappaB to the nucleus. *Brain Behav Immun* 18:24-34.
154. Garnovskaya MN, van Biesen T, Hawe B, Casanas Ramos S, Lefkowitz RJ, Raymond JR. 1996. Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT1A

- receptor via a G protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *Biochemistry* 35:13716-13722.
155. Hsiung SC, Tin A, Tamir H, Franke TF, Liu KP. 2008. Inhibition of 5-HT1A receptor-dependent cell survival by cAMP/protein kinase A: role of protein phosphatase 2A and Bax. *J Neurosci Res* 86:2326-2338.
156. Fujita T, Matsushita M, Endo Y. 2004. The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 198:185-202.
157. Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. 2003. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 21:547-578.
158. Sorensen R, Thiel S, Jensenius JC. 2005. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol* 27:299-319.
159. Fujita T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2:346-353.
160. Matsushita M, Endo Y, Hamasaki N, Fujita T. 2001. Activation of the lectin complement pathway by ficolins. *Int Immunopharmacol* 1:359-363.
161. Pangburn MK, Rawal N. 2002. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Soc Trans* 30:1006-1010.
162. Peitsch MC, Tschopp J. 1991. Assembly of macromolecular pores by immune defense systems. *Curr Opin Cell Biol* 3:710-716.
163. Kim DD, Song WC. 2006. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 118:127-136.
164. Smith GP, Smith RA. 2001. Membrane-targeted complement inhibitors. *Mol Immunol* 38:249-255.
165. Tschopp J, French LE. 1994. Clusterin: modulation of complement function. *Clin Exp Immunol* 97 Suppl 2:11-14.
166. Cos P, Hermans N, Calomme M, Maes L, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. 2003. Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. *J Pharm Pharmacol* 55:1291-1297.
167. Lee SY, Min BS, Kim JH, Lee J, Kim TJ, Kim CS, Kim YH, Lee HK. 2005. Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *Phytother Res* 19:273-276.
168. Pieroni A, Heimler D, Pieters L, van Poel B, Vlietinck AJ. 1996. In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Pharmazie* 51:765-768.
169. Bayon Y, Hernandez M, Alonso A, Nunez L, Garcia-Sancho J, Leslie C, Sanchez Crespo M, Nieto ML. 1997. Cytosolic phospholipase A2 is coupled to muscarinic receptors in the human astrocytoma cell line 1321N1: characterization of the transducing mechanism. *Biochem J* 323 ( Pt 1):281-287.
170. Chung HC, Fleming N. 1995. Muscarinic regulation of phospholipase D and its role in arachidonic acid release in rat submandibular acinar cells. *Pflugers Arch* 431:161-168.

171. Zhou H, Das S, Murthy KS. 2003. Erk1/2- and p38 MAP kinase-dependent phosphorylation and activation of cPLA2 by m3 and m2 receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G472-80.
172. Mitchell R, McCulloch D, Lutz E, Johnson M, MacKenzie C, Fennell M, Fink G, Zhou W, Sealfon SC. 1998. Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* 392:411-414.
173. Mitchell R, Robertson DN, Holland PJ, Collins D, Lutz EM, Johnson MS. 2003. ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by the M3 muscarinic receptor. *J Biol Chem* 278:33818-33830.
174. Emmerling MR, Dudley DT, Dyer RD, Carroll RT, Doyle PD, Davis RE. 1996. The role of arachidonic acid in the secretion of the amyloid precursor protein (APP). *Ann N Y Acad Sci* 777:310-315.
175. Wang JF, Lu R, Wang YZ. 2010. Regulation of beta cleavage of amyloid precursor protein. *Neurosci Bull* 26:417-427.
176. Slingerland J, Pagano M. 2000. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183:10-17.
177. Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. 2000. Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 183:18-27.
178. Matsuda Y. 2008. Molecular mechanism underlying the functional loss of cyclindependent kinase inhibitors p16 and p27 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 14:1734-1740.
179. Shibata K, Katsuma S, Koshimizu T, Shinoura H, Hirasawa A, Tanoue A, Tsujimoto G. 2003. alpha 1-Adrenergic receptor subtypes differentially control the cell cycle of transfected CHO cells through a cAMP-dependent mechanism involving p27Kip1. *J Biol Chem* 278:672-678.
180. Shinoura H, Shibata K, Hirasawa A, Tanoue A, Hashimoto K, Tsujimoto G. 2002. Key amino acids for differential coupling of alpha1-adrenergic receptor subtypes to Gs. *Biochem Biophys Res Commun* 299:142-147.
181. Kuiperij HB, van der Horst A, Raaijmakers J, Weijzen S, Medema RH, Bos JL, Burgering BM, Zwartkruis FJ. 2005. Activation of FoxO transcription factors contributes to the antiproliferative effect of cAMP. *Oncogene* 24:2087-2095.
182. New DC, Wong YH. 2007. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal* 2:2.
183. van der Heide LP, Smidt MP. 2005. Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *Trends Biochem Sci* 30:81-86.
184. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73:39-85.
185. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341-347.

186. Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. 2002. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* 10:283-294.
187. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. 2005. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate blocks PDGF-induced proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 11:3368-3374.
188. Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. 2000. Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun* 275:328-334.
189. Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM, Castellon EA. 2007. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *J Androl* 28:282-293.
190. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. 1997. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 73:265-280.
191. Panayiotidis MI, Stabler SP, Ahmad A, Pappa A, Legros LH, Jr, Hernandez-Saavedra D, Schneider BK, Allen RH, Vasiliou V, McCord JM, Kotb M, White CW. 2006. Activation of a novel isoform of methionine adenosyl transferase 2A and increased S-adenosylmethionine turnover in lung epithelial cells exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 40:348-358.
192. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. 1999. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274:33002-33010.
193. Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, Sasaki H, Tajima S. 2001. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 29:3506-3512.
194. Ueland PM, Helland S. 1980. S-adenosylhomocysteinase from mouse liver. Catalytic properties at cellular enzyme level. *J Biol Chem* 255:7722-7727.
195. Fumic K, Beluzic R, Cuk M, Pavkov T, Kloor D, Baric I, Mijic I, Vugrek O. 2007. Functional analysis of human S-adenosylhomocysteine hydrolase isoforms SAHH-2 and SAHH-3. *Eur J Hum Genet* 15:347-351.
196. Kraus JP. 1987. Cystathionine beta-synthase (human). *Methods Enzymol* 143:388-394.
197. Steegborn C, Clausen T, Sondermann P, Jacob U, Worbs M, Marinkovic S, Huber R, Wahl MC. 1999. Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine gamma-lyase. Toward the rational control of transsulfuration. *J Biol Chem* 274:12675-12684.
198. Deniziak MA, Barciszewski J. 2001. Methionyl-tRNA synthetase. *Acta Biochim Pol* 48:337-350.
199. Paneda C, Gorospe I, Herrera B, Nakamura T, Fabregat I, Varela-Nieto I. 2002. Liver cell proliferation requires methionine adenosyltransferase 2A mRNA up-regulation. *Hepatology* 35:1381-1391.
200. Lu SC, Mato JM. 2005. Role of methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in alcohol-associated liver cancer. *Alcohol* 35:227-234.



201. Yang H, Magilnick N, Nouredin M, Mato JM, Lu SC. 2007. Effect of hepatocyte growth factor on methionine adenosyltransferase genes and growth is cell density-dependent in HepG2 cells. *J Cell Physiol* 210:766-773.
202. Carroll J, Shannon RJ, Fearnley IM, Walker JE, Hirst J. 2002. Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification of two new subunits. *J Biol Chem* 277:50311-50317.
203. Berger I, Hershkovitz E, Shaag A, Edvardson S, Saada A, Elpeleg O. 2008. Mitochondrial complex I deficiency caused by a deleterious NDUFA11 mutation. *Ann Neurol* 63:405-408.
204. Konishi K, Adachi H, Ishigaki N, Kanamura Y, Adachi I, Tanaka T, Nishioka I, Nonaka G, Horikoshi I. 1993. Inhibitory effects of tannins on NADH dehydrogenases of various organisms. *Biol Pharm Bull* 16:716-718.
205. Alvira D, Yeste-Velasco M, Folch J, Verdaguer E, Canudas AM, Pallas M, Camins A. 2007. Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: inhibition of complex I and potassium deprivation in cerebellar neurons. *Neuroscience* 147:746-756.
206. Reue K. 2009. The lipin family: mutations and metabolism. *Curr Opin Lipidol* 20:165-170.
207. Manmontri B, Sariahmetoglu M, Donkor J, Bou Khalil M, Sundaram M, Yao Z, Reue K, Lehner R, Brindley DN. 2008. Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatic lipin-1 expression, and insulin acts antagonistically. *J Lipid Res* 49:1056-1067.
208. Cha JY, Cho YS, Kim I, Anno T, Rahman SM, Yanagita T. 2001. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr* 56:349-358.
209. Beale EG, Forest C, Hammer RE. 2003. Regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in adipocytes. *Biochimie* 85:1207-1211.
210. Millward CA, Desantis D, Hsieh CW, Heaney JD, Pisano S, Olswang Y, Reshef L, Beidelschies M, Puchowicz M, Croniger CM. 2010. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1) helps regulate the triglyceride/fatty acid cycle and development of insulin resistance in mice. *J Lipid Res* 51:1452-1463.
211. Sakurai N, Mochizuki K, Kameji H, Shimada M, Goda T. 2009. (-)-Epigallocatechin gallate enhances the expression of genes related to insulin sensitivity and adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes at an early stage of differentiation. *Nutrition* 25:1047-1056.
212. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 4 Suppl 3:S233-42.
213. Hirano T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16:249-284.
214. Li P, Wood K, Mamon H, Haser W, Roberts T. 1991. Raf-1: a kinase currently without a cause but not lacking in effects. *Cell* 64:479-482.
215. Alavi A, Hood JD, Frausto R, Stupack DG, Cheresch DA. 2003. Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Science* 301:94-96.

216. Ashok BT, Kim E, Mittelman A, Tiwari RK. 2001. Proteasome inhibitors differentially affect heat shock protein response in cancer cells. *Int J Mol Med* 8:385-390.
217. Kersten S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2:282-286.
218. Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, Michael LF, Burris TP. 2005. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* 146:984-991.
219. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
220. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. 2000. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 21:1574-1583.
221. Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD, Chen YG. 2007. MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 109:987-994.
222. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. 2004. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 42:121-131.
223. Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 ( Pt 1):1-16.
224. Stennicke HR, Salvesen GS. 1998. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387:17-31.
225. Porter AG, Janicke RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:99-104.
226. Xiao Q, Danton MJ, Witte DP, Kowala MC, Valentine MT, Degen JL. 1998. Fibrinogen deficiency is compatible with the development of atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 101:1184-1194.
227. Martinesi M, Bruni S, Stio M, Treves C. 2006. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule expression in endothelial cells. *Cell Biol Int* 30:365-375.
228. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. 2001. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:1336-1342.
229. Xiao CW, Wood C, Gilani GS. 2006. Nuclear receptors: potential biomarkers for assessing physiological functions of soy proteins and phytoestrogens. *J AOAC Int* 89:1207-1214.
230. Kalaany NY, Mangelsdorf DJ. 2006. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol* 68:159-191.
231. Guo GL, Santamarina-Fojo S, Akiyama TE, Amar MJ, Paigen BJ, Brewer B, Jr, Gonzalez FJ. 2006. Effects of FXR in foam-cell formation and atherosclerosis development. *Biochim Biophys Acta* 1761:1401-1409.

232. Hansen AS, Marckmann P, Dragsted LO, Finne Nielsen IL, Nielsen SE, Gronbaek M. 2005. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 59:449-455.
233. Hsu CP, Lin YH, Chou CC, Zhou SP, Hsu YC, Liu CL, Ku FM, Chung YC. 2009. Mechanisms of grape seed procyanidin-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells. *Anticancer Res* 29:283-289.
234. Chen CC, Chow MP, Huang WC, Lin YC, Chang YJ. 2004. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol Pharmacol* 66:683-693.
235. Waetzig V, Herdegen T. 2005. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26:455-461.
236. Gulubova MV. 2005. Expression of cell adhesion molecules and their beta1 and beta2 integrin ligands in human liver peliosis. *Pathol Res Pract* 201:503-511.
237. Helewski KJ, Kowalczyk-Ziomek GI, Konecki J. 2007. Neutrophils' contribution to ischaemia and reperfusion injury in liver. *Wiad Lek* 60:47-52.
238. Jaeschke H. 2006. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G1083-8.
239. Jaeschke H, Smith CW. 1997. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 61:647-653.
240. Quyyumi AA. 1998. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 105:32S-39S.
241. Schiffrin EL. 2001. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* 14:83S-89S.
242. Abou-Agag LH, Aikens ML, Tabengwa EM, Benza RL, Shows SR, Grenett HE, Booyse FM. 2001. Polyphenolics increase t-PA and u-PA gene transcription in cultured human endothelial cells. *Alcohol Clin Exp Res* 25:155-162.
243. Frangogiannis NG, Entman ML. 2005. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med* 15:163-169.
244. Dell'Agli M, Fagnani R, Mitro N, Scurati S, Masciadri M, Mussoni L, Galli GV, Bosisio E, Crestani M, De Fabiani E, Tremoli E, Caruso D. 2006. Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J Agric Food Chem* 54:3259-3264.
245. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 81:15-27.
246. Barnes S. 2008. Nutritional genomics, polyphenols, diets, and their impact on dietetics. *J Am Diet Assoc* 108:1888-1895.
247. Leifeld L, Nattermann J, Fielenbach M, Schmitz V, Sauerbruch T, Spengler U. 2006. Intrahepatic activation of caspases in human fulminant hepatic failure. *Liver Int* 26:872-879.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
GENS DIANA DE LES PROANTOCIANIDINES  
Sabina Diaz Martinez  
ISBN:978-84-694-0330-3/DL:T-209-2011