

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 868 449**

21 Número de solicitud: 202030325

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.10.2021

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (95.0%)
Paseo de las Delicias S/N Pabellón de Brasil
41013 Sevilla (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (5.0%)

72 Inventor/es:

DE MIGUEL RODRÍGUEZ, Manuel;
ORTIZ CERDA, Tamara;
ILLANES MORENO, Matilde;
GARCÍA MONTES, Josefa M^a;
ARGÜELLES ARIAS, Federico;
ALCUDIA CRUZ, Ana;
MOTILVA SÁNCHEZ, Virginia;
TALERO BARRIENTOS, Elena y
ZADERENKO PARTIDA, Ana Paula

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Uso terapéutico de un extracto de maqui en la enfermedad de Crohn**

57 Resumen:

Uso terapéutico de un extracto de maqui en la enfermedad de Crohn.

La presente invención se refiere al uso de un extracto polifenólico obtenido del fruto de *Aristotelia chilensis*, así como el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden dicho extracto, en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Crohn.



Fig. 1

ES 2 868 449 A1

DESCRIPCIÓN

Uso terapéutico de un extracto de maqui en la enfermedad de Crohn

5 La presente invención se refiere al uso de un extracto polifenólico obtenido del fruto de *Aristotelia chilensis*, así como el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden dicho extracto, en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Por lo tanto, la invención pertenece al campo de la medicina o farmacia, más concretamente al campo técnico del uso de extractos vegetales terapéuticos para el tratamiento o
10 prevención de la enfermedad de Crohn.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El epitelio intestinal forma parte de una de las mayores superficies que separa nuestro
15 medio interno del exterior, participa en la digestión y absorción de nutrientes y es un componente clave en la barrera intestinal, impidiendo el paso al medio interno de un amplio espectro de microorganismos y sustancias potencialmente cancerígenas presentes en la luz del intestino. Una desregulación de la homeostasis epitelial (por ejemplo, un desequilibrio entre producción, diferenciación y eliminación celular)
20 compromete la integridad de la barrera intestinal y si no se restablece provocará patologías intestinales como la inflamación y el cáncer (*Viggiano d., et al., 2015, Eur. Rev. Med Pharmacol Sci 19, 1077–1085*).

La enfermedad inflamatoria del intestino (EII) es un trastorno inflamatorio crónico del
25 tracto intestinal padecido por millones de pacientes en todo el mundo y se compone de dos tipos de enfermedades principales: colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC). Aunque los fenotipos patológicos-clínicos son similares, es posible distinguir ambas entidades por su diferencia en la localización de la inflamación en el tracto gastrointestinal, patrones inmunológicos e histológicos. Mientras que la enfermedad de
30 Crohn se caracteriza por una inflamación transmural discontinua que puede afectar a cualquier tramo del tracto digestivo, la colitis ulcerosa se distingue por una inflamación difusa de la mucosa, que se extiende proximalmente desde el recto con diferente grado de extensión (*Satsangi J., et al., 2006, Gut. 55(6):749-53*).

35 El origen exacto de la enfermedad de Crohn es desconocido, pero se han reconocido factores inmunológicos, microbiológicos, ambientales y genéticos que aumentan el

riesgo de padecerla, entre ellos, la desregulación de la microbiota está cobrando cada vez mayor importancia. Dichos factores desencadenan una respuesta inmunológica exagerada que, tras la liberación de una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias (interferón- γ , factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquinas causan la inflamación intestinal (Jose Leon A., et al, 2006, *Med Clin (barc)*, 127(4):145-52)). Esta inflamación genera un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando estrés oxidativo (EO) y dañando los tejidos. En la enfermedad de Crohn, el estrés oxidativo y la inflamación juegan un importante papel en la patogénesis y la perpetuación del daño en la mucosa. El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante de las células. Un aumento excesivo de ROS (incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos) puede provocar daños en las membranas celulares, las proteínas y el ADN. Los antioxidantes son sustancias que se liberan en el lugar de la inflamación y proporcionan protección contra los ROS. Esta alteración del estado redox podría ser un factor etiológico o disparador de EII (*Achitei D., et al, 2013, Dig Dis Sci*, 58(5):1244-9).

Hasta el momento la EC no es curable, por tanto, lo que se pretende es mantenerla en estado de remisión completa de forma permanente, siendo esta la única forma de modificar la evolución de la enfermedad. Actualmente, los tratamientos para la EC van dirigidos a mecanismos inmunológicos e inflamatorios implicados en el desarrollo de la enfermedad. Algunos fármacos o tratamientos comunes en el estado de la técnica son los corticoides, los inmunomoduladores, y en algunos casos en fase de enfermedad avanzada la cirugía.

En el documento *Hendrik M. et al., 1995 (Gastroenterology, Volume 109, Issue 1, 129 – 135)* se describe el uso de un anticuerpo anti-TNF monoclonal para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, en particular un anticuerpo anti-TNF monoclonal quimérico humano/ratón cA2.

En el documento *Daniel H., et al., 1999, N Engl J Med; 340:1398-1405*, se describe infliximab, otro anticuerpo monoclonal del factor de TNF α , para el tratamiento de las fistulas producidas en pacientes con la enfermedad de Crohn.

También los corticosteroides, como la prednisona, se utilizan para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, sin embargo, pueden ser sustancialmente tóxicos y algunos no

son efectivos en el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

También existen otras alternativas farmacológicas como los antiinflamatorios. Por ejemplo, en el documento *Brian G., et al., 1995 N Engl J Med; 332:292-297* se describe el uso del metotrexato, un antiinflamatorio, para mejorar los síntomas en pacientes con la enfermedad de Crohn.

Todos estos tratamientos o fármacos son caros, producen efectos adversos o secundarios como alergias, infecciones o agravamiento de complicaciones gastrointestinales, y en un alto porcentaje de pacientes no son efectivos o pierden respuesta, dificultando a los médicos la elección de la terapia efectiva para cada paciente que sufre enfermedad de Crohn.

Recientemente, se han propuesto extractos de frutas para combatir enfermedades inflamatorias intestinales por su actividad antiinflamatoria. Por ejemplo, en el documento *Tanideh N., et al., 2014, World Applied Sciences Journal 31 (3): 281-288*, se describe el efecto de un extracto de fresa en el tratamiento de la colitis ulcerosa en ratas. En el documento *Pervi M., et al., 2016, The Journal of Nutritional Biochemistry Volume 28, Pages 103-113* se describe el efecto preventivo y terapéutico de un extracto antioxidante y antiinflamatorio de arándanos en el tratamiento de la colitis ulcerosa. Sin embargo, estos y otros extractos de frutas con efecto antiinflamatorio, no han sido aplicados para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

Por tanto, se hace necesario el desarrollo de fármacos o tratamiento alternativos a los ya existentes en el estado de la técnica, antiinflamatorios, no tóxicos y efectivos, que mejoren o eliminen los síntomas en los pacientes con la enfermedad de Crohn.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han observado que el extracto polifenólico de *A. chilensis* o maqui, tiene un alto poder antioxidante y antiinflamatorio y revierte los síntomas y cambios tisulares asociados a la enfermedad de Crohn, reduciendo drásticamente los parámetros de inflamación y daño tisular, además de restaurar el tamaño y peso del intestino, sin tener efectos adversos.

La obtención de dicho extracto polifenólico de maqui se llevó a cabo mediante un proceso de extracción con metanol ácido seguido de varias etapas de filtración y una posterior liofilización para su conservación. Posteriormente, se realizaron ensayos *in vitro* mediante cultivos celulares de la línea de cáncer de colon HT-29 y de la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7, observando el efecto antioxidante y antiinflamatorio del extracto polifenólico de maqui en dichas líneas celulares, que se describe a lo largo del punto 2 del apartado de resultados relativo a “Ensayos *in vitro*” y en las figuras 5-8 del presente documento.

- Además, los inventores realizaron ensayos *in vivo* con ratones. Dichos ratones fueron tratados con TNBS para inducirles la enfermedad de Crohn y les administraron el extracto polifenólico de maqui por vía orogástrica, tanto previamente como después de la inducción de la enfermedad de Crohn con TNBS, determinando el carácter preventivo y terapéutico de dicho extracto, respectivamente. Los inventores observaron que el extracto polifenólico de *A. chilensis* o *Ach* atenuaba la pérdida de peso, regulaba la expresión de varias proteínas relacionadas con la inflamación y el estado oxidativo, y suprimía la inflamación del intestino grueso, tanto a nivel macroscópico como microscópico del tejido colónico, así como las consecuencias que conlleva dicha inflamación como: acortamiento de la longitud y reducción del peso del colón, úlceras, hiperemia o heces blandas y mucosidad en el intestino grueso, que se describe a lo largo del punto 3 del apartado de resultados relativo a “Ensayos *in vivo*” y en las figuras 9-25 del presente documento. Describiéndose así, por primera vez, el uso de un extracto polifenólico de *A. chilensis* para el tratamiento y prevención de la enfermedad de Crohn.
- Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un extracto polifenólico de *Aristotelia chilensis* para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Crohn en un sujeto, de aquí en adelante “el uso de la invención”.

Aristotelia chilensis o “maqui” es una planta de la familia de las *Elaeocarpaceae*, originaria del sur de Chile y zonas adyacentes de sur de Argentina, aunque ya se cultiva en otros países como en España. Su fruto es una pequeña baya carnosa comestible, verde cuando es inmadura y morado-negro cuando ha madurado. Es de esta baya de donde los inventores han extraído el extracto polifenólico que se describe en el presente documento.

Los términos “extracto polifenólico de *A. chilensis*” o “extracto polifenólico de maqui” o “Ach”, utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, se refieren a un extracto, compuesto, sustancia, muestra, concentrado o producto que comprende polifenoles y que es aislado, obtenido, derivado o extraído de la planta *A. chilensis* a través de procedimientos o métodos de extracción físicos y/o químicos. De aquí en adelante, el “extracto polifenólico de *A. chilensis*” se denominará “extracto polifenólico de la invención”.

Es práctica de rutina para un experto en la materia obtener el extracto polifenólico de maqui a partir de métodos de extracción de extractos vegetales. Ejemplos de métodos o tratamientos de extracción incluyen, sin limitar a, extracción con solventes acuosos, extracción con solventes alcohólicos o hidroalcohólico, extracción con solventes no alcohólico, compresión en frío, destilación directa, inyección de vapor, arrastre de vapor, vaporización, destilación indirecta, *clevenger*, fluidos supercríticos, membranas, filtración, pulsos eléctricos, ultrasonidos, percolación o lixiviación, maceración, infusión en agua caliente, decocción, digestión y *enfleurage* con grasas en frío y caliente.

En una realización particular del uso de la invención, el extracto polifenólico de maqui se obtiene mediante el método descrito en Genskowsky, E., *et al.*, Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) a Chilean blackberry. J Sci Food Agric, 2016, 96(12):4235-42.

También es práctica de rutina para un experto en la materia aplicar métodos de estabilización de los extractos vegetales obtenidos para mantener sus cualidades organolépticas y funcionales en su posterior almacenamiento, y cualquiera de ellos puede aplicarse en el contexto de la presente invención. Ejemplos de métodos de estabilización de extractos incluyen, sin limitar a, nanoencapsulación, microencapsulación, sistemas gelificantes, deshidratación, secado mediante *Spray Drying* y liofilización.

En otra realización particular del uso de la invención, el extracto polifenólico de maqui se estabiliza mediante liofilización.

Los polifenoles son sustancias químicas que se caracterizan porque comprenden al menos un grupo fenol por molécula. En el estado de la técnica los polifenoles se pueden

clasificar en taninos hidrolizables, ligninas y flavonoides.

Los taninos hidrolizables son polímeros, en particular poliésteres, formados por ácidos fenólicos y azúcares simples, capaces de ser hidrolizados por ácidos, álcalis y enzimas.

5 Ejemplos de taninos hidrolizables incluyen, sin limitar a, gálicos (ácido gálico) y elágicos (ácido elágico).

La lignina es una clase de polímeros fenólicos complejos, amorfos y reticulados que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cicumarílico, coniferílico
10 y sinapílico), insolubles en ácidos y solubles en álcali, que se caracteriza por ser el principal componente de la madera de las plantas.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos solubles en agua que son sintetizados en las plantas a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, cuyo producto,
15 la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos que se clasifican en las siguientes clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, los taninos condensados y
20 las auronas. Ejemplos de flavonoides incluyen, sin limitar a, tricetina, apigenina, luteolina, quercetina, miricetina, kaempferol, fisetina, leucocianidina, leucopelargonidina, leucodelphinidina, pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, malvidina, rosinidina, luteolinidina, capensinidina, aurantinidina, naringenina, liquiritigenina, eriodictiol, dihidroquercetina, dihidromiricetina y dihidrokampferol, entre
25 otros.

La concentración de polifenoles en el extracto polifenólico de *A. chilensis* puede variar en un amplio intervalo. No obstante, en otra realización particular del uso de la invención, el extracto polifenólico de *A. chilensis* comprende al menos 30 mg de polifenoles por
30 cada gramo total de extracto. En otra realización más particular del uso de la invención, el extracto polifenólico de *A. chilensis* comprende de 30 a 50 mg de polifenoles por cada gramo total de extracto, o de 35 a 45 mg de polifenoles por gramo total de extracto. En otra realización todavía más particular del uso de la invención, el extracto polifenólico de *A. chilensis* comprende 39 mg de polifenoles por cada gramo total de extracto. Es
35 práctica de rutina para un experto en la materia estimar la concentración de polifenoles

totales de un extracto vegetal, particularmente de maqui. Un ejemplo de método de estimación o cálculo de polifenoles de un extracto vegetal es el método de *Folin-Ciocalteu*.

5 Los inventores observaron que dicho extracto polifenólico de *A. chilensis* o Ach, descrito en párrafos anteriores del presente documento, previene y revierte los síntomas, la inflamación y cambios tisulares asociados a la enfermedad de Crohn, por lo que dicho extracto se puede usar para el tratamiento y prevención de la enfermedad de Crohn.

10 El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados por una enfermedad, en particular la enfermedad de Crohn, en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- 15 (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar
 20 la aparición de una enfermedad, en concreto la enfermedad de Crohn, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición a padecer la enfermedad.

25 En la presente invención, el término "enfermedad de Crohn" se refiere a una enfermedad inflamatoria intestinal, de origen autoinmune, que afecta a cualquier parte del intestino, aunque suele tener una afectación más localizada a nivel ileocólica, y que se caracterizan por producir una inflamación crónica, que conlleva a dolor abdominal, heces blandas o diarreas, hiperemia y/o úlceras en el sujeto.

30

El extracto polifenólico de maqui puede usarse en tratamiento y prevención de la enfermedad de Crohn en cualquier sujeto. Tal como se usa en la presente invención, el término "sujeto" o "individuo" se refiere a cualquier animal que tenga aparato digestivo, en concreto, intestino. Ejemplos de animales incluyen, sin limitar a, peces, aves,
 35 anfibios, reptiles y mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, sin limitar a, caballos,

cerdos, conejos, ovejas, cabras, vacas, perros, gatos, cobayas, ratas, ratones, primates no humanos, y humanos. El término no indica una edad o sexo particular.

En otra realización particular, el sujeto de la invención es un mamífero, preferiblemente un primate, más preferiblemente, un ser humano de cualquier raza, sexo o edad.

El extracto polifenólico de maqui puede administrarse al sujeto en una dosis terapéuticamente efectiva, la cual puede variar en un amplio rango. En la presente invención, las expresiones “dosis terapéuticamente efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva”, utilizadas indistintamente en el presente documento, se refieren a aquella cantidad o dosis extracto polifenólico de *A. chilensis* o Ach que cuando se administra a un sujeto, preferiblemente a un mamífero, y más preferiblemente a un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Crohn. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la estabilidad metabólica y duración de la acción del Ach; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del sujeto; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación con otros fármacos; la gravedad de la enfermedad o la condición patológica particulares de dicho sujeto. Es práctica de rutina para un experto en la materia, por ejemplo para un médico especialista, determinar la dosis terapéuticamente efectiva para cada sujeto, preferiblemente en un humano, según su propio conocimiento y las condiciones o variables fisiológicas del sujeto.

En otra realización particular del uso de la invención, el extracto polifenólico de *A. chilensis* se administra al sujeto en una dosis terapéuticamente efectiva, preferiblemente diaria, de entre 10 a 60 mg por Kg del sujeto.

En otra realización más particular del uso de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva diaria del extracto polifenólico de *A. chilensis* es de entre 20 a 50 mg por Kg del sujeto.

En otra realización aún más particular del uso de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva diaria del extracto polifenólico de *A. chilensis* por Kg del sujeto se selecciona de la lista que consiste en: 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg y 50 mg.

En otra realización aún más particular del uso de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva diaria del extracto polifenólico de *A. chilensis* es 50 mg por Kg del sujeto.

5 Como entiende un experto en la materia, el extracto polifenólico de *A. chilensis* puede estar comprendido en una composición, particularmente en una composición farmacéutica o nutricional, para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Crohn, según se ha descrito en párrafos anteriores del presente documento.

10 Por tanto, otro aspecto de la invención es una composición que comprende un extracto polifenólico de *A. chilensis*, de aquí en adelante la composición de la invención, para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Crohn en un sujeto.

15 Los términos “extracto polifenólico de *Aristotelia chilensis*”, “tratamiento de la enfermedad de Crohn” y “prevención de la enfermedad de Crohn” han sido descritos anteriormente en el presente documento y se aplican de igual forma a este aspecto de la invención, así como a todas sus realizaciones particulares (solas o en combinación).

20 En una realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

El término “composición farmacéutica” se refiere a un conjunto, mezcla, combinación de componentes o sustancias que comprende el extracto polifenólico de *A. chilensis* en cualquier concentración, y que mejora el estado de salud del sujeto, en particular implica un efecto preventivo o terapéutico de la enfermedad de Crohn. La composición
25 farmacéutica puede ser de uso humano o veterinario. El término “composición farmacéutica de uso humano” se refiere a una sustancia o combinación de sustancias con propiedades para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Crohn en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción
30 farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El término “composición farmacéutica de uso veterinario” se refiere a una sustancia o combinación de sustancias con propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica,
35 inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

En otra realización particular, la composición farmacéutica además comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente farmacológicamente aceptable.

5 El término “vehículo” o “portador”, se refiere a una sustancia, preferiblemente una sustancia inerte, que facilita la incorporación de otros compuestos, que permite una mejor dosificación y administración o mejora la consistencia y forma de la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Crohn. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir
10 cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

15 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica, estabiliza dichos componentes, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. Así pues, los
20 excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula, píldora o cualquier otra forma de presentación como, por ejemplo, el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora
25 para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

Además, como entiende el experto en la materia, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables. El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a
30 que el vehículo o el excipiente deben permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, en particular del extracto polifenólico de *A. chilensis*, es decir, que sea compatible con dichos componentes, de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

35 La composición farmacéutica o medicamento se puede presentar bajo cualquier forma

de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, puede estar en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, intravenosa, intraperitoneal, orogástrica, intracolónica, inhalada o parenteral.

5

En otra realización particular, la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Crohn se administra de forma oral, orogástrica o intracolónica.

10 La composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Crohn se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, píldora, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin
15 limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

Adicionalmente, el extracto polifenólico de *A. chilensis* puede estar comprendido en una
20 composición nutricional para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Crohn. Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención es una composición nutricional.

El término "composición nutritiva" o "composición nutricional" de la presente invención
25 se refiere a una composición alimentaria o alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede estar destinada a la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Crohn.

30

En otra realización particular, la composición nutricional se selecciona entre un suplemento, un nutracéutico, un probiótico o un simbiótico.

El término "suplemento", sinónimo de cualquiera de los términos "suplemento dietético",
35 "suplemento nutricional", "suplemento alimentario" o "suplemento alimenticio" es un

componente o componentes destinados a complementar la alimentación, y puede ser un alimento. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos son, pero sin limitarse, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares. No se presentan como
5 sustitutos de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la dieta alimenticia, sino como complemento de la dieta.

El término "nutracéutico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a sustancias aisladas de un alimento y utilizadas de forma dosificada que tienen un efecto
10 beneficioso sobre la salud. Dicho nutracéutico puede ser un suplemento.

El término "probiótico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a una composición que comprende microorganismos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas ejercen efectos beneficiosos sobre la salud del sujeto u
15 organismo hospedador, preferiblemente sujetos que padecen la enfermedad de Crohn y que padecen daños intestinales.

El término "simbiótico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a aquellos alimentos o composiciones que contienen una mezcla de prebióticos y probióticos. Por
20 regla general contienen un componente prebiótico que favorece el crecimiento y/o actividad metabólica y en definitiva el efecto del probiótico con el que se combina, como por ejemplo y sin limitar puede ser la asociación de los fructooligosacáridos o galactooligosacáridos a una bacteria intestinal como por ejemplo una cepa de la especie *B. uniformis*, que cuando son suministrados en cantidades adecuadas ejercen efectos
25 beneficiosos sobre la salud del sujeto, preferiblemente sujetos que padecen la enfermedad de Crohn y que padecen daños intestinales.

En otra realización particular, la composición nutricional es un alimento que se selecciona de la lista que consiste en: un producto lácteo, un producto vegetal, un
30 producto cárnico, un aperitivo, chocolate, una bebida y un alimento infantil. El producto lácteo se selecciona de la lista que consiste, pero sin limitarse a, un producto derivado de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitar a yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, pero sin limitar a, helado, mantequilla, margarina, suero lácteo). El producto vegetal es, por ejemplo, pero sin limitarse a, un cereal en cualquier forma de
35 presentación, fermentado o no fermentado. La bebida puede ser, pero sin limitarse a,

cualquier zumo de frutas o leche no fermentada.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquematización del proceso obtención del extracto polifenólico de maqui.

Figura 2. Muestra la evaluación microscopia del tejido del intestino grueso entero enrollado en portaobjeto en un único corte.

Figura 3. Muestra la recta de calibración de AG.

Figura 4. Muestra la recta de calibración de trolox.

20

Figura 5. Muestra la viabilidad celular con el tratamiento de Ach en HT-29 expuestas a distintos tiempos y concentraciones de Ach. Se consideran las siguientes significancias estadísticas: * Significancia estadística ($<0,01$) respecto a (a); ** Significancia estadística ($<0,01$) respecto a(b); † Significancia estadística ($<0,01$) entre 24 y 48 horas.

25

Figura 6. Muestra la viabilidad de macrófagos RAW264.7 tratados con LPS, con distintas concentraciones de Ach y 5-ASA. La viabilidad de las células sin LPS y sin tratar fue del 100%. Se consideró significancia estadística un p-value $<0,05$.

Figura 7. Muestra el porcentaje (%) de oxidación como indicador de estrés oxidativo en línea celular HT-29 expuestas a H_2O_2 como compuesto oxidante (oxidación del 100%) y a tratamientos antioxidante NAC y distintas concentraciones de Ach. Se consideró significancia estadística un p-value $<0,05$ respecto a (a).

Figura 8. Muestra el porcentaje (%) de oxidación como indicador de estrés oxidativo en

macrófagos RAW264.7 tratados con LPS, con distintas concentraciones de Ach y 5-ASA. Macrófagos expuestos a LPS fue considerado el % de oxidación del 100%. Se consideró: * Significancia estadística con p-value <0,05 y ** significancia estadística con p-value <0,01 respecto a (a).

5

Figura 9. Muestra imágenes tejido colónico tras la inducción con TNBS de la enfermedad de Crohn aguda. a) Inflamación transmural (H&E, 20 x) (Amplitud que abarca la llave); Infiltración mixta por neutrófilos y linfocitos; Necrosis. b) Destrucción glandular extensa (H&E, 10 x); c) Pérdida de la secreción mucosa (H&E, 20 x); d) Úlcera, congestión vascular en lámina propia (edema) (H&E, 20 x).

10

Figura 10. Valoración de %pérdida de peso, consistencia de las heces y sangrado rectal en una escala de valoración entre 0 y 3 para la obtención del DAI en los grupos experimentales. Se consideraron las siguientes significancias estadísticas: ** Significancia estadística (<0,001) respecto al control G1; † Significancia estadística (<0,001) respecto a G2.

15

Figura 11. Registro del peso corporal en los grupos experimentales desde 1 semana previo a la inducción (día -7) hasta el último día previo al sacrificio (día 4).

20

Figura 12. Fotografías representativas del colon de los diferentes grupos; se considera el acortamiento del colon como un marcador de inflamación tisular.

Figura 13. Comparación de las medias y los valores máximos y mínimos del largo del intestino grueso por grupos experimentales.

25

Figura 14. Comparación de las medias y los valores máximos y mínimos del peso del intestino grueso por grupos experimentales.

Figura 15. Score macroscópico de acuerdo con morfología colónica. **Significancia estadística (<0,001) respecto al Grupo G1; † Significancia estadística (<0,001) respecto al grupo G2.

30

Figura 16. Score microscópico de acuerdo con daño histológico (0-12). **Significancia estadística (<0,001) respecto a Grupo G1; † Significancia estadística (<0,001) respecto

35

al Grupo G2.

Figura 17. Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo control (G1). Tinción H&E. (a) H&E 4 x; (b) H&E 10 x; (c) H&E 40 x. Micrografía panorámica (a) de todo el colon de un ratón tratado con EtOH 50% (Grupos Control, G1) donde se observa un tejido colónico intacto en todas sus capas. En micrografía (b), se observa, en toda la longitud del colon, un único foco de destrucción glandular asociado a una leve pérdida de células caliciformes en figura (c).

Figura 18. Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo (G2). Tinción H&E. (a) H&E 4 x; (b) H&E 20 x; (c) H&E 40 x. Se observa en micrografía panorámica (a) de todo el colon una pérdida de la arquitectura glandular distribuida en focos que abarca desde el extremo distal hasta hacerse más severa en el extremo proximal, junto con la presencia de focos de necrosis. La micrografía (b) muestra destrucción severa de las criptas con infiltrado inflamatorio y edema en mucosa y submucosa, evidenciado por los espacios abiertos entre las células. En la micrografía (c) se observa infiltrado inflamatorio mixto (neutrófilos y linfocitos) invadiendo la pared muscular.

Figura 19. Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo tratado de forma curativa con Ach (G3). Tinción H&E. (a) H&E 4 x; (b) H&E 10 x; (c) H&E 40 x. La micrografía (a) ilustra una estructura conservada en toda la extensión del colon con leve inflamación en la mucosa y un foco inflamatorio cercano al ciego donde se observa pérdida glandular. La micrografía (b) muestra un área de inflamación aguda que se restringe a la mucosa, sin presenciar células inflamatorias en la capa muscular ni en la serosa, evidenciando la ausencia de inflamación transmural. Hay una leve pérdida de la arquitectura glandular en el foco inflamatorio, con estructura glandular conservada alrededor del infiltrado y en el tejido proximal al foco. La micrografía (c) muestra un foco de inflamación aguda con infiltración de neutrófilos en la lámina propia de la mucosa, sin destrucción de las glándulas del intestino grueso.

Figura 20. Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo tratado con Ach de forma preventiva (G4). Tinción H&E. (a) H&E 4 x; (b) H&E 10 x; (c) H&E 40 x. En la micrografía (a) se muestra un único foco de necrosis, una estructura glandular bastante conservada a lo largo de todo el tejido colónico y un

insignificante infiltrado inflamatorio con predominancia de linfocitos, sin evidenciar un foco específico. La micrografía (b) muestra un tejido reepitelizado y núcleos hipercromáticos asociados a cambios regenerativos. Una capa fibrinoleucocitaria con tejido de renovación epitelial es mostrada en la micrografía (c).

5

Figura 21. Estudio histopatológico de la integridad y funcionalidad de la mucosa colónica. Grupo EtOH50% (G1): La micrografía (a) indica tinción PAS+ para glicoproteínas, incluidas la mucina, que manifiesta una mucosa colónica funcional. A más aumento (a.1) se muestra una fuerte tinción y criptas dispuestas en posición habitual. Grupo TNBS+EtOH50% (G2): El corte transversal de la micrografía (b) muestra una tinción PAS débilmente positiva en la zona más distal del intestino grueso y predominancia de PAS- en la zona media y proximal (b.1). Grupo TNBS+TTO/Ach (G3): Células secretoras PAS+ en casi toda la extensión del tejido (c). Algunas zonas (c.1) se observan tinción PAS débilmente positiva. Grupo TNBS+PREV/Ach (G4): Recuperación de la integridad y funcionalidad al visualizar las células secretoras de moco comparado con el grupo enfermo G2 (d). La micrografía (d.1) muestra tinción PAS+ en la mucosa proximal del tejido colónico.

Figura 22. Expresión de proteínas Nrf-2 (a) y HO-1 (b) por análisis de Western blot. Análisis densitométrico expresado en porcentaje (%) en grupo control G1, grupo enfermo G2 y grupos enfermos tratados con Ach (curativo G3 y preventivo G4). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. † Significancia estadística (<0,05) respecto a control G1.

Figura 23. Expresión de proteínas iNOS y COX-2 por análisis de Western blot. Análisis densitométrico expresado en porcentaje (%) del grupo control G1, grupo enfermo G2 y grupos enfermos tratados con Ach (curativo G3 y preventivo G4). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. *Significancia estadística (<0,05) respecto a G2; † Significancia estadística (<0,05) respecto a control G1.

30

Figura 24. a) Expresión de proteína NLRP3 por Western blot y análisis densitométrico normalizado con β -actina, expresado en porcentaje (%). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. b) Expresión de proteína ASC por Western blot y análisis densitométrico normalizado con β -actina, expresado en porcentaje (%). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras

35

verticales. c) Expresión de proteína Caspasa-1 por Western blot y análisis densitométrico normalizado con β -actina, expresado en porcentaje (%). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. *Significancia estadística (<0,05) respecto a grupo G2; † Significancia estadística (<0,05) respecto a control G1.

5

Figura 25. Concentración de IL-1 β en tejido colónico mediante análisis de ELISA. La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. *Significancia estadística (<0,01) respecto a grupo G2; † Significancia estadística (<0,01) respecto a control G1.

10

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de la invención.

15

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLIFENÓLICO DE *ARISTOTELIA CHILENSIS* (MAQUI)

20

1.1. Extracción a partir de maqui

Los inventores obtuvieron el extracto de maqui de un producto envasado y comercializado en Chile denominado "ISLA NATURA DE CHILE®". El fruto contiene semillas y pulpa, es de recolección silvestre en la Patagonia y es liofilizado para su venta.

Con el fin de obtener un extracto que incluya polifenoles totales (antocianinas y no antocianinas), los inventores llevaron a cabo la extracción utilizando metanol ácido (MeOH/H⁺) optimizando el método publicado por *Genskowsky E., et al., J Sci Food Agric.* 2016; 96(12):4235–4242. Todo el procedimiento (Figura 1) se realizó en oscuridad y a temperatura ambiente y mediante las siguientes etapas:

(a) Extracción: los inventores pesaron 50 gramos de maqui en polvo liofilizado y añadieron 250 mL de MeOH/H⁺ (0,1%) a pH 1, lo mezclaron con espátula con el fin de

35

obtener una solución homogénea. Posteriormente sometieron la mezcla a sonicación con un dispositivo de ultrasonido (Hielscher Ultrasound Technology UP400S) a máxima potencia durante 2 minutos. Luego, centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 10 minutos y lo dejaron precipitar durante 5 minutos. Finalmente, los inventores recuperaron el sobrenadante en un Erlenmeyer y repitieron todo el proceso 5 veces.

(b) Evaporación: Una vez que todos los sobrenadantes fueron recuperados, los inventores los pusieron en un rotavapor (Buchi B-490 Heating Bath) durante entre 2 a 3 horas a 35°C con el fin de evaporar el solvente orgánico y concentrar el extracto. Resuspendieron el extracto en agua destilada (H₂O_d), lo centrifugaron a 4000 rpm durante 4 minutos y finalmente recuperaron el sobrenadante.

(c) Filtración: Los inventores llevaron a cabo 3 procesos de filtración, mediante el proceso de vacío en kitasato de 1 L. Para el primer filtrado, utilizaron celita (Celite® Hyflo Supercel Merck, cód.: 1907/2006), y posteriormente realizaron 2 filtrados con papel filtro de porosidad #1 (100-150 MM) y luego #3 (40-100 MM), respectivamente.

(d) Liofilización: los inventores liofilizaron el producto final (extracto polifenólico de *A. chilensis* o Ach liofilizado), obtenido tras las etapas de extracción, evaporación y filtración anteriormente descritas, durante 24 horas en Telstar modelo Cryodos a -80°C. El proceso de liofilización es un método que evita cambios enzimáticos y químicos, desnaturalización de proteínas, pérdida de aromas y componentes fácilmente oxidables, sin provocar la pérdida de actividad.

1.2. Estimación del contenido total de polifenoles (CTP) por *Folin-Ciocalteu*.

Los inventores midieron la concentración de polifenoles totales en el extracto de *A. chilensis* (Ach) por espectrofotometría, según lo descrito por Matic P., et al., *J AOAC Int.* 2017; 100(6):1795–1803 basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de *Folin-Ciocalteu*, que contiene ácido fosfotungstácico ($2WO_4^{2-}$), el cual se reduce originando W_2O_5 (azul de wolframio), a través de la adición del reactivo de *Folin-Ciocalteu* en un medio alcalino. El espectro de absorción de ese compuesto es evaluado a 740 nm.

Los inventores utilizaron en el ensayo los reactivos *Folin-Ciocalteu* (Sigma Aldrich, cód.: F9252), Na_2CO_3 (Sigma Aldrich, cód.: 497-19-8) y ácido gálico [AG] (Sigma Aldrich, cód.: 149-91-7).

- 5 Para la preparación de la recta de calibración, los inventores utilizaron una solución estándar de AG (0,1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 mL y se completó volumen hasta 25 mL de H_2O .

- Para el análisis, los inventores prepararon una solución con 12,8 mg de extracto polifenólico de *A. chilensis* liofilizado (Ach liofilizado) y lo disolvieron en 10 mL de H_2O . La concentración resultante de la disolución de Ach liofilizado fue de 1,28 mg/mL. Tomaron una alícuota de 20 mL de esta disolución en un matraz aforado de 50 mL y la enrasaron con agua. Posteriormente, tomaron una alícuota de 0,5 mL de esta segunda dilución anterior en un matraz aforado de 25 mL y añadieron 1,3 mL de reactivo *Folin-Ciocalteu* y 2,5 mL de Na_2CO_3 saturado, y homogeneizaron esta dilución resultante. Los inventores esperaron 10 minutos hasta la aparición de un color azul de la disolución. Realizaron una comparación visual de la intensidad del color azul de la muestra de extracto polifenólico de *A. chilensis* (Ach) con las disoluciones de la recta de calibración de AG, descrita anteriormente, y realizaron la medición de absorbancia a 740nm. Los resultados fueron expresados en mg de AG/g Ach liofilizado (extracto de maqui).

1.3. Estimación del poder antioxidante mediante método FRAP.

- Los inventores llevaron a cabo la estimación del poder antioxidante mediante el método FRAP, según lo descrito por *Benzie I.F., et al., 1996, Anal Biochem, 239(1): p. 70-6*, basado en el uso de antioxidantes como reductores e inactivación de oxidantes (una especie reducida a expensas de la oxidación de otra) en una reacción colorimétrica relacionada con redox, donde el complejo férrico $[\text{Fe}^{3+}]$ -2,4,4-tripiridil-striazina (Fe^{3+} -TPTZ) incoloro, es reducido a un complejo coloreado azul intenso, el ion ferroso (Fe^{2+} -TPTZ). El ensayo lo llevaron a cabo utilizando los reactivos TPTZ (Sigma Aldrich, Cód.: 3682- 35-7), Solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, Cód.: 10025-77-1) y Trolox para recta de calibración (Sigma Aldrich, Cód.: 53188-07-1).

- Los inventores realizaron la mezcla de los siguientes reactivos, siguiendo el orden de aparición: 1) ácido clorhídrico (HCl) 40 mM, se diluyó 535 μL de HCl (37%) en 100 mL

- de H₂O_d, 2) buffer acetato 0,3 mM a pH 3,6, para 250 mL, se disolvió 0,0061g de acetato sódico (NaAc) en 200 mL de dH₂O y se ajustó pH utilizando HCl 40 mM y se completó hasta 250 mL, 3) solución FeCl₃-6H₂O 20mM, se disolvió 0,1352 g de solución en 25 mL de H₂O_d y 4) solución TPTZ 10mM, se pesó 0,0312 g del reactivo y se disolvió en un matraz de 10 mL con HCl 40mM. Los inventores mantuvieron la solución final de trabajo FRAP durante todo el proceso en baño a 37°C. La proporción de buffer acetato:TPTZ:FeCl₃-6H₂O fue en una proporción de 10:1:1 y el HCl a 40nM se utilizó para ajustar pH.
- 10 Para la preparación de la recta de calibración Trolox, los inventores prepararon la solución madre disolviendo 0,01 g de Trolox en 5 mL de MeOH + 5 mL de H₂O_d. A partir de esta solución, prepararon distintas concentraciones para distintos puntos de la recta (Tabla 1).

Volumen Solución madre (ml)	Concentración Final (μM)
0,01 g/10 mL	
0,5	399,5
0,45	359,5
0,4	319,6
0,35	279,6
0,3	239,7
0,25	199,7
0,2	159,8
0,15	119,8
0,1	79,9

Tabla 1: Concentración de Trolox para la recta patrón

- Para el análisis, los inventores prepararon una solución pesando 12,8 mg de Ach liofilizado y disolviéndolo en 10 mL de H₂O_d. La concentración de la disolución fue de 1,28 mg/mL. A partir de la disolución madre de 1,28 mg/mL realizaron dos disoluciones a distintas concentraciones de extracto para obtener la muestra 1 (M1) = 0,128 mg/mL y la muestra 2 (M2) = 0,512 mg/mL, para determinar su actividad antioxidante. Para el

blanco, los inventores utilizaron solamente 2 mL del reactivo FRAP y 1 mL de H₂O_d. Para la preparación de las muestras, los inventores añadieron 2 mL de FRAP, 0,9 mL de H₂O_d y 0,1 mL a cada muestra M1 y M2 por duplicado. Para la curva de calibración utilizaron el estándar Trolox. Invirtieron las diferentes soluciones para mezclar, manteniéndolas en oscuridad hasta la medición de absorbancia a 593 nm. Los resultados son expresados en μmol de Equivalentes de Trolox (TE)/g.

2. ENSAYOS *IN VITRO*

2.1. Cultivo celular

La línea celular epitelial de cáncer de colon humano HT-29 fue obtenida del departamento de Farmacia de la Universidad de Sevilla y los inventores la mantuvieron en medio *McCoy's 5a* (Biowest, cód.: L0210) suplementado con suero fetal bovino ([SFB], Biowest, Cód.: S1810) al 10% y penicilina-estreptomicina ([P/ST] Biowest, cód.: L0014) al 1%. Incubaron las células a 37°C y 5% de CO₂. Todos los ensayos se llevaron a cabo con una confluencia del 80%.

Línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 fue obtenida del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) de Sevilla. Los inventores mantuvieron las células en medio DMEM alto en glucosa (Biowest, cód.: L0102) con SFB al 10% y 1% de P/ST. Posteriormente, los inventores incubaron las células a 37°C y 5% de CO₂. Todos los ensayos se llevaron a cabo con una confluencia del 80%, mientras que la manutención de la línea celular se llevó a cabo mediante técnicas estándar.

2.2. Ensayo de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular, los inventores utilizaron *Alamar Blue Cell Viability Reagent* (Thermo Fisher Invitrogen™, cód.: DAL1025) como indicador de actividad metabólica. Específicamente, utilizaron en el ensayo resazurina, un colorante azul, permeable a nivel celular y débilmente fluorescente. Al entrar en la célula, la resazurina es reducida a resorufina, produciendo un cambio colorimétrico (rojo-rosa) y una señal fluorescente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. El procedimiento se llevó a cabo según lo indicado por el proveedor.

Los inventores sembraron cada línea celular, HT-29 y RAW 264.7, en placa de 24 pocillos (P24) a una densidad de $1,2 \times 10^5$ células/mL. Una vez se alcanzó una confluencia del 80%, los inventores trataron las líneas celulares con distintas concentraciones de Ach, N-acetilcisteína (NAC) o Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) según se muestra en la Tabla 2.

Células HT-29		Repeticiones
Medio	McCoy's 5a	
Control positivo	Medio +H ₂ O	
Tratamiento	Medio+ H ₂ O +Ach 100 µg/mL	X3
	Medio+ H ₂ O +Ach 200 µg/mL	
	Medio+ H ₂ O +Ach 300 µg/mL	
	Medio+ H ₂ O +NAC 5 mM	
Células Raw264.7		
Medio	DMEM alto en glucosa	
Control positivo	Medio + LPS	
Tratamiento	Medio + LPS+Ach 100 µg/mL	X3
	Medio + LPS+Ach 200 µg/mL	
	Medio + LPS+Ach 300 µg/mL	
	Medio + LPS+5-ASA 0,1 mM	
	Medio + LPS+5-ASA 0,5 mM	
	Medio +LPS+5-ASA 1 mM	
	Medio + LPS+5-ASA 0,1 mM+Ach 100 µg/mL	

Tabla 2: Tratamientos realizados sobre las líneas celulares HT-29 y Raw264.7. Ach: extracto polifenólico de maqui; LPS: lipopolisacárido; NAC: N-acetilcisteína; 5-ASA: Ácido 5-aminosalicílico.

Posteriormente, los inventores removieron el medio, lavaron los cultivos 2 veces con PBS, y añadieron Alamar Blue y medio de cultivo en una proporción 1:10 (medio McCoy's 5a sin rojo fenol para HT-29; medio DMEM sin rojo fenol para RAW 264.7). El medio no llevaba rojo fenol ni suplementación, ya que se ha visto que el suero o proteínas adicionales interfieren con la emisión de fluorescencia o absorbancia.

Los inventores incubaron los cultivos celulares de 1 a 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ y protegidas de la luz. La sensibilidad de detección incrementa con mayor tiempo de incubación. Los inventores tomaron 100 µL de medio de cada pocillo y se llevaron a placa de 96 pocillos (P96) para su lectura, midiendo la absorbancia a 570 nm en un

lector de placa (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, cód.: N07710). Dada la relación directa entre absorbancia y viabilidad celular, los inventores realizaron el cálculo respecto a las células control según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

5

La absorbancia de la muestra es la obtenida con los diferentes tratamientos administrados y la absorbancia control son las células sin tratar.

Las concentraciones y tiempos de medición para cada línea celular fueron:

10

• HT-29: las concentraciones de Ach fueron [100 µg/mL]; [200 µg/mL]; [300 µg/mL], el tiempo de tratamiento con Ach fue 24 y 48 horas post-inducción de la terapia oxidante. El control positivo fue antioxidante conocido N-acetilcisteína (NAC) a 5 mM (Sigma Aldrich, cód.: A9165) y la sustancia oxidante H₂O₂ 0,05% (500 µm) al 30% v/v (PanReac AppliChem, cód.: 131077).

15

• RAW 264.7: las concentraciones de Ach fueron [75 µg/mL]; [100 µg/mL]; [200 µg/mL]; [300 µg/mL] y el tiempo de tratamiento con Ach 12 horas. El control positivo fue 5-ASA (ACROS Organics TM, cód: 89-57-6) a una concentración de 0,1, 0,5 y 1 mM. Se valoró sinergia con 100 µg/mL de Ach con 0,1 mM de 5-ASA. La sustancia inductora de inflamación fue 1 µg/mL de LPS (Sigma Aldrich, cód.: L2630).

20

2.3. Determinación de ROS

25

Para la evaluación del estado de estrés oxidativo (EO), los inventores utilizaron como indicador el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) de acuerdo con el método de Wang, H. et al., 1999, *Radic Biol Med*, 27(5-6): p.612-6. El DCFH-DA es captado por las células, y mediante las esterasas intracelulares, es metabolizado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), que en presencia de ROS (ONOO⁻), se oxida a diclorofluoresceína (DCF), un compuesto fluorescente que es utilizado como medida cuantitativa de EO celular.

30

Para el análisis, los inventores sembraron cada línea celular en placa de 96 pocillos

(P96) a una densidad de $11,8 \times 10^4$ células/mL. Una vez se alcanzó una confluencia del 80%, los inventores trataron las líneas celulares con distintas concentraciones de Ach, NAC o 5-ASA según se muestra en la Tabla 2 mostrada más arriba, e incubadas durante 1 hora a 37°C y a 5% de CO₂.

5

Los inventores prepararon una solución madre de DCFH-DA a 0,01M/L en DMSO y la almacenaron a -20°C.

10

Los inventores, removieron el sobrenadante y lavaron 2 veces con PBS. Posteriormente, añadieron 25 µM de solución de DCFH-DA en medio sin rojo fenol y sin suplementar durante 30 minutos, incubándolo a 37°C y a 5% de CO₂.

15

Realizaron el registro de fluorescencia con una excitación de longitud de onda de 485 nm con el dispositivo Infinity Control, utilizando el programa Tecan-i-control. Dado que DCFH-DA mide indirectamente la cantidad de ROS generado, los inventores realizaron el cálculo a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{Oxidación} = \frac{\text{RFU tratamiento} - \text{RFU sin células}}{\text{RFU control positivo} - \text{RFU sin células}} \times 100$$

20

Donde 'RFU tratamiento' es la fluorescencia media detectada por cada condición de tratamiento descrito en la Tabla 2; 'RFU sin células' es la fluorescencia media detectada en los pocillos que contenían DCFH-DA, pero sin células; y 'RFU control positivo', es la fluorescencia media detectada en los pocillos con LPS (en células RAW 264.7) o H₂O₂ (en células HT-29) y medio de cultivo (medio McCoy's 5a sin rojo fenol para HT-29; medio DMEM sin rojo fenol para RAW 264.7).

25

Las concentraciones y tiempos de medición para cada línea celular fueron:

30

- HT-29: las concentraciones de Ach fueron [100 µg/mL]; [200 µg/mL]; [300 µg/mL] y el tiempo de tratamiento con Ach fue de 1 hora. Como control positivo se utilizó el antioxidante conocido N-acetilcisteína (NAC) a 5 mM (Sigma Aldrich, cód.: A9165) y como sustancia oxidante H₂O₂ 0,05% (500 µM) al 30% v/v (PanReac AppliChem, cód.: 131077).

- RAW 264.7: las concentraciones de Ach fueron [75 µg/mL]; [100 µg/mL]; [200 µg/mL]; [300 µg/mL] y el tiempo de tratamiento con Ach fue de 12 horas. Como control positivo se utilizaron 5-ASA (ACROS Organics™, cód: 89-57-6) a una concentración de 0,1, 0,5 y 1 mM. Se valoró sinergia con 100 µg/mL de Ach con 0,1 mM de 5-ASA. La sustancia inductora de la inflamación fue 1 µg/mL de LPS (Sigma Aldrich, cód.: L2630).

3. ENSAYOS *IN VIVO*

3.1. Modelo animal

Los inventores utilizaron ratones Balb/c adultos de 12 a 14 semanas de edad y de peso entre 19 y 39 gramos del Servicio de Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se emplearon procedimientos aprobados por correspondiente Comité de ética de la Junta de Andalucía. Los inventores proporcionaron a los ratones alimento y agua *ad libitum* y se mantuvieron en un ciclo de oscuridad/luz de 12 horas, temperatura de 25°C y humedad de 55%. Los ratones se anestesiaron mediante anestesia ventilatoria con 4-5% de isoflurano y un flujo de oxígeno a 0,5-1,0 L/minuto durante 5 minutos durante la inducción de la enfermedad de Crohn (EC), y bajo anestesia intraperitoneal (i.p.) durante el sacrificio mediante el empleo de 100 mg/Kg de Ketamina y 5mg/Kg de Diazepan, con una duración de entre 30 y 45 minutos.

Los ratones fueron aleatorizados en 4 grupos de 6 ratones cada uno:

- Grupo 1 [G1]: Control de la inducción (sólo EtOH 50%)
- Grupo 2 [G2]: Enfermo con Crohn [EC] con inducción con TNBS + EtOH 50%, sin tratamiento.
- Grupo 3 [G3]: Enfermo con Crohn [EC] con inducción con TNBS + extracto polifenólico de *A. chilensis*, 1 dosis diaria iniciada un día después de la inducción con TNBS hasta el sacrificio llevado a cabo 5 días después de empezar el tratamiento con TNBS. Grupo de tratamiento con carácter terapéutico de EC.
- Grupo 4 [G4]: Enfermo con Crohn [EC] con inducción con TNBS + extracto polifenólico de *A. chilensis*, 1 dosis diaria durante los 7 días previos a la inducción con TNBS y hasta el sacrificio llevado a cabo 5 días después de empezar la

inducción con TNBS. Grupo de tratamiento con carácter preventivo de EC.

Para la inducción de la enfermedad, los inventores prepararon TNBS (Sigma-Aldrich, cód.: 92822) a una concentración de 100 mg/Kg con EtOH al 50% y se inoculó por vía intracolónica (i.c.) insertado a unos 3 a 4 cm mediante sonda de poliuretano de 2 mm de grosor, según protocolo descrito en el apartado 3.1.1. El día anterior a la intervención, los inventores retiraron el pienso durante 12 horas con el fin de mantener el colon libre de heces. Los animales se mantuvieron 5 días después de una única dosis i.c. de TNBS hasta su sacrificio. Los inventores administraron extracto polifenólico de *A. chilensis* a una dosis de 50 mg/Kg por vía orogástrica.

3.1.1. Preparación de TNBS.

Materiales:

- TNBS (Sigma-Aldrich, cód.: 92822): mantener en frío.
- Etanol 100%
- Anestesia: Ketamina (Ketolar) + Valium (diazepam) / Isoflurano
- Jeringa insulina: Tamaño 1 mL (27-30-gauge needle)
- Sonda o catéter poliuretano: 2mm de grosor.

Procedimiento:

1. Para la instilación rectal de TNBS (100 mg/Kg) en ratones, preparar 2 mg de TNBS/100 μ L de etanol al 50%. Los ratones sólo con etanol al 50% se utilizarán como grupos control.

Preparación TNBS: Densidad: 1.14 g/mL a 20 °C

1 mL ---- 1.14 g

x mL ---- 0.02 g

x = 0.0175 ml o 17.5 μ L del producto (TNBS 1M) en 50 μ L H₂O + 50 μ L EtOH = 100 μ L volumen total (250 μ L para ratas).

2. Conectar jeringa de 1 mL sin aguja a una sonda o catéter de poliuretano (2 mm de grosor).

3. El ratón debe estar en ayuna 18 horas previo al experimento.

4. Introducir suavemente el catéter (humedecido con suero) por vía rectal girándolo sobre sí mismo profundizando aproximadamente 3-4 cm para ratones.

5. Lentamente inyectar 100 µL de TNBS (250 µL para ratas). Después de inyectar el TNBS, colocar el animal cabeza abajo durante 3-4 minutos para evitar pérdida de TNBS.

6. Hidratación post-administración de TNBS. Opción 1: Alimentar a los animales durante la primera semana con sales de rehidratación oral (SRO) comercial o preparada en laboratorio: 8% de sacarosa + 0,2% de solución salina (200 mg NaCl + 8 g sacarosa en 100 mL H₂O) para prevenir la deshidratación. Opción 2: Administración subcutánea de Ringer Lactato 10mL/kg (20µL en un ratón de peso promedio 20 g) postoperatorio y 24 horas después.

7. Realizar seguimiento diario de peso y signos de deshidratación.

3.2. Valoración de la severidad de la enfermedad

Los inventores evaluaron la actividad clínica de la colitis durante la experimentación para determinar el índice de actividad de la enfermedad (DAI). Se valoró la presencia de diarrea, hemorragia rectal y porcentaje de pérdida de peso en una escala de 0 a 3 (Tabla 3).

Score	Criterio		
	Pérdida de peso (%)	Consistencia de las heces	Sangrado rectal
0	<1	Heces formadas	Ausencia
1	1 – 4,99	Heces blandas no adheridas al ano	Pequeñas manchas de sangre en las heces; región anal seca
2	5-10	Heces muy blandas adheridas al ano	Grandes manchas de sangre en las heces; La sangre aparece a través del orificio anal.
3	>10	Heces líquidas; ano mojado	Heces de color rojo oscuro; La sangre se extiende en gran parte alrededor del ano.

Tabla 3: Índice de actividad clínica

3.3. Estudio macroscópico

Tras la anestesia intraperitoneal de los animales, los inventores extrajeron el intestino grueso, lo pesaron y midieron (ancho y largo) y realizaron el registro fotográfico.

Posteriormente, abrieron el intestino grueso por incisión longitudinal. La Tabla 4 muestra los criterios para evaluar el daño a través del sistema de puntuación macroscópico modificado del descrito por *Appleyard C.B., et al., 1995 Am J Physiol, 269(1 Pt 1): p. G119-25.*

5

Score	Criterio	
0	Sin daño	
1	Hiperemia focal	
2	Engrosamiento de la pared intestinal	
3	Ulceración «U» con inflamación «I» en 1 sitio	
4	«U» e «I» en 2 sitios o 1 sitio de «U» e «I» con extensión > 1 cm	
5	Si el daño es >2 cm de longitud, el score incrementa en 1 por cada cm adicional	
Adicional		
0→ Ausencia de diarrea	1→ Presencia de diarrea	
0→ Ausencia de mucus	1→ Presencia de mucus	
Adicional		
0→Sin adhesiones	1→Adhesiones menores	2→Adhesiones mayores
0→Sin congestión	1→Congestión en 1 sitio	2→Congestión en >2 sitios

Tabla 4: Score de daño macroscópico intestinal

3.4. Estudio histopatológico

10

Tras la extracción del colon, los inventores lo lavaron con PBS para eliminar los restos de sangres y heces. Posteriormente, cortaron el intestino grueso longitudinalmente en dos; una mitad la congelaron en nitrógeno líquido para análisis posteriores y la otra mitad la enrollaron desde el extremo distal hasta el proximal (Figura 2). Una vez hecho el rollito, los inventores lo fijaron en formaldehído al 4% y se incluyó en parafina. Después realizaron cortes seriados de 4 µm (valorando los cortes 1º, 5º y 10º de cada muestra) y los tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y ácido peryódico-reactivo de schiff (PAS) mediante técnicas estándar. para su posterior estudio histopatológico. Los inventores examinaron las preparaciones para asignar puntuación del daño a nivel microscópico de acuerdo con un sistema modificado basado en el propuesto por *Appleyard C.B., et al., 1995 Am J Physiol, 269(1 Pt 1): p. G119-25* (Tabla 5).

15

20

Score	Criterio
0,1,2 y 3 (ausente, leve, moderado y severo)	Pérdida de la arquitectura de la mucosa Infiltración celular Depleción de células caliciformes
0 o 1 (ausente o presente)	Formación de abscesos en criptas Necrosis Ulceración

Tabla 5: Score de daño microscópico intestinal

3.5. Obtención de proteínas citoplasmáticas y análisis Western Blot

5

Para el procesamiento de las muestras, los inventores seleccionaron al azar 4 tejidos de colon por grupo (n=4) congelados en nitrógeno líquido, pesaron unos 100 mg de tejido aproximadamente y los homogeneizaron en un sonicador con tampón de lisis helado en proporción 1:3 (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 8 mM MgCl₂, 5 mM etilenglicol bis (ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetra-acético [EGTA]), 0,5 mM de EDTA, 0,01 mg/mL de leupeptina, 0,01 mg/mL pepstatina, 0,01 mg/mL aprotinina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 250 mM NaCl). Los inventores centrifugaron los homogeneizados a 12.000g, 15 minutos, 4°C y recogieron los sobrenadantes y los almacenaron a -80°C.

15

Para determinar la concentración de proteínas de los homogenizados de colon, los inventores utilizaron el método colorimétrico de *Bradford M.M., et al., 1976, Anal Biochem, 72: p. 248-54*. De las alícuotas que contenían los sobrenadantes, los inventores realizaron una dilución 1:20 (2µl de muestra: 38µL de H₂O) para calcular los miligramos proteína/mL.

20

Posteriormente, los inventores llevaron a cabo un análisis de Western blot. Separaron las muestras de los sobrenadantes con cantidad igual de proteína (30 µg) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (PAGE/SDS) al 10% y 15% dependiendo de la proteína de interés. Luego, transfirieron electroforéticamente las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y las tiñeron con rojo *Ponceau* para registrar la eficiencia de la carga de proteína. A continuación, bloquearon las membranas en solución de bloqueo (albúmina de suero bovino [BSA] al 5% disuelta en Nonidet™ P40 [NP-40] al 0,5% y PBS pH 7,4) a temperatura ambiente durante 1½ hora.

25

Posteriormente, los inventores incubaron con anticuerpos primarios específicos en solución de bloqueo toda la noche: anticuerpo policlonal de conejo anti-iNOS (1:1000; Stressgen-Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA, cód: ADI-KAS-NO001-D), anticuerpo policlonal de conejo anti-COX2 (1:300; Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, USA, cód.: 160116), anticuerpo policlonal de conejo anti-Nrf-2 (1:1000; Santa Cruz, USA cód: sc-722), anticuerpo policlonal de conejo anti-HO-1 (1:1000; Stressgen-Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA, cód: ADI-SPA-896), anticuerpo monoclonal de conejo anti-NLRP3 (1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; cód.: D4D8T), anticuerpo monoclonal de conejo ASC (1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; cód.: D2W8U) y anticuerpo policlonal de conejo anti-Caspasa 1 (1:1000; abcam, Cambridge, UK, cód: ab1872).

Después de 3 lavados, incubaron las membranas con anticuerpo secundario anti-conejo unido a peroxidasa de rábano (HRP) (1:1600; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; cód.: 7074P2) o anti-ratón (1:1600; Dako®, Atlanta, cód.: P0447) en solución de bloqueo por 1½ hora a temperatura ambiente. Para demostrar la igual carga de proteínas, incubaron las membranas con β -actina utilizando un anticuerpo anti- β -actina (1:6000; Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU, cód.: A5316).

Los inventores realizaron la inmunodetección con un kit de detección de luz de quimioluminiscencia (SuperSignal West Femto, para todas las proteínas y Pico, para β -actina, Pierce, IL, EE. UU.). Luego, monitorizaron las señales inmunológicas utilizando un sistema de imagen molecular automatizado para proteínas por quimioluminiscencia (Amersham 600, ge Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Los inventores analizaron las señales y las cuantificaron con un sistema de imagen (Biophotonics ImageJ Analysis Software, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) y las expresaron como porcentaje con respecto al grupo control.

30 **3.6. Determinación de IL-1 β**

Los inventores midieron las concentraciones de IL-1 β en tejido colónico mediante el kit de inmunoensayo enzimático cuantitativo (ELISA) de acuerdo a instrucciones del fabricante (Murine IL-1 β , PeproTech, cód.: 900-K47). Seleccionaron un subconjunto aleatorio de muestras de colon (n =6) para el ensayo. Los inventores pesaron y

homogeneizaron las muestras de colon en frío con sonicador en tampón inhibidor de proteasa para ELISA en proporción 1:20 (PSS 1X, 0,5 mM de EDTA, 0,01 mg/mL de leupeptina, 0,01 mg/mL pepstatina, 0,01 mg/mL aprotinina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF]). A continuación, centrifugaron los homogenizados a 12000 g durante 10 minutos a 4°C y recogieron y almacenaron los sobrenadantes a -80°C. Los niveles de citoquinas fueron expresados como pg/mg de tejido.

3.7. Análisis estadístico

Todos los valores en figuras y tablas están expresados como media aritmética $\pm$ error estándar de la media (SEM). Para los cálculos de la desviación estándar en datos expresados en porcentajes, los inventores utilizaron el % de desviación estándar relativa (%DER). Para realizar comparación de medias, en primer lugar, comprobaron la normalidad de las variables usando la prueba de Shapiro Wilk. Para evaluar el supuesto de igualdad de varianza, utilizaron la prueba de Levene. Cuando comprobaron que la variable tuvo una distribución normal y homogeneidad de varianza, aplicaron la prueba “t de student” para la comparación de 2 medias. En caso contrario, aplicaron la prueba de U de Man Whitney.

Para la comparación de 3 medias o más, los inventores primero utilizaron la prueba de Shapiro Wilk para comprobar supuesto de normalidad y prueba de Bartlett para comprobar igualdad de varianza. En caso de cumplir los supuestos, utilizaron la prueba de ANOVA y cuando los supuestos de normalidad y varianza no se cumplieron, utilizaron prueba de Kruskal-Wallis. Cuando ANOVA o Kruskal-Wallis arrojaron un nivel de significancia $< 0,05$ realizaron prueba post-hoc de Bonferroni. Todos los datos fueron considerados estadísticamente significativos con un $p\text{-value} < 0,05$ y $p\text{-value} < 0,01$. Los experimentos que involucran ensayos *in vitro* y análisis de Western blot, los realizaron por triplicado. Los análisis de ELISA los realizaron por duplicado. El análisis histopatológico lo realizaron a ciegas o enmascarado con el fin de evitar el sesgo del observador. Todos los datos fueron procesados en software STATA 12.0.

RESULTADOS

1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLIFENÓLICO DE *ARISTOTELIA CHILENSIS* (MAQUI)

1.1. Contenido total de polifenoles del extracto de *A. chilensis* (Ach)

En la Tabla 6 se indican los valores de absorbancia de distintas concentraciones de ácido gálico (AG) comprendidas entre 0,5 ppm y 8 ppm. En la Figura 3 se muestra la recta de calibrado, representando la absorbancia frente a concentración de AG (ppm). La absorbancia del blanco fue de 0,03.

[AG] (ppm)	Abs (740nm)
0,5	0,064
1	0,1292
2	0,2296
4	0,4289
8	0,8635
8	0,8231

Tabla 6: Absorbancia a distintas concentraciones de Trolox. AG: Ácido Gálico; Abs: Absorbancia

Los resultados del método de *Folin Ciocalteu* revela que en cada gramo del extracto liofilizado del fruto de maqui hay en promedio 39,02 mg de polifenoles expresados como ácido Gálico (AG) (Tabla 7).

		Abs corregida	[C] ppm	[C _{muestra}] ppm	mg muestra	CTP mg/g
M1=	0,2434	0,2134	1,87949466	23,49368319	5,8734208	39,5516552
M2=	0,2382	0,2082	1,82896016	22,86200194	5,71550049	38,4882188
		BM= 0,03				

Tabla 7: Contenido de polifenoles totales en extracto liofilizado de maqui. M1: Muestra 1; M2: Muestra 2; BM: Blanco muestra; CTP: Contenido total de polifenoles

1.2. Capacidad antioxidante del extracto de *A. chilensis* (Ach)

La Tabla 8 muestra los valores de absorbancia de distintas concentraciones de Trolox comprendidas entre 79,9 μ M y 399,5 μ M. En la Figura 4 se presenta la recta de calibración con los datos obtenidos del ensayo FRAP representando la absorbancia frente concentración de Trolox (μ M).

5

[Trolox] (μ M)	Abs [593nm]
399,5	0,6
359,5	0,582
319,6	0,497
279,6	0,439
239,7	0,379
199,7	0,311
159,8	0,255
119,8	0,192
79,9	0,123

Tabla 8: Absorbancia a distintas concentraciones de Trolox. Abs: Absorbancia

Los resultados respecto a la capacidad antioxidante (CA) del extracto de maqui de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} se muestran en la Tabla 9. La disolución #1 muestra una CA de 20843,75 μ mol Equivalentes de Trolox (TE/g), mientras que la disolución #2 presenta una CA de 20296,87 μ mol TE/g, mostrando valores similares entre ellas. En promedio, los datos indican que el extracto de maqui presenta una CA de 20.571,31 μ mol TE/g.

10

Muestra (#)	[mg/ml]	Absorbancia	μ M muestra	Actividad Antioxidante μ mol TE/g
0	1,28	-----		
1	0,128	0,142	88,937	20843,75
2	0,512	0,554	346,437	20296,87

15

Tabla 9: Capacidad Antioxidante del extracto polifenólico de maqui

20

2. ENSAYOS *IN VITRO*

2.1. Efecto del extracto de *A. chilensis* (Ach) sobre viabilidad celular

Las células epiteliales de colon HT-29 fueron expuestas a 0,05% de H₂O₂ como agente oxidante en este modelo de EO. Para probar el efecto protector de maqui, los inventores incubaron las células con concentraciones crecientes de Ach durante 24 y 48 horas y compararon cuando se incubaron con NAC, un antioxidante ampliamente conocido y de uso clínico. Después de la exposición a estos compuestos, evaluaron la viabilidad celular mediante la prueba de Alamar Blue®. Los resultados mostraron una reducción significativa (p-value<0,01) de la viabilidad en aquellas células expuestas a H₂O₂. Cuando las HT-29 se incubaron con el extracto polifenólico de maqui (Ach), se redujo la muerte celular causada por EO, incrementando la viabilidad celular de forma estadísticamente significativa (p-value <0,01) a las 24 horas cuando se trató con Ach a una concentración de 300 µg/mL. A las 48 horas, desde las concentraciones más bajas hasta las más altas de Ach (100, 200 y 300 µg/mL) se observó un incremento significativo de la viabilidad respecto a las células sin tratamiento expuestas al H₂O₂ (Figura 5).

Con el fin de evaluar el perfil citotóxico de Ach, los inventores evaluaron la viabilidad de la línea celular RAW264.7 cuando fueron incubadas durante 12 horas con distintas concentraciones de extracto polifenólico Ach (75, 100, 200 y 300 µg/mL) y LPS (1µg/mL) como activador y agente inflamatorio de macrófagos. La viabilidad de las células incubadas con LPS fue del 89,37% (SEM 10,60%), mientras que con Ach varía del 98,2% (SEM 8,73%) al 106,82% (SEM 11,59%) y con 5-ASA entre 79,89% (SEM 10,83%) y 90,75% (SEM 10,24%). La sinergia entre 1 mM de 5-ASA y 100 µg/mL de Ach tampoco presentó una reducción de la viabilidad celular (90,7%, SEM 10,24%). El ensayo de viabilidad por Alamar Blue® reveló que el extracto polifenólico de maqui no ejerció ningún efecto significativo sobre citotoxicidad en las células de macrófagos RAW264.7 (Figura 6).

2.2. Efecto del extracto de *A. chilensis* (Ach) sobre el estrés oxidativo en cultivo celular

Debido a que DCFH-DA presenta una elevada permeabilidad celular y es oxidado por ONOO⁻ a DCF, los inventores evaluaron el porcentaje de oxidación de este compuesto en las líneas celulares HT-29 y RAW264.7. En HT-29 observaron un incremento significativo de la oxidación intracelular con la adición de H₂O₂ (p-value <0,05). El

porcentaje de oxidación muestra una inhibición dosis dependiente del extracto polifenólico (reducción de 63,96%, SEM 2,24%; 57,62%, SEM 9,85%; y 43,75% SEM 13,19%) a concentraciones de Ach de 100, 200 y 300 µg/mL respectivamente, llegando a una reducción significativa a una concentración de 300 µg/mL (p-value<0,05). En paralelo, cuando las células expuestas a H₂O₂ se trataron con NAC, los inventores observaron una disminución en la oxidación, aunque no significativa del 74,61% (SEM 14,87%) respecto a las células incubadas sólo con H₂O₂ (Figura 7).

Por otra parte, los macrófagos control presentaron una oxidación significativamente menor (p-value <0,01) respecto a los macrófagos activados con LPS, demostrando la relación entre inflamación y EO. Cuando la línea celular es tratada con distintas concentraciones de extracto de Ach es posible observar un efecto protector contra el EO mediado por ONOO⁻ (DCF), mientras que los macrófagos tratados con 5- ASA a concentraciones de 0,1, 0,5 y 1 mM no presentaron efectos significativos sobre la oxidación, aunque con una tendencia a la baja. Los inventores observaron que a 0,1 mM de 5-ASA, con la adición de la menor dosis de Ach (100 µg/mL), el % de oxidación fue el más bajo de todos los tratamientos (20,83%, SEM 6,72%), acercándose a los valores de oxidación que presentaron las células sin estimular con LPS (13,69%, SEM 6,34%) (Figura 8).

3. ENSAYOS *IN VIVO*

3.1. Evidencia de la inducción de enfermedad de Crohn aguda por TNBS

Los ratones tratados con TNBS presentaron una inflamación intensa de la pared del tejido colónico. El intestino grueso presentó una morfología atípica con distorsión y pérdida de la arquitectura glandular evidente. Hubo una marcada afectación de la mucosa y submucosa relacionada con infiltración de células inflamatorias, especialmente neutrófilos y linfocitos, asociados con inflamación aguda y engrosamiento por edema de la lámina propia. Los inventores detectaron algunas áreas con ulceración y necrosis. Adicionalmente, el daño se extendía hacia la capa muscular y serosa, tratándose de una inflamación transmural (Figura 9 A-D). los inventores no observaron engrosamiento de la capa muscular ni granulomas, ya que estos parámetros están asociados a una fase crónica de la enfermedad, comprobando que el modelo experimental en este estudio es de tipo agudo.

3.2. Efecto sobre actividad clínica y peso corporal de Ach en enfermedad de Crohn inducida por TNBS

5 Durante la fase activa de la enfermedad, los inventores observaron una evidente alteración del estado de salud de los animales. Todos los ratones enfermos presentaron hipomotilidad, postración y piloerección al día siguiente de la inducción con TNBS. Sin embargo, los grupos enfermos tratados con Ach (G3 y G4) recuperaron la actividad diaria, con evidente mejora física y de salud.

10

Todos los grupos experimentales tuvieron un seguimiento diario, controlando el peso corporal y evaluando las heces respecto a consistencia, presencia de mucosidad y sangrado. Estos indicadores fueron procesados mediante el indicador clínico "DAI", uno de los parámetros más importantes, junto con el peso corporal, para determinar la
15 severidad clínica de la enfermedad. Los ratones inoculados con TNBS (G2) sin tratamiento mostraron un incremento significativo ($<0,001$) de DAI respecto al grupo control con EtOH50% (G1). Consistente con los hallazgos evidenciados en el estado de salud, los animales tratados tanto post-inducción de la enfermedad como de forma preventiva (G3 y G4, respectivamente) presentan un DAI similar al grupo control, con
20 una disminución altamente significativa respecto a los ratones enfermos con EC ($<0,001$) (Figura 10).

En particular, la inducción de la inflamación aguda tipo Crohn causada por la administración de TNBS fue asociada con una pérdida significativa del peso corporal,
25 mientras que el tratamiento con Ach atenúa la pérdida de peso. Los ratones enfermos del grupo G2 (TNBS+EtOH50%) presentaron una disminución de peso desde el día de la inducción hasta el sacrificio. El grupo G3 (TNBS+TTO/Ach) presentó una pérdida leve al día siguiente de la inducción que se estabilizó hasta el día del sacrificio. Por su parte, el grupo G4 (TNBS+PREV/Ach) logró recuperar el peso igualándolo a los días previos
30 a la inducción (Figura 11).

3.3. Efecto preventivo y curativo de Ach sobre parámetros morfológicos y macroscópicos del tejido colónico en el modelo animal de enfermedad de Crohn inducido por TNBS

35

Los inventores trataron los ratones con 50 mg/Kg de Ach por vía orogástrica 4 días después de la inducción de la EC por TNBS (grupo G3) y 7 días previos a la inducción y de forma continua hasta el final del experimento (grupo G4). Cuatro días después de la inducción, sacrificaron los ratones y extirparon el intestino grueso para su evaluación macroscópica. El colon de ratones enfermos sin tratamiento (G2) reveló un acortamiento en comparación con los ratones del grupo control (G1). El colon de los ratones tratados con Ach (G3 y G4) mostró una marcada supresión de la inflamación del tejido, evidenciado por la longitud del colon (Tabla 10 y Figura 12).

Grupos	Promedio (cm)	SEM
G1 (EtOH50%)	12,38	0,53
G2 (TNBS+EtOH50%)	9,54	0,36
G3 (TNBS+TTO/Ach)	11,30	0,40
G4 (TNBS+PREV/Ach)	11,66	0,21

Tabla 10: Promedio ($\pm$ SEM) de la longitud del colon de los grupos experimentales

Las diferencias entre el grupo enfermo y el grupo control son estadísticamente significativas (p-value <0,001). Diferencias significativas también fueron encontradas cuando se comparó el grupo G2 con TNBS+EtOH50% con los grupos tratados con Ach (Figura 13).

Adicionalmente, los inventores valoraron el peso del intestino grueso, dado que es otro marcador de inflamación tisular. El promedio del peso del colon fue significativamente mayor en el grupo G2 (p-value <0,01). Los ratones tratados de forma preventiva y curativa con Ach mostraron una marcada reducción del peso colónico (p-value <0,001), llegando a valores iguales o incluso inferiores al de los ratones del grupo control G1 (Figura 14).

Cuando los inventores realizaron la evaluación macroscópica, esta reveló la presencia de mucosidad y heces blandas y líquidas en el interior del intestino grueso de aquellos ratones que les fueron administrados TNBS+EtOH50% por vía i.c. Estos rasgos son propios de un proceso inflamatorio durante la fase aguda de la EC. Además, durante la extracción del tejido colónico en el sacrificio, fue posible evidenciar la adhesión del colon a tejidos adyacentes. La presencia de hiperemia, congestión y ulceraciones en ratones

tratados con TNBS fue observada al momento de abrir el intestino grueso longitudinalmente. Estas características morfológicas fueron casi totalmente restauradas en los grupos tratados con Ach (G3 y G4).

- 5 Cuando los inventores aplicaron el *score* macroscópico, el daño colónico observado fue evidente en el grupo enfermo G2 (p -value $<0,001$) respecto a la administración i.c. de EtOH50% en el grupo control G1, el cual arrojó una puntuación mínima del *score* macroscópico. Interesantemente, los grupos tratado con Ach (G3 y G4) presentaron una fuerte significancia estadística en la reducción del *score* respecto al grupo enfermo. Los
- 10 valores de los grupos G3 y G4 fueron similares al grupo control G1 (Figura 15).

3.4. Efecto preventivo y curativo de Ach sobre evaluación microscópica y estudio histopatológico del tejido colónico en el modelo animal de enfermedad de Crohn inducido por TNBS

15

- La valoración microscópica mostró un incremento significativo del daño histológico en los ratones tratados con TNB+EtOH50%. El *score* de este grupo fue 3 veces mayor que el grupo que se intervino sólo con EtOH50%. Cuando los inventores compararon con los grupos que recibieron tratamiento, observaron que el grupo G2 presentó el doble de
- 20 puntuación que el grupo tratado con Ach tanto de forma preventiva como curativa (Figura 16).

- Por otra parte, la evaluación histológica mostró una inflamación transmural distribuida en focos caracterizada por infiltración de células inflamatorias, ulceración en la mucosa
- 25 y submucosa y pérdida de células caliciformes en todo el colon de ratones enfermos (G2), mientras que en las muestras de colon de ratones control (G1) se observaron características típicas de una estructura normal. La administración de Ach por vía orogástrica a los ratones enfermos mostró una recuperación significativa de las alteraciones patológicas, restaurando la histológica normal del tejido colónico (Figura 17
- 30 A-C: Tejido colónico intacto en todas sus capas (mucosa, submucosa, muscular y serosa) en el grupo control (G1), Figura 18 A-C: Pérdida severa de la arquitectura glandular distribuida en focos, infiltrado inflamatorio mixto (neutrófilos y linfocitos) y edema (G2), Figura 19 A-C: Estructura histológica conservada en todo el colon con inflamación leve en la lámina propia (G3), Figura 20 A-C: Foco único de necrosis con
- 35 arquitectura conservada en todo el tejido colónico sin inflamación transmural (G4).

3.5. Efecto preventivo y curativo de Ach sobre la integridad de la mucosa colónica en los animales con enfermedad de Crohn inducido por TNBS

5 Las características histológicas de la integridad de la mucosa colónica y su capacidad muco-secretora fueron examinadas con la tinción PAS, la cual permitió a los inventores distinguir las células caliciformes secretoras de moco. En el grupo G1 fue posible apreciar una tinción PAS positiva (PAS+) por glicoproteínas y se distinguieron claramente las células caliciformes. El grupo enfermo (G2) presentó en su gran
10 extensión, principalmente en la parte media y proximal, una tinción PAS negativa (PAS), mostrando una disminución histológicamente significativa de la integridad y funcionalidad de la mucosa colónica. Los grupos tratados con extracto de Ach (curativo: G3 y preventivo: G4), mostraron una recuperación relevante de la integridad de la mucosa del intestino grueso. Los cambios fueron evidenciados por el adecuado perfil
15 glandular y una mejora en la tinción con PAS, logrando una tinción PAS+ en prácticamente todo el tejido (Figura 21 A-D).

3.6. Expresión de proteínas Nrf-2 y HO-1 relacionadas con el estrés oxidativo en enfermedad de Crohn y su regulación con Ach

20 Nrf-2 es un factor de transcripción responsable del equilibrio redox celular y regulador de la expresión de HO-1, una importante proteína con efectos antioxidantes y antiinflamatorios. Los inventores realizaron un análisis de Western blot para identificar los niveles de expresión de Nrf-2 y HO-1 en tejido colónico del modelo de EC provocado por TNBS y en los grupos tratados con Ach. Nrf-2 mostró una sobrerregulación en el
25 grupo enfermo respecto al grupo control G1, sin presentar diferencias significativas cuando se realizó el análisis densitométrico y estadístico. Los grupos tratados con Ach, tanto preventivo como curativo, mostraron una leve tendencia al alza respecto al grupo control (G1) y levemente inferior respecto al grupo enfermo (G2) (Figura 22 A). En
30 consonancia con estas observaciones, la expresión de la proteína HO-1 aumentó en el grupo G2, con significancia estadística cuando se comparó con el grupo G1. Siguiendo la misma tendencia que Nrf-2, HO-1 presentó un leve incremento cuando a los ratones se les administró Ach, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 22 B).

35

3.7. Expresión de las proteínas iNOS y COX-2 involucradas en procesos inflamatorios en la enfermedad de Crohn y sus niveles post-tratamiento con Ach

Para investigar los procesos inflamatorios relacionados con el daño tisular observado en el análisis histopatológico del IG del modelo experimental de EC, los inventores realizaron un análisis de la expresión de proteínas iNOS y COX-2 en tejido colónico. El análisis de *Western blot* mostró que iNOS, proteína relacionada con el inicio y perpetuación de la inflamación intestinal, estaba significativamente incrementada (p-value <0,05) en animales con EC por TNBS. Sin embargo, los niveles de esta proteína fueron significativamente atenuados cuando se trataron con Ach después de la inducción de la enfermedad (p-value <0,05) y una tendencia notable a la baja cuando se les administró extracto de Ach previo a la inducción (Figura 23 A). En cuanto a COX-2, ampliamente reconocida por su participación en la actividad inflamatoria aguda en células inflamatorias y epiteliales, aumentó su expresión en el grupo G2, mientras que en el grupo G3 presentó una disminución significativa (p-value <0,05) respecto al grupo enfermo (G1). Adicionalmente, el grupo de ratones tratados de forma preventiva con Ach presenta una reducción importante, llegando a niveles similares al grupo control G1 (Figura 23 B)

3.8. Expresión de proteínas del complejo multiproteico inflammasoma NLRP3/ASC/Caspasa 1 en la enfermedad de Crohn y sus niveles post-tratamiento con Ach

Para evaluar el impacto del tratamiento sobre los mecanismos moleculares involucrados que subyacen al proceso inflamatorio, los inventores realizaron un análisis de expresión proteica mediante análisis de *Western blot* del complejo inflammasoma NLRP3/ASC/caspasa 1, cuya expresión y actividad ha sido recientemente descrita como una vía de gran relevancia en la homeostasis e inmunidad del sistema gastrointestinal y una vía crítica en la inflamación intestinal. Los resultados del análisis demostraron que la expresión de la proteína NLRP3 está incrementada significativamente (p-value <0,05) en el grupo enfermo G2, mientras que con Ach fue capaz de disminuir fuertemente (p-value <0,05) la expresión de la proteína NLRP3 (Figura 24 A). Consecuentemente, la proteína ASC, que juega un rol primordial en la formación del inflammasoma, presentó un aumento en los ratones enfermos de Crohn, mientras que una subregulación fue observada en los grupos tratados con Ach, aunque sin presentar diferencias

estadísticamente significativas (Figura 24 B). Cuando se observó y cuantificó la caspasa 1, la última proteína de la cascada inflamatoria del inflamasoma NLRP3 y responsable de la maduración de IL-1 β e IL-18, los resultados arrojaron un incremento de su expresión en el grupo con EC sin tratar (G2), mientras que se advirtió una reducción significativa en ratones con tratamiento curativo a base de Ach (G3). Los grupos a los que se les administró Ach 7 días previos a la inducción (G4) mostraron una expresión con una fuerte tendencia a la baja cuando se compararon con el grupo enfermo G2 (Figura 24 C).

3.9. Efecto de Ach sobre los niveles de citoquina inflamatoria IL-1 β en el modelo animal de enfermedad de Crohn inducido por TNBS

Con el objetivo de explorar los mecanismos por los cuales Ach disminuye la inflamación transmural en colon de ratones con EC por TNBS, los inventores evaluaron la producción de citoquinas inflamatorias. Debido a la fuerte expresión del inflamasoma en tejido intestinal de animales con EC, se evaluó específicamente la producción de IL-1 β en tejido colónico, cuya maduración y actividad biológica requiere del ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y activación de caspasa 1. Los investigadores determinaron que en modelo de EC por TNBS existe un incremento significativo (p-value <0,01) de la producción de IL-1 β , concordante con la intensa activación de inflamasoma NLRP3 encontrada en el intestino grueso por Western blot. Comprobaron que Ach logró atenuar con un alto poder de significancia estadística (p-value <0,01) los niveles de IL-1 β en tejido colónico (Figura 25), probando el efecto antiinflamatorio del Ach mediante una reducción importante de la producción de la citoquina inflamatoria IL-1 β .

REIVINDICACIONES

1. Extracto polifenólico de *Aristotelia chilensis* para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Crohn en un sujeto.
5
2. El extracto para su uso según la reivindicación 1 en donde el sujeto es un mamífero, preferiblemente es un humano.
3. El extracto para su uso según la reivindicación 1 o 2 que comprende al menos 30 mg
10 de polifenoles por cada gramo total de extracto.
4. El extracto para su uso según la reivindicación 3 que comprende 39 mg de polifenoles.
5. El extracto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde
15 la dosis diaria terapéuticamente efectiva de dicho extracto es de entre 1 a 60 mg por Kg del sujeto.
6. El extracto para su uso según la reivindicación 5 en donde la dosis diaria terapéuticamente efectiva es 50 mg por Kg del sujeto.
20
7. El extracto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el extracto polifenólico de *Aristotelia chilensis* está comprendido dentro de una composición.
8. El extracto para su uso según la reivindicación 7 en donde la composición es una
25 composición farmacéutica o una composición nutricional.
9. El extracto para su uso según la reivindicación 8, en donde la composición farmacéutica comprende, además, un vehículo o excipiente farmacéuticamente
30 aceptables.
10. El extracto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en donde la composición se administra de forma oral, orogástrica o intracolónica.
11. El extracto para su uso según la reivindicación 8, en donde la composición nutricional
35

se selecciona entre un suplemento, un nutracéutico, un probiótico o un simbiótico.

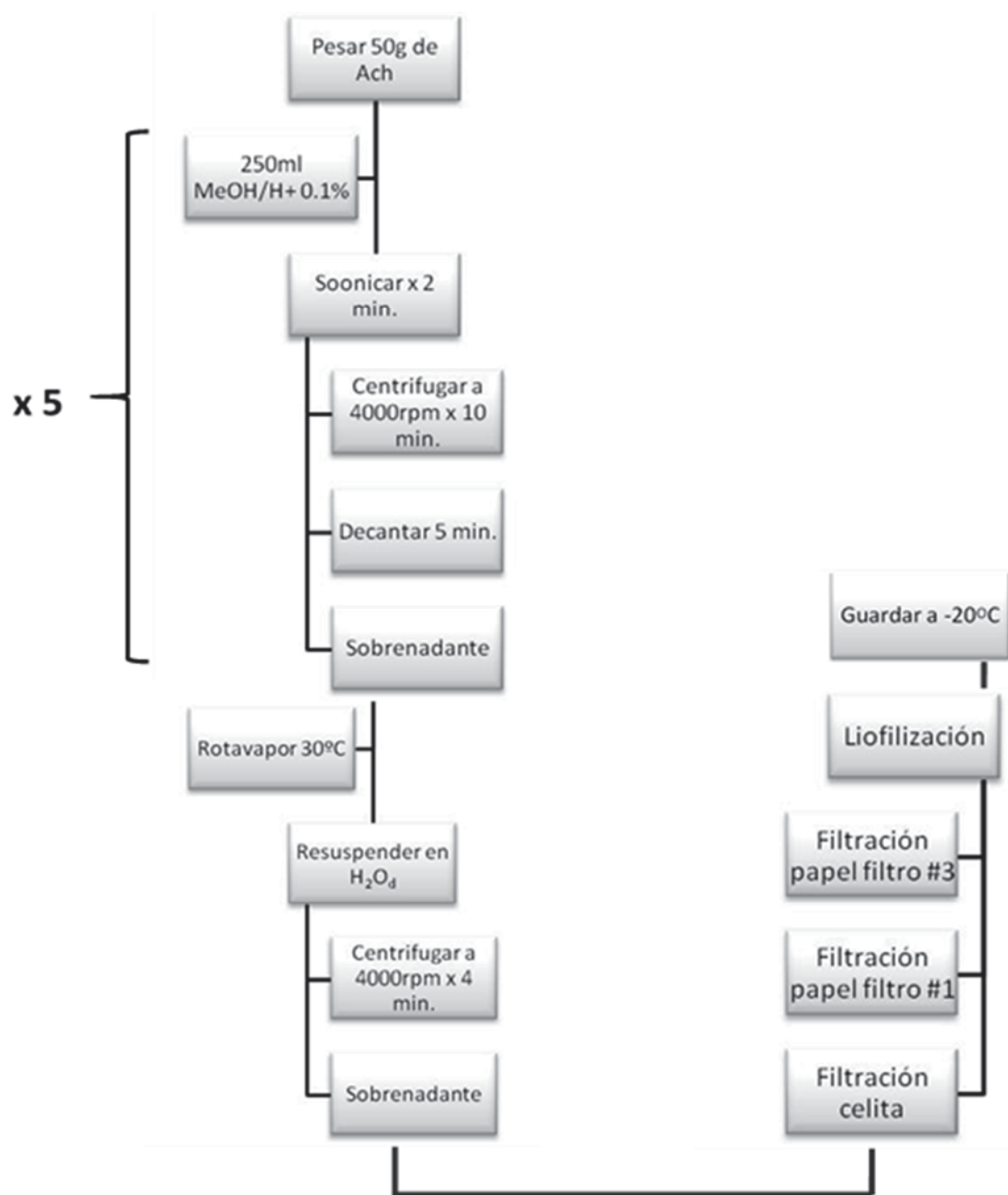


Fig. 1

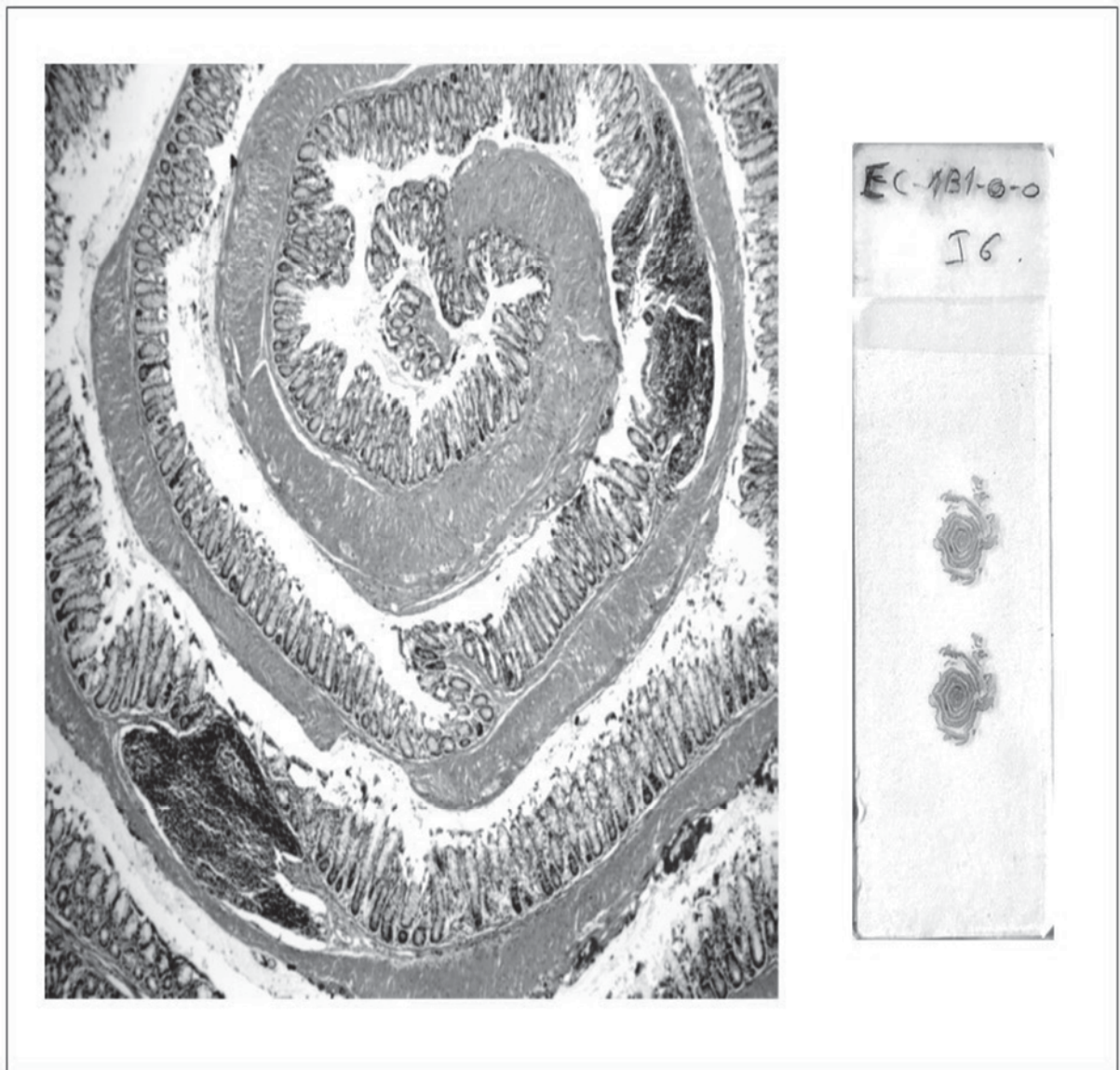


Fig. 2

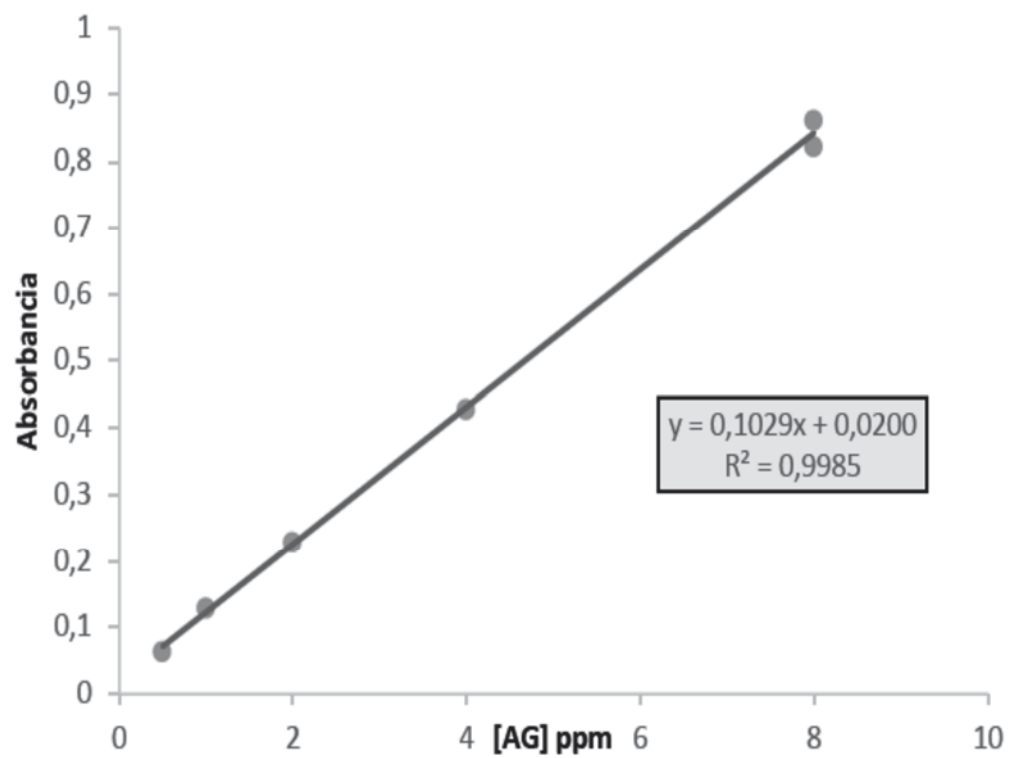


Fig. 3

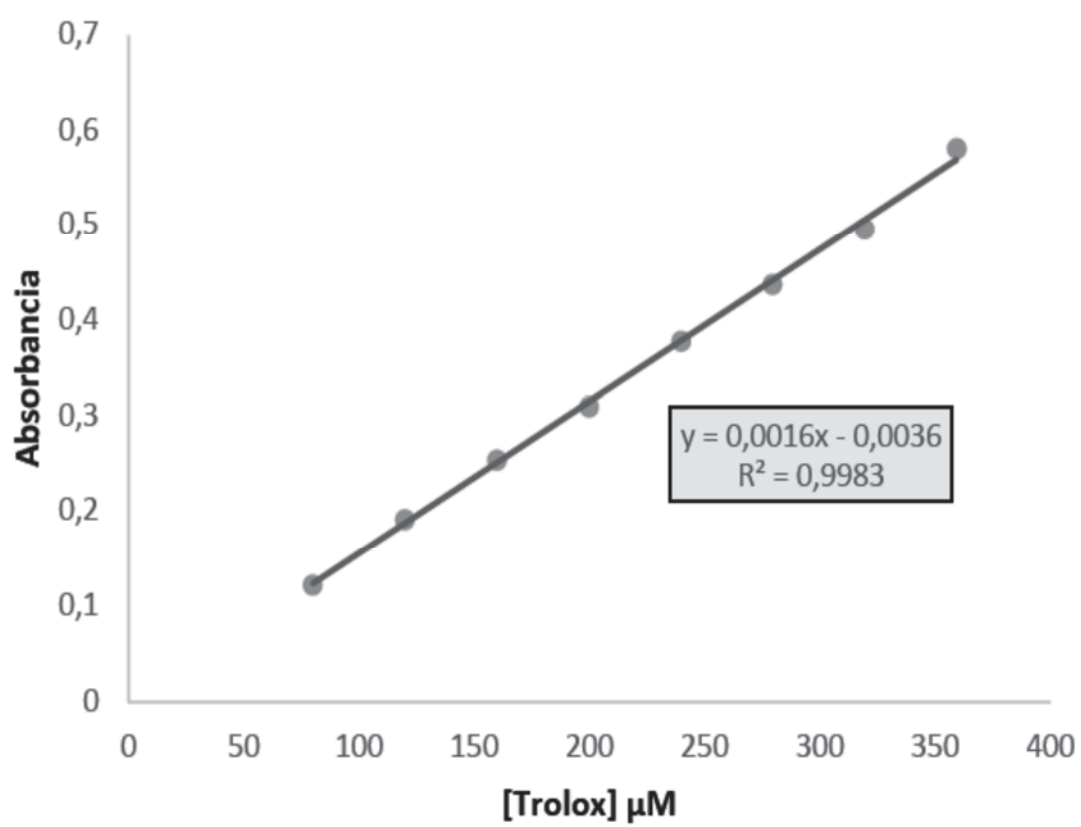


Fig. 4

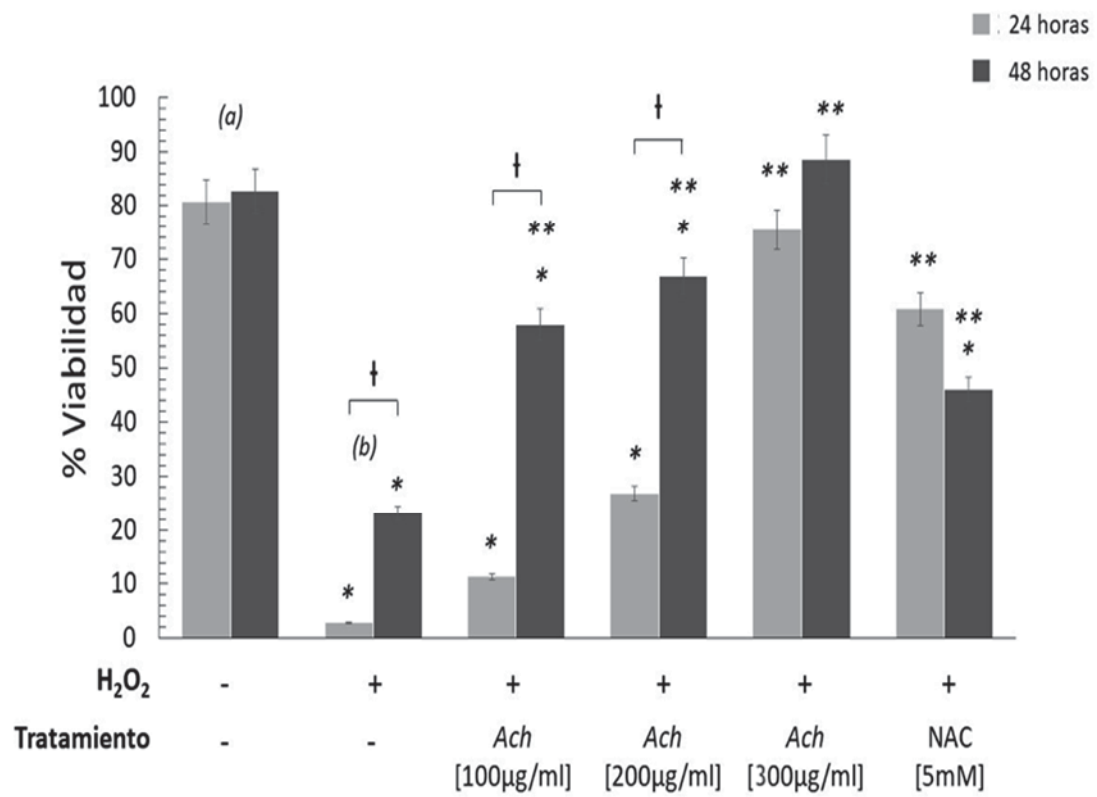


Fig. 5

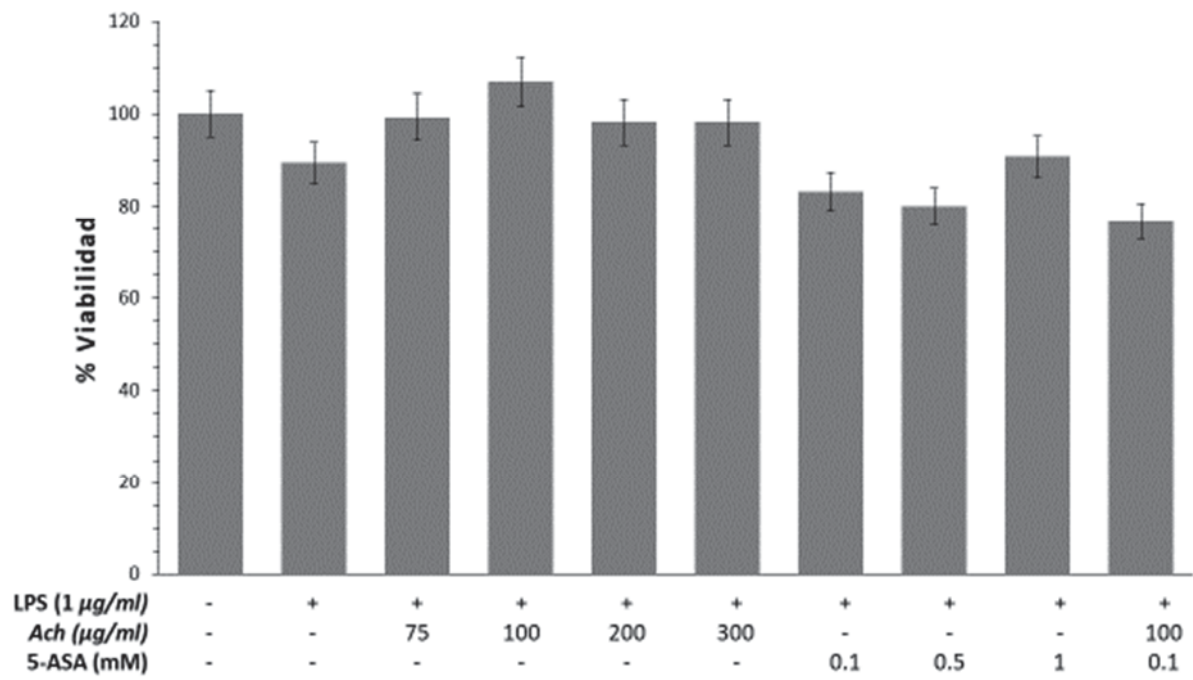


Fig. 6

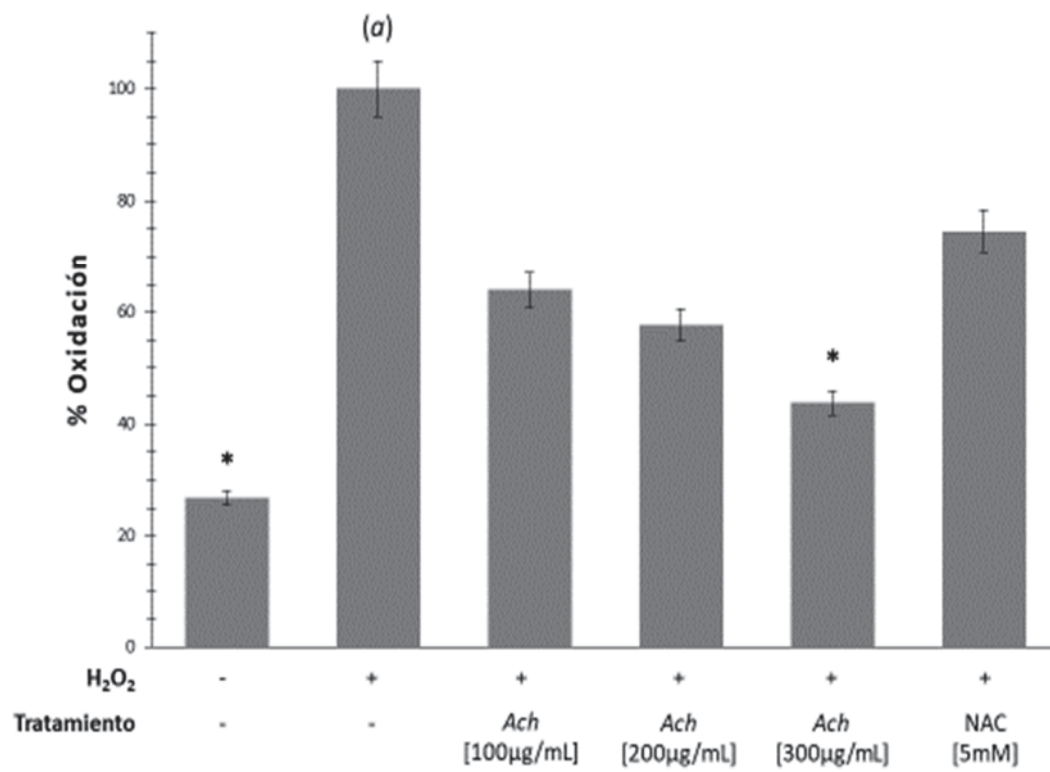


Fig. 7

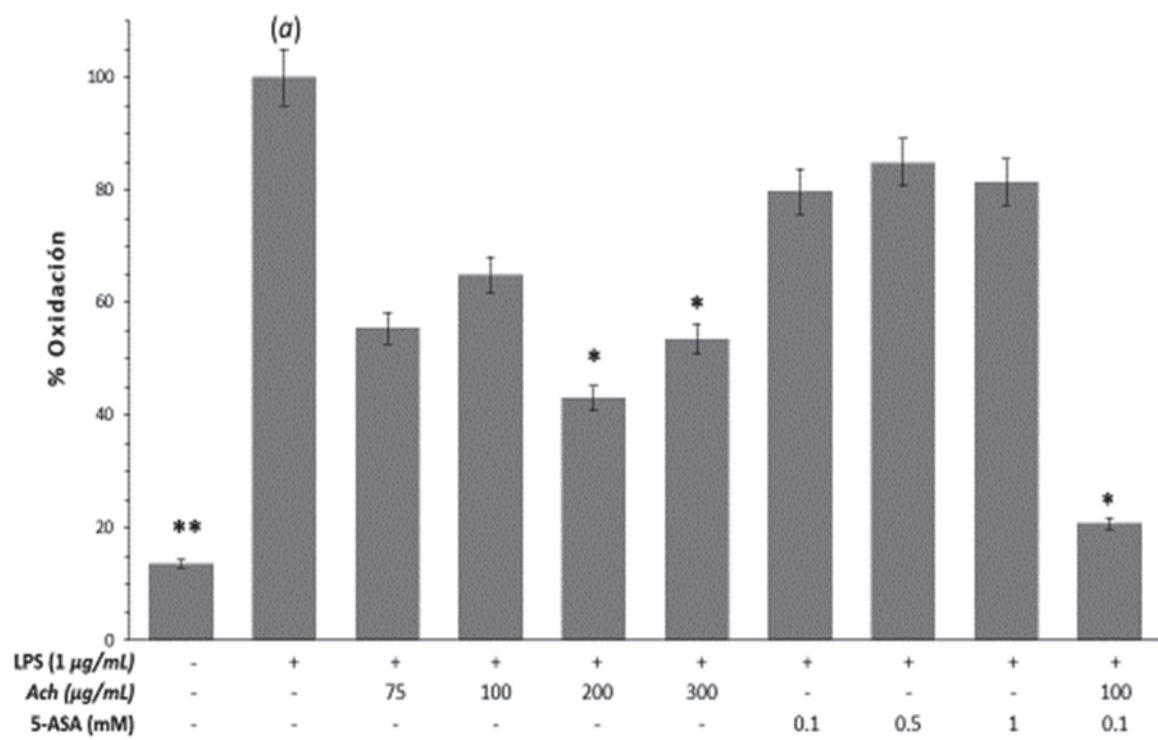
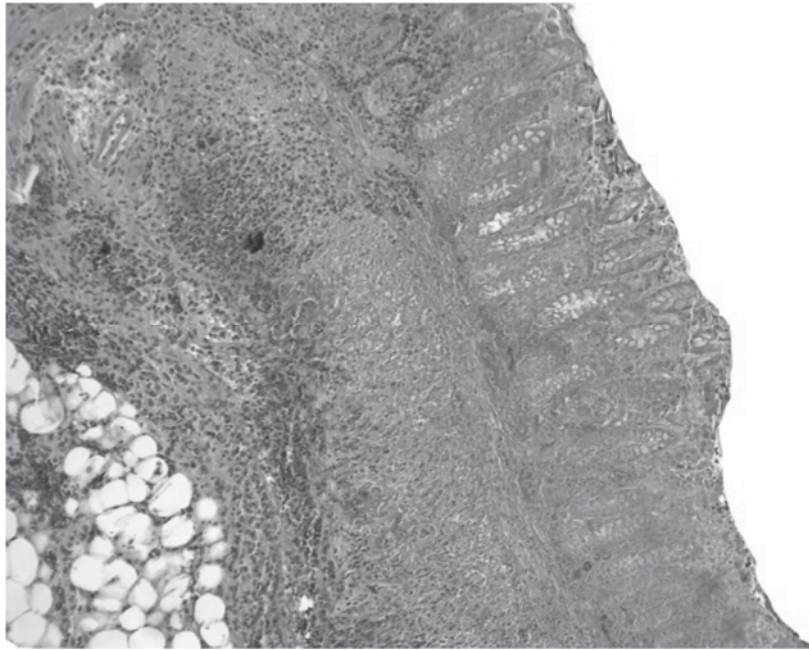


Fig. 8



B

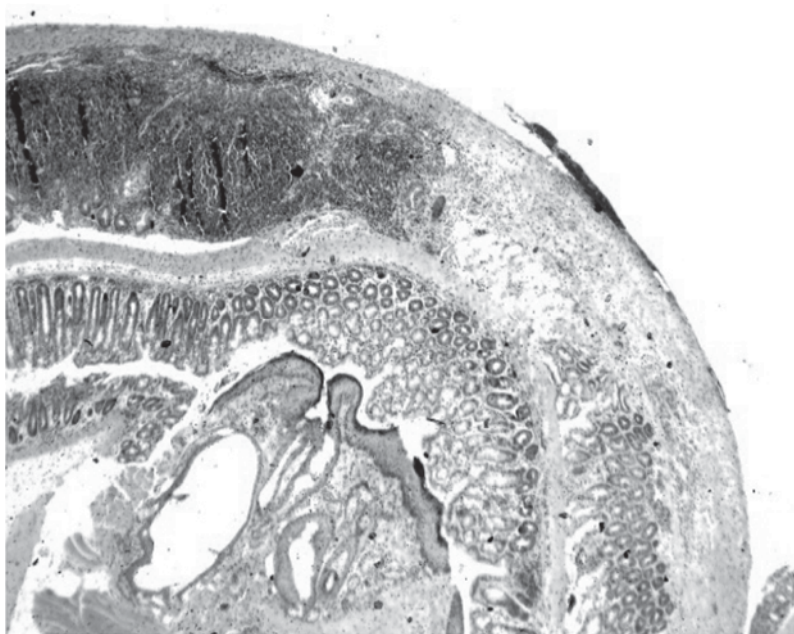
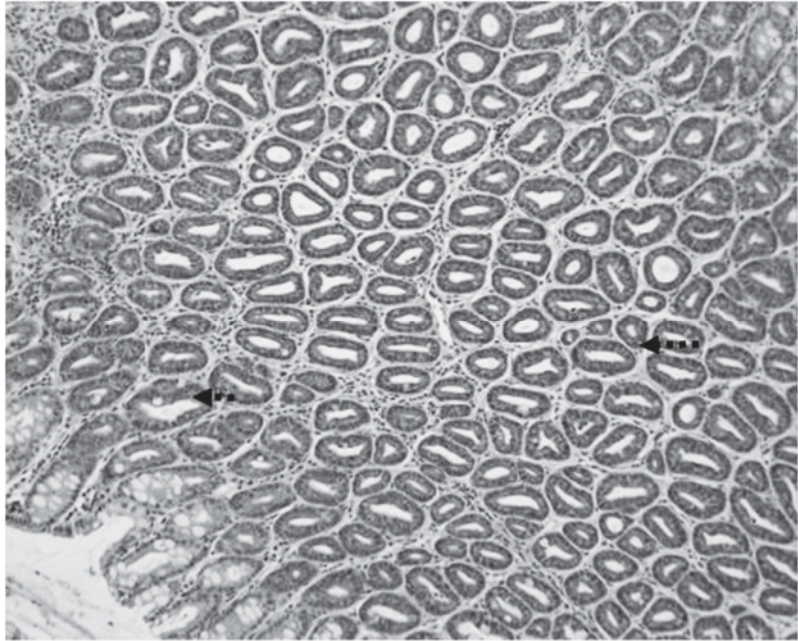


Fig. 9

C



D

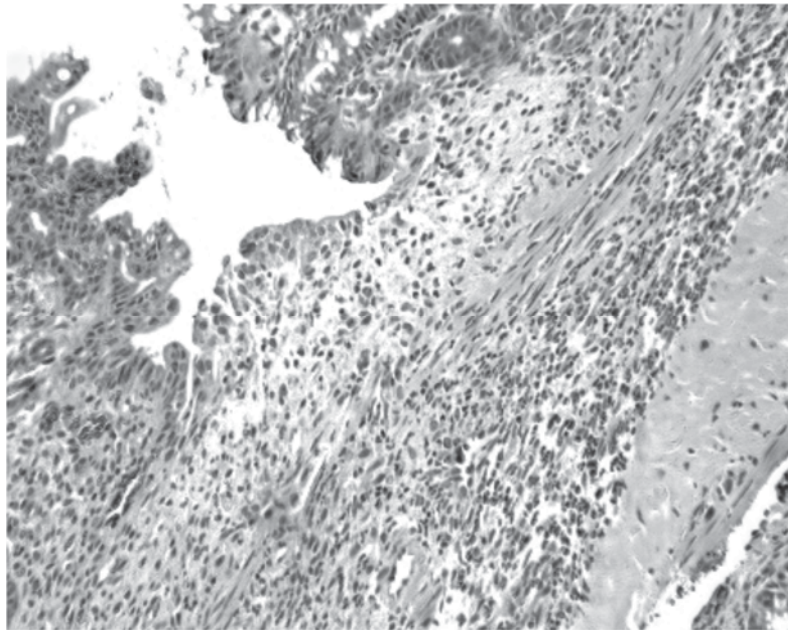


Fig. 9 (Continuación)

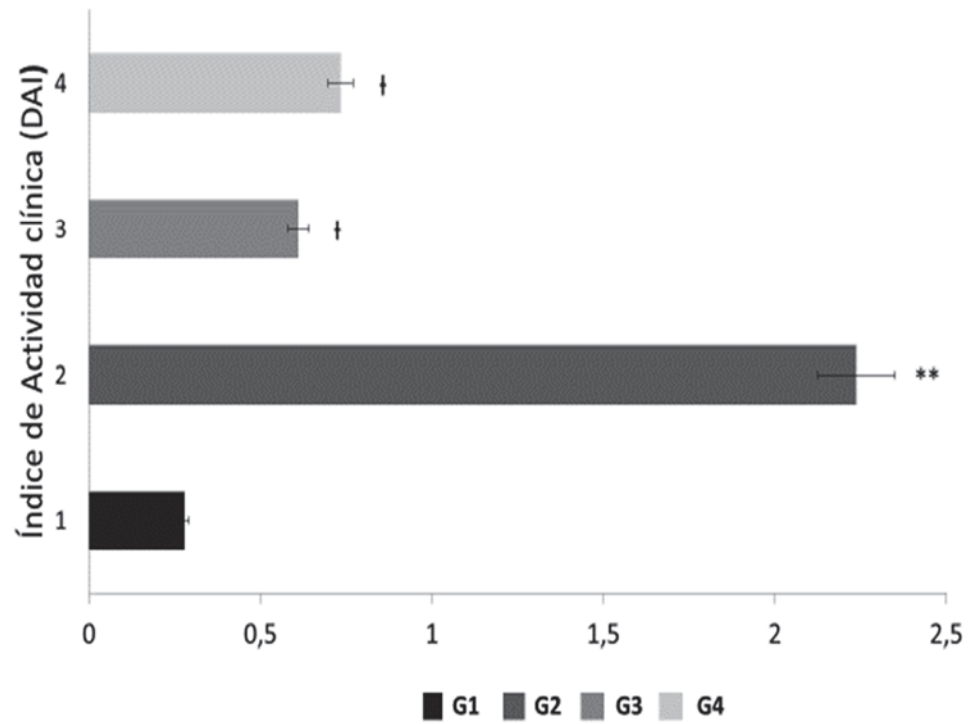


Fig. 10

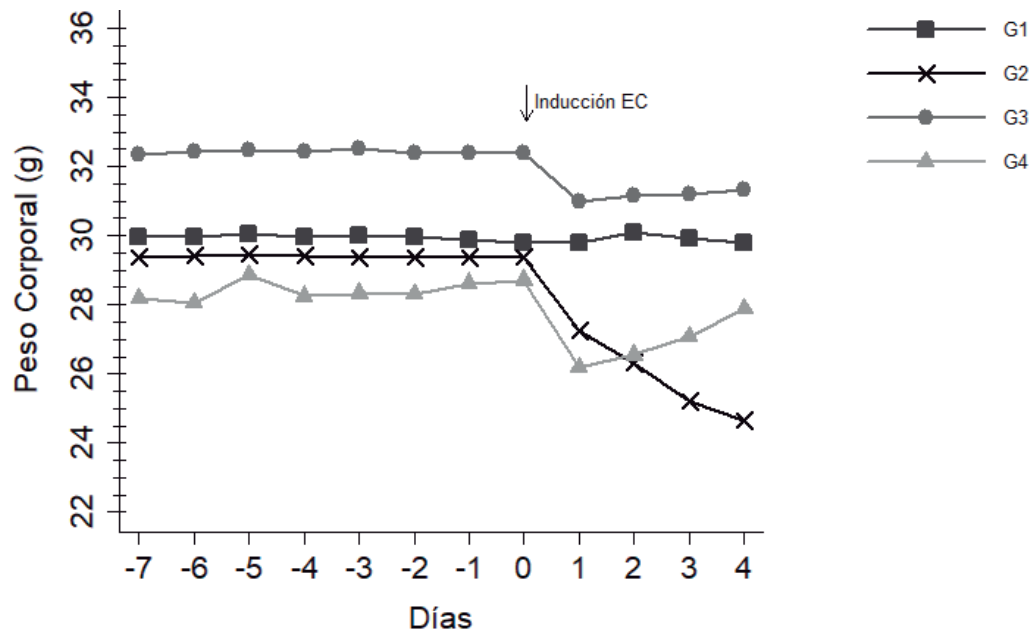


Fig. 11

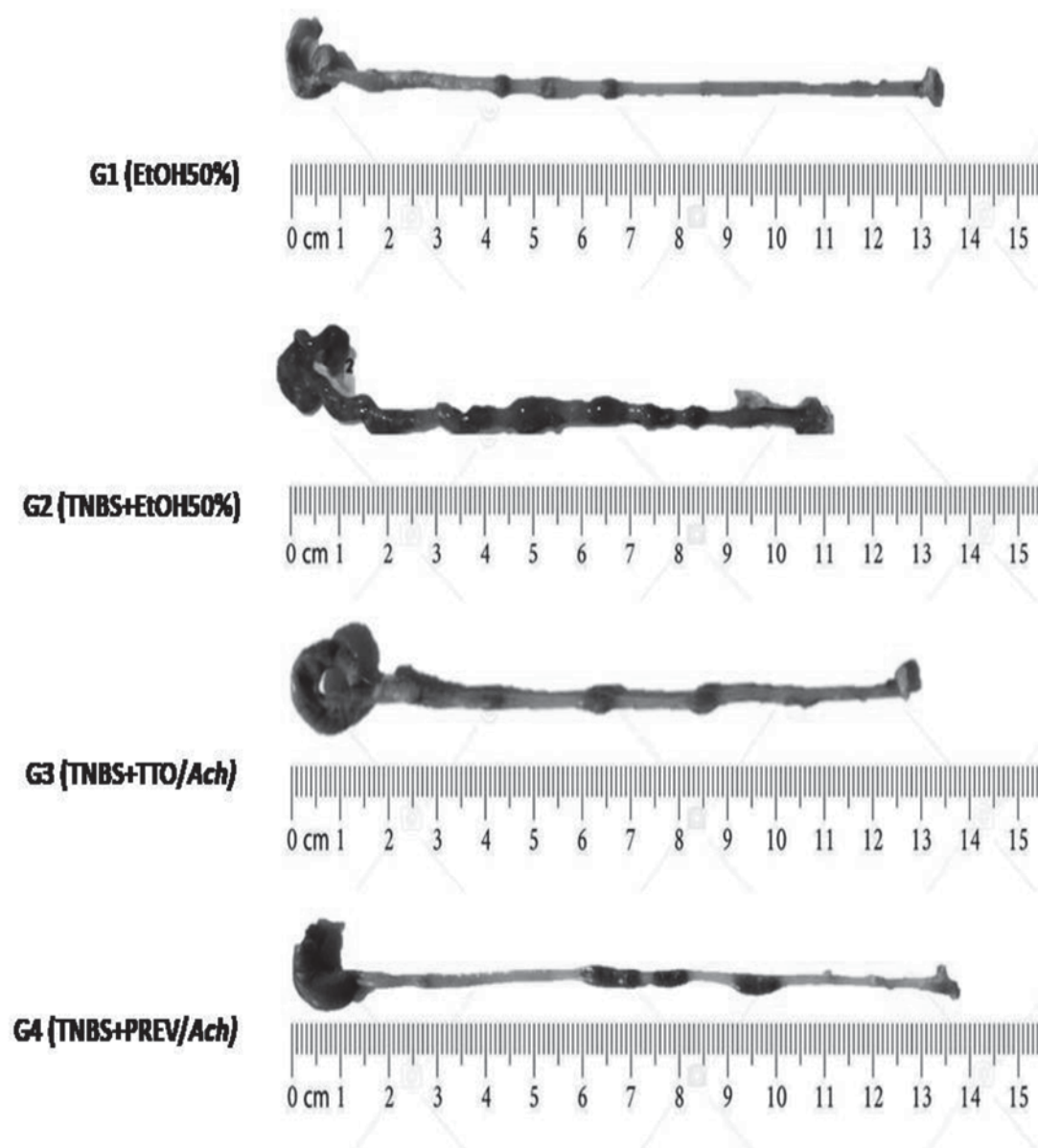


Fig. 12

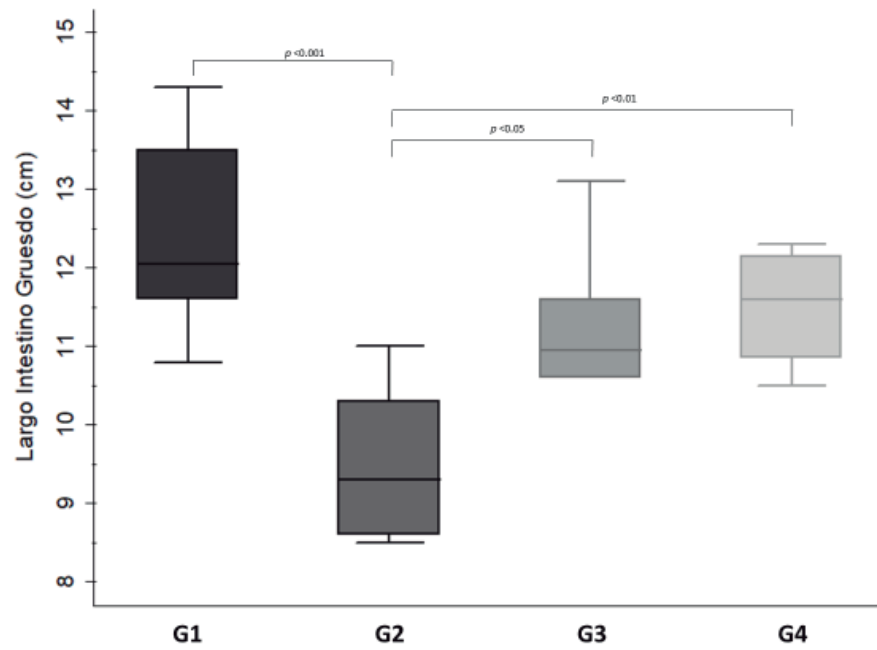


Fig. 13

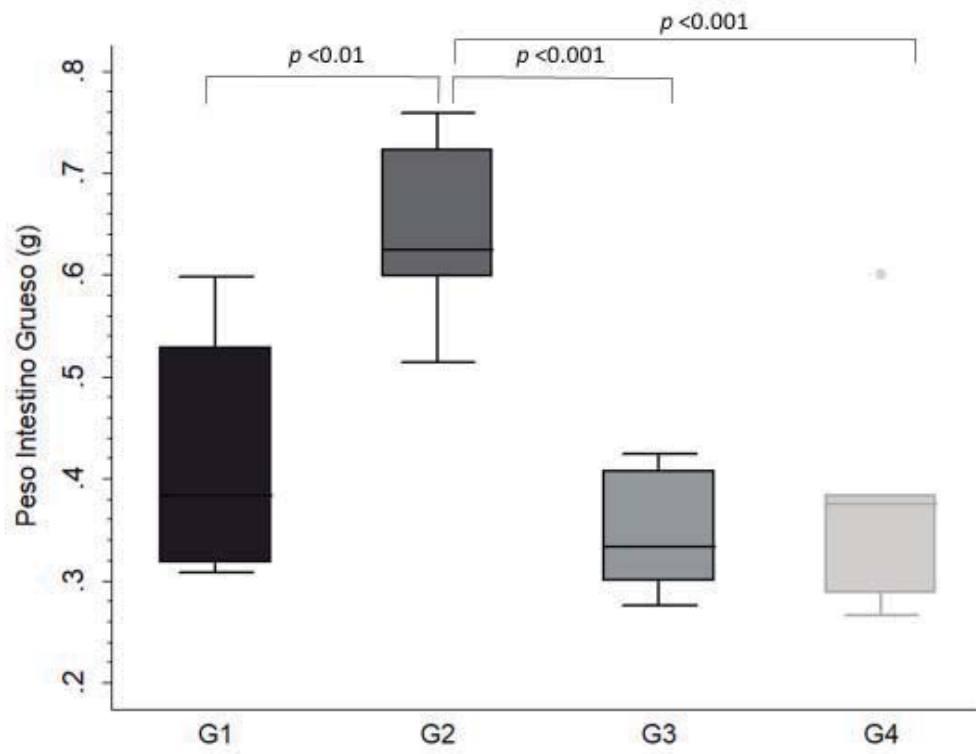


Fig. 14

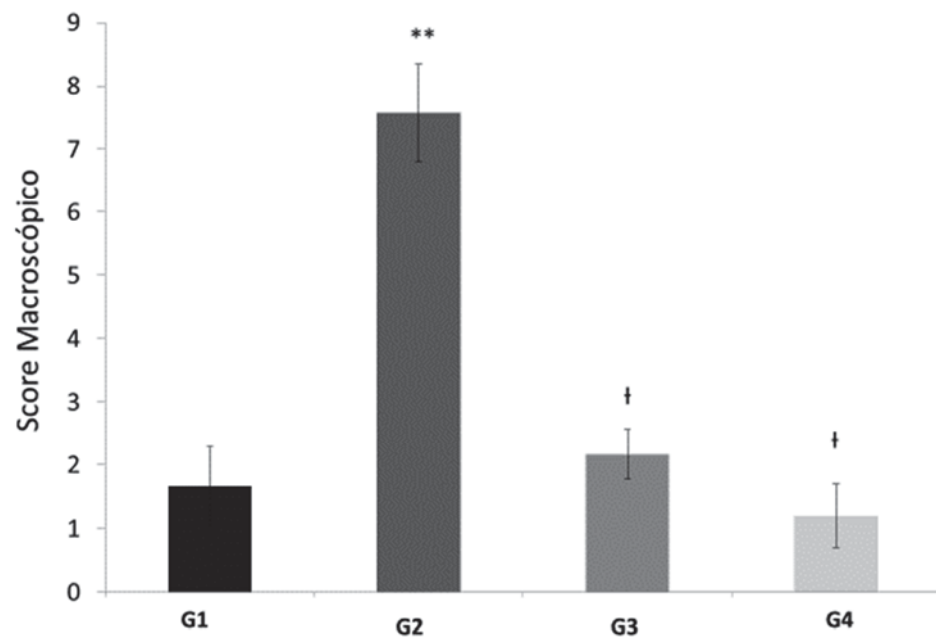


Fig. 15

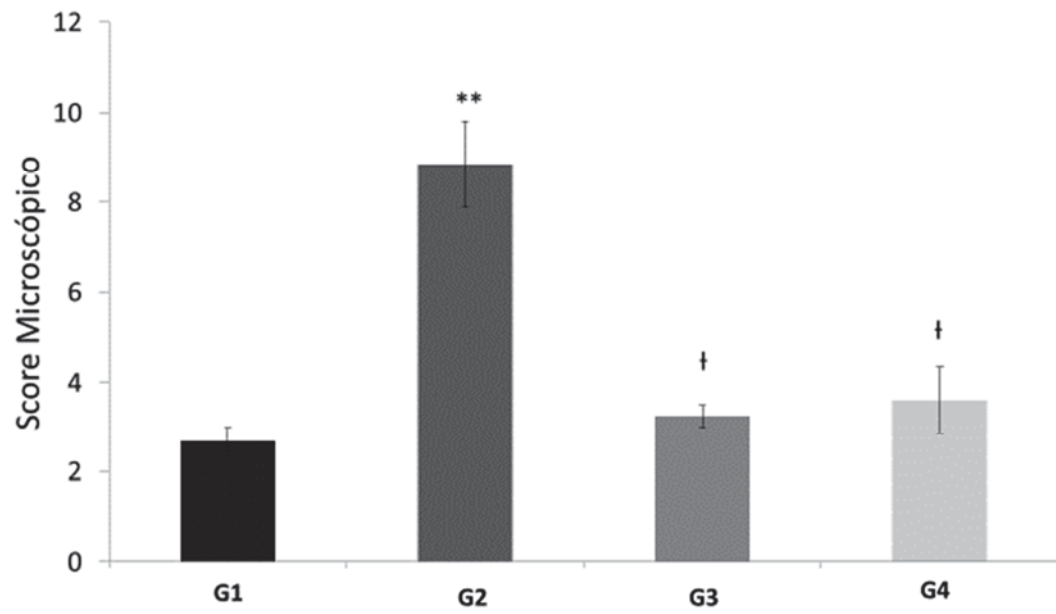
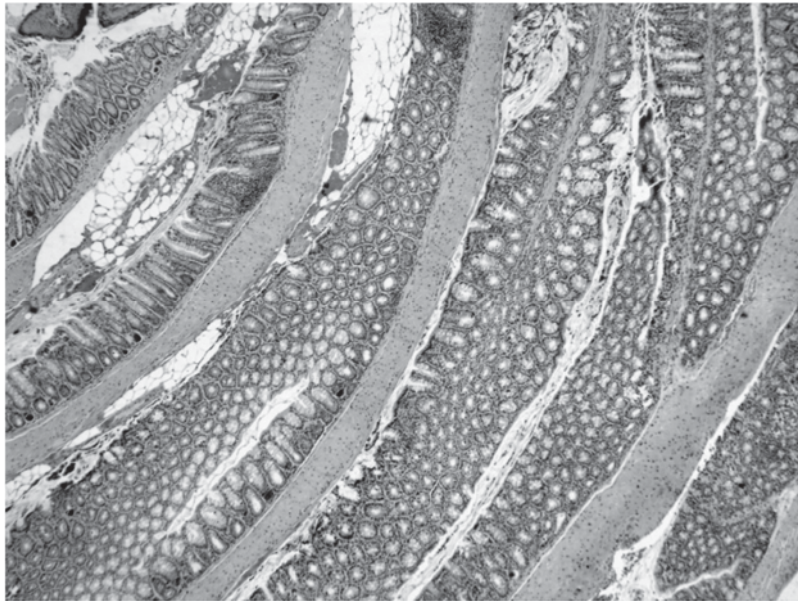


Fig. 16

A



B

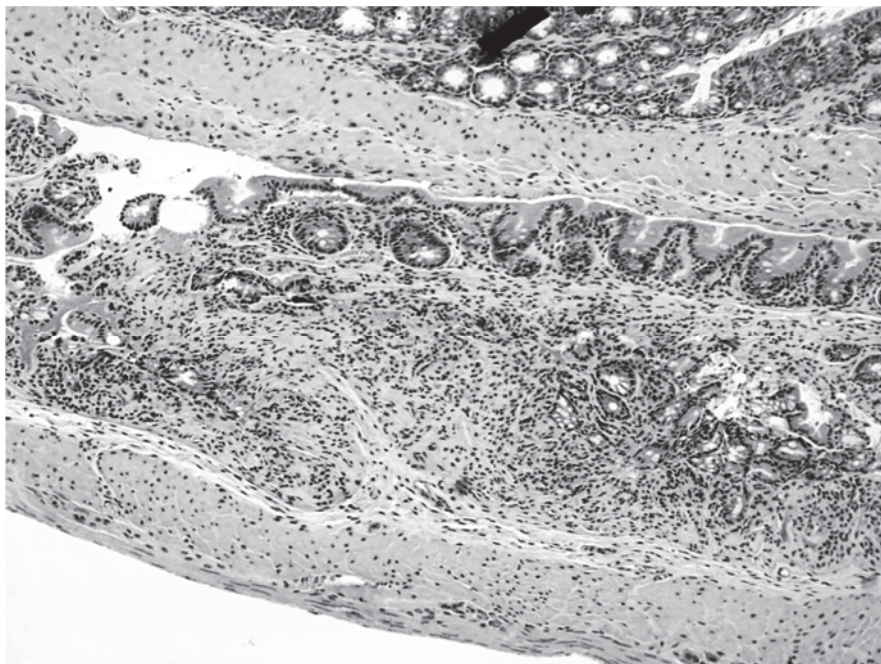


Fig. 17

C

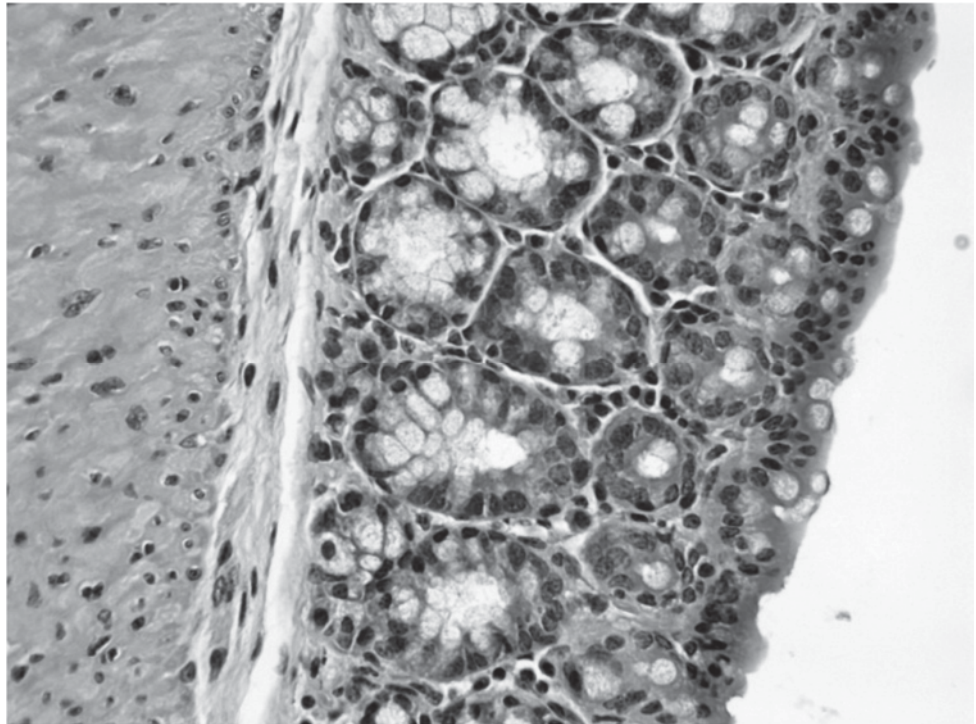
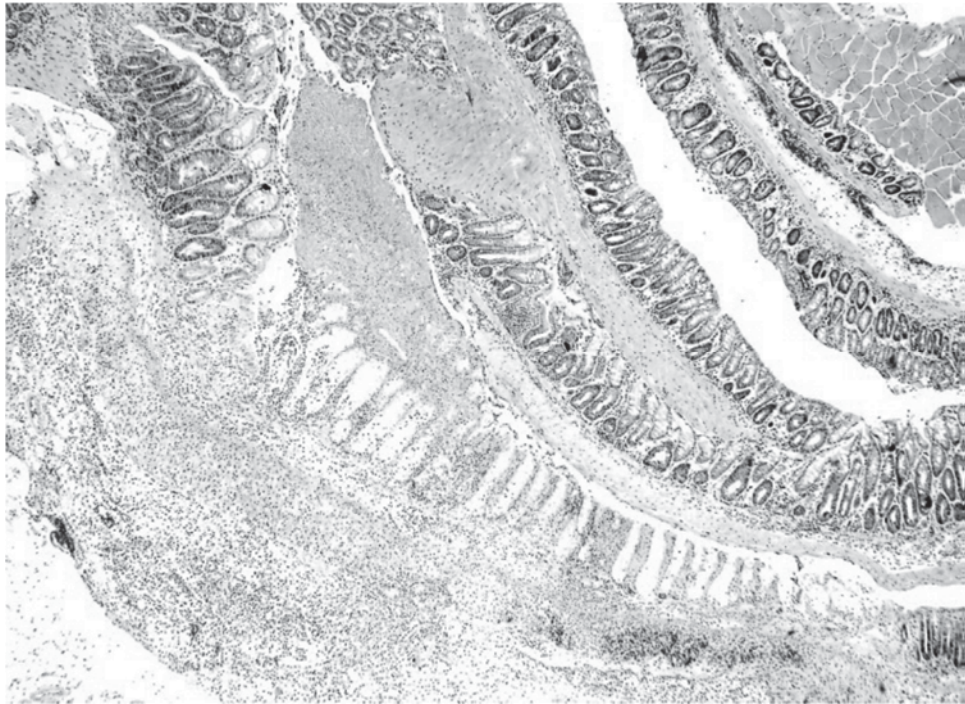


Fig. 17 (continuación)

A



B

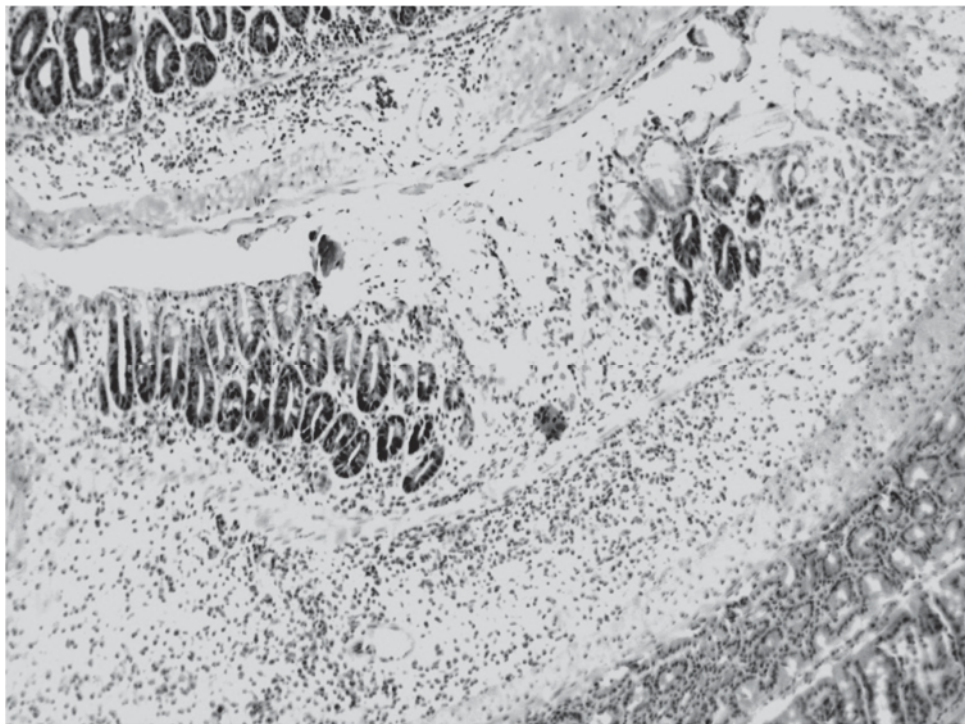


Fig. 18

C

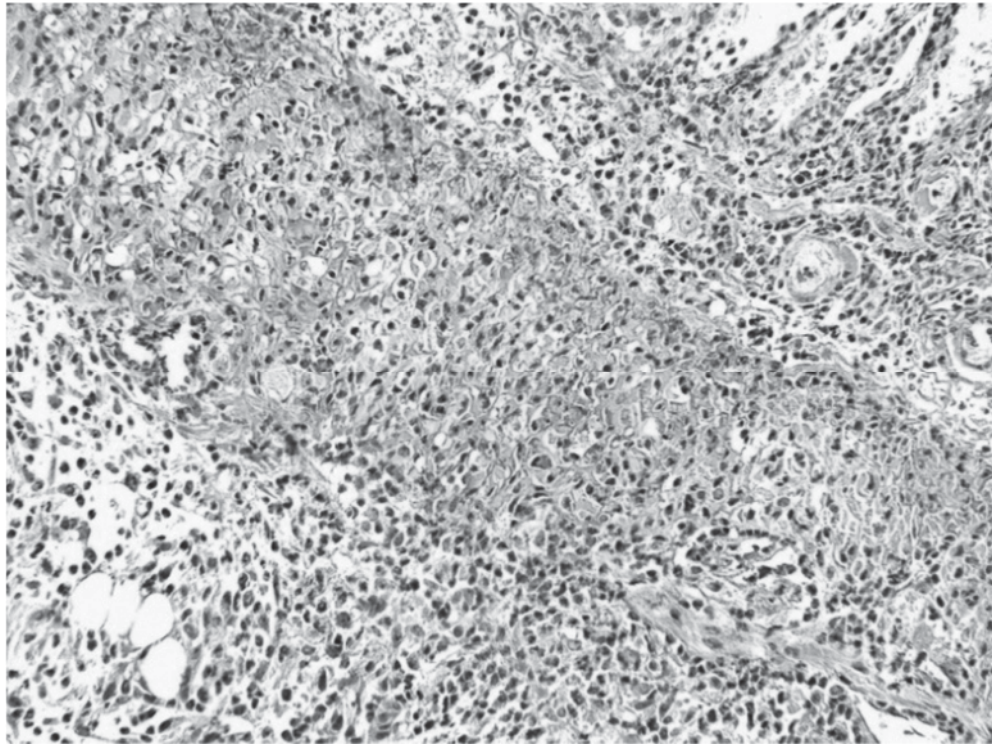
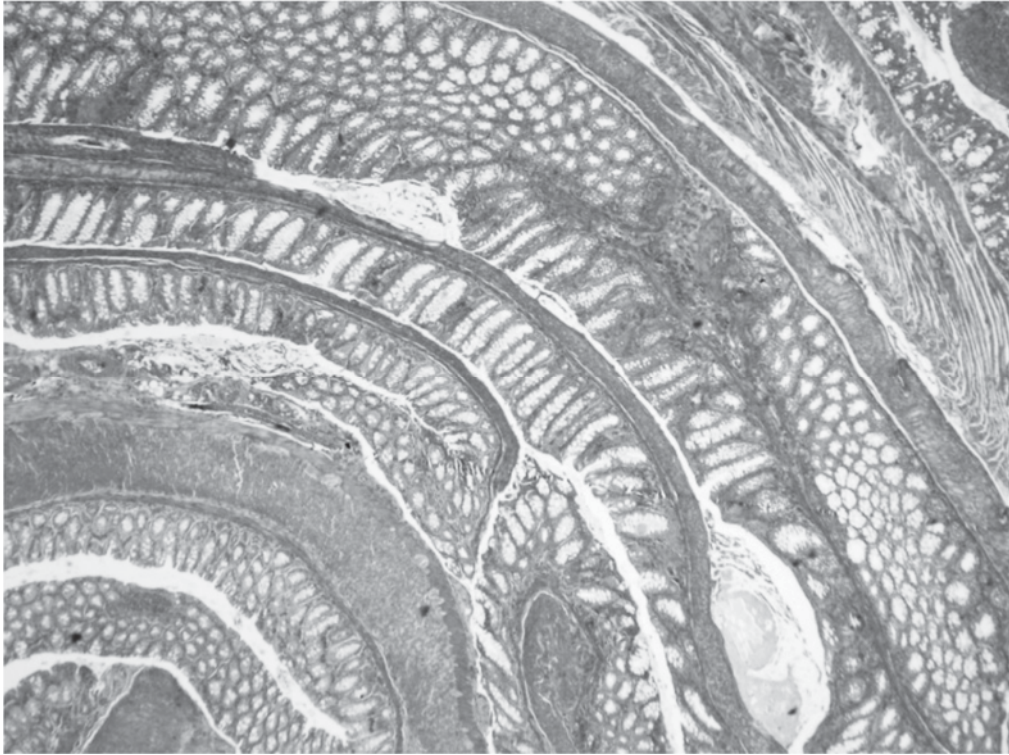


Fig. 18 (continuación)

A



B

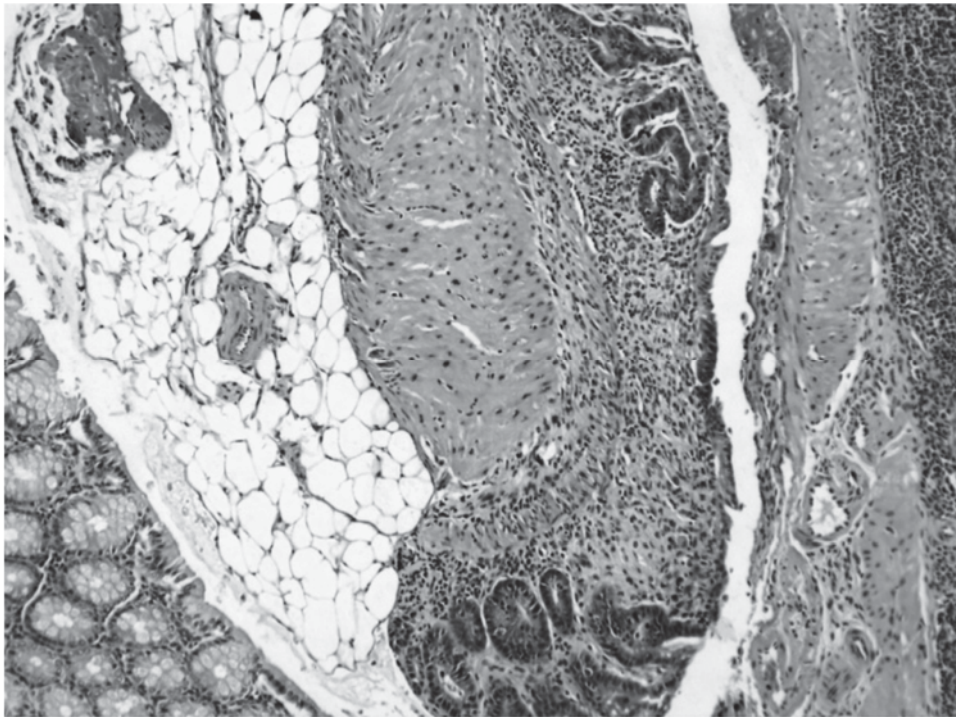


Fig. 19
66

C

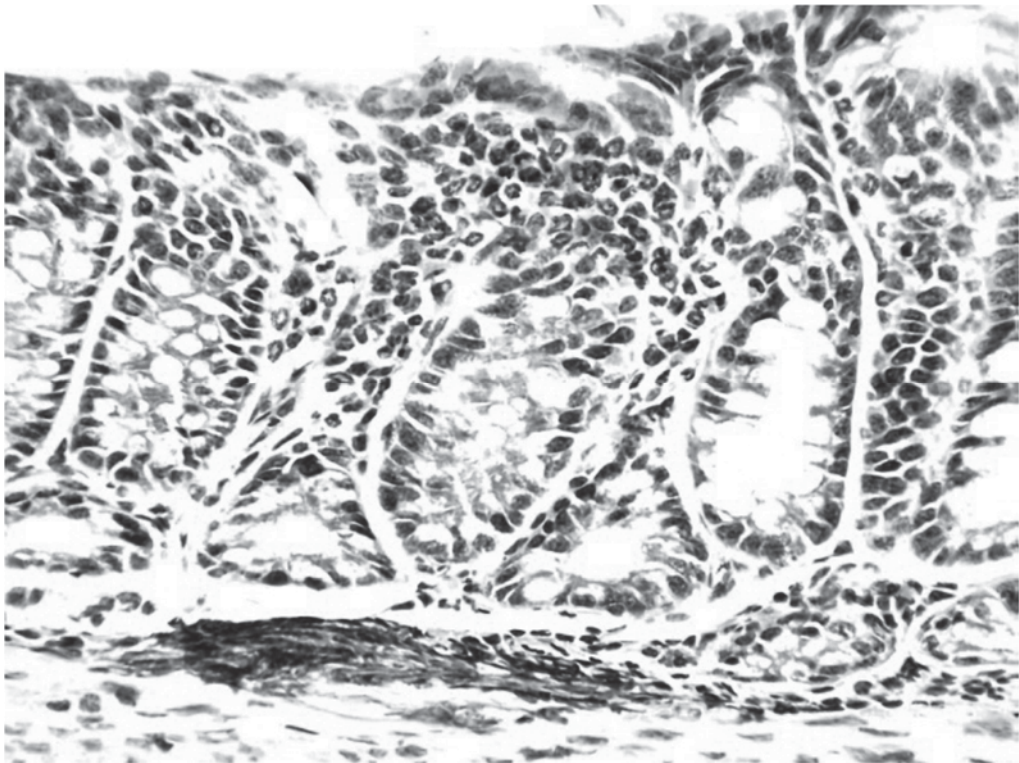
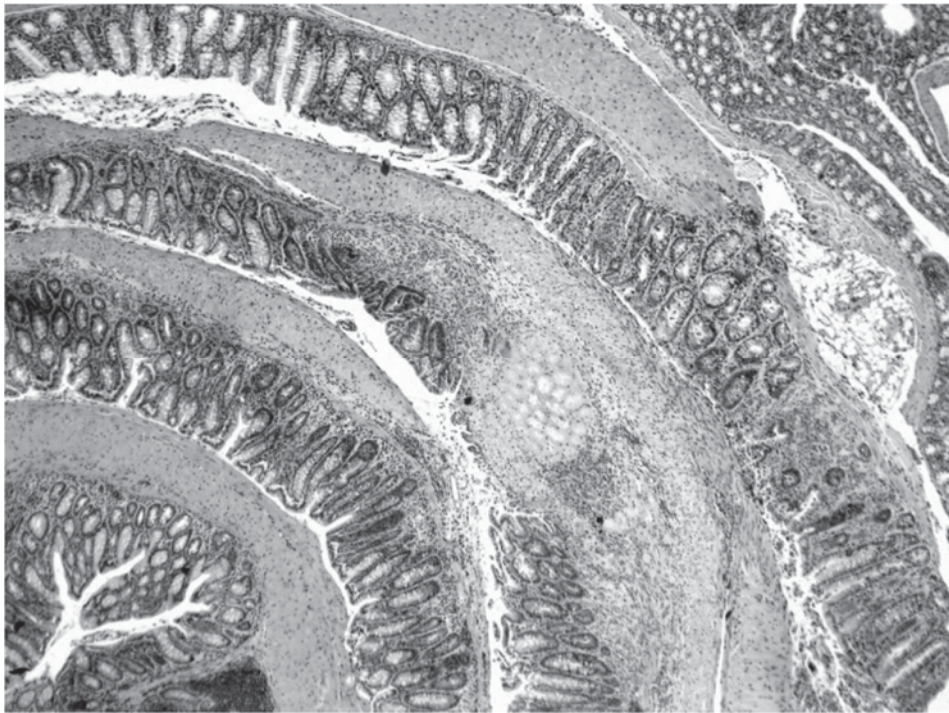


Fig. 19 (continuación)

A



B

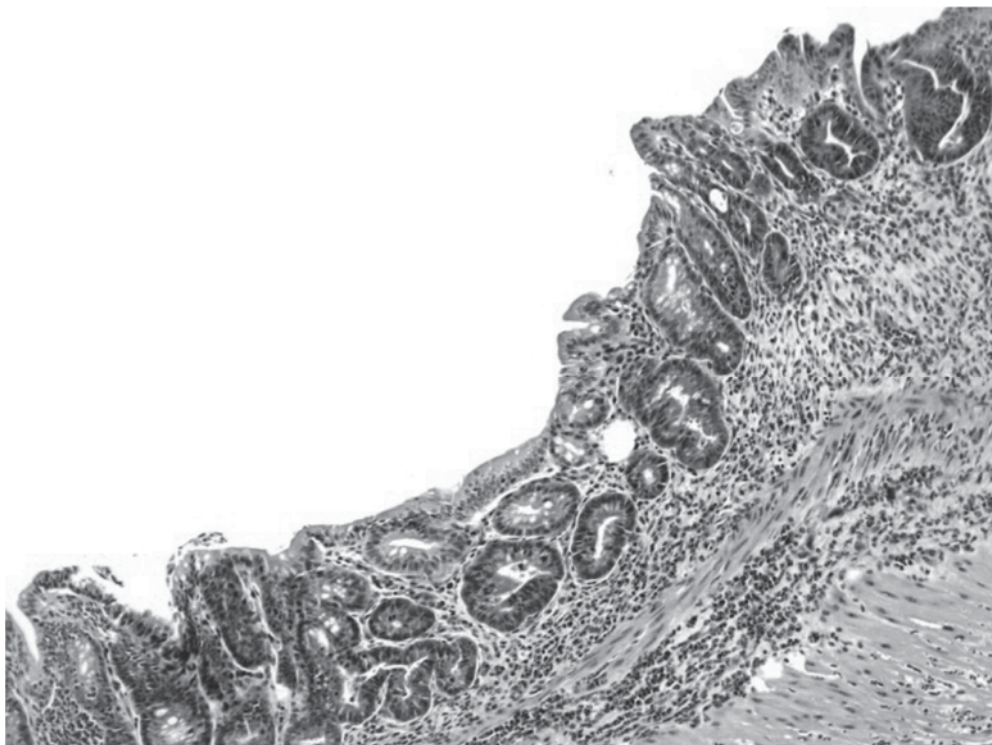


Fig. 20

C

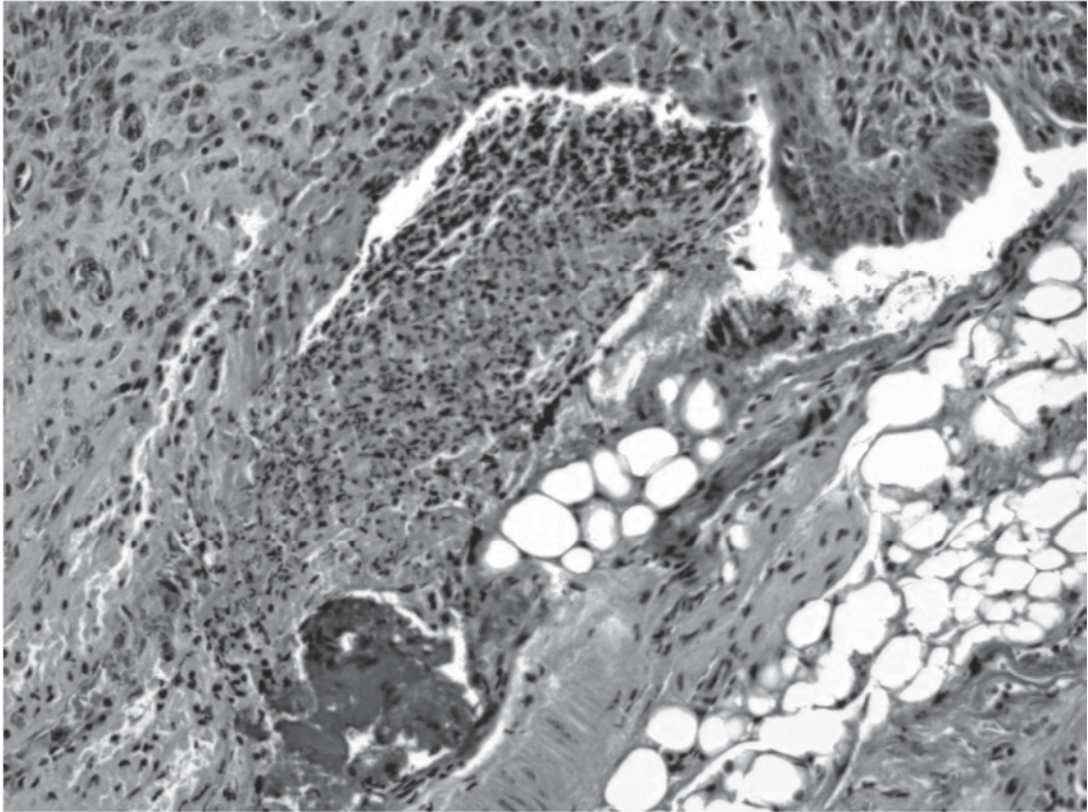


Fig. 20 (continuación)

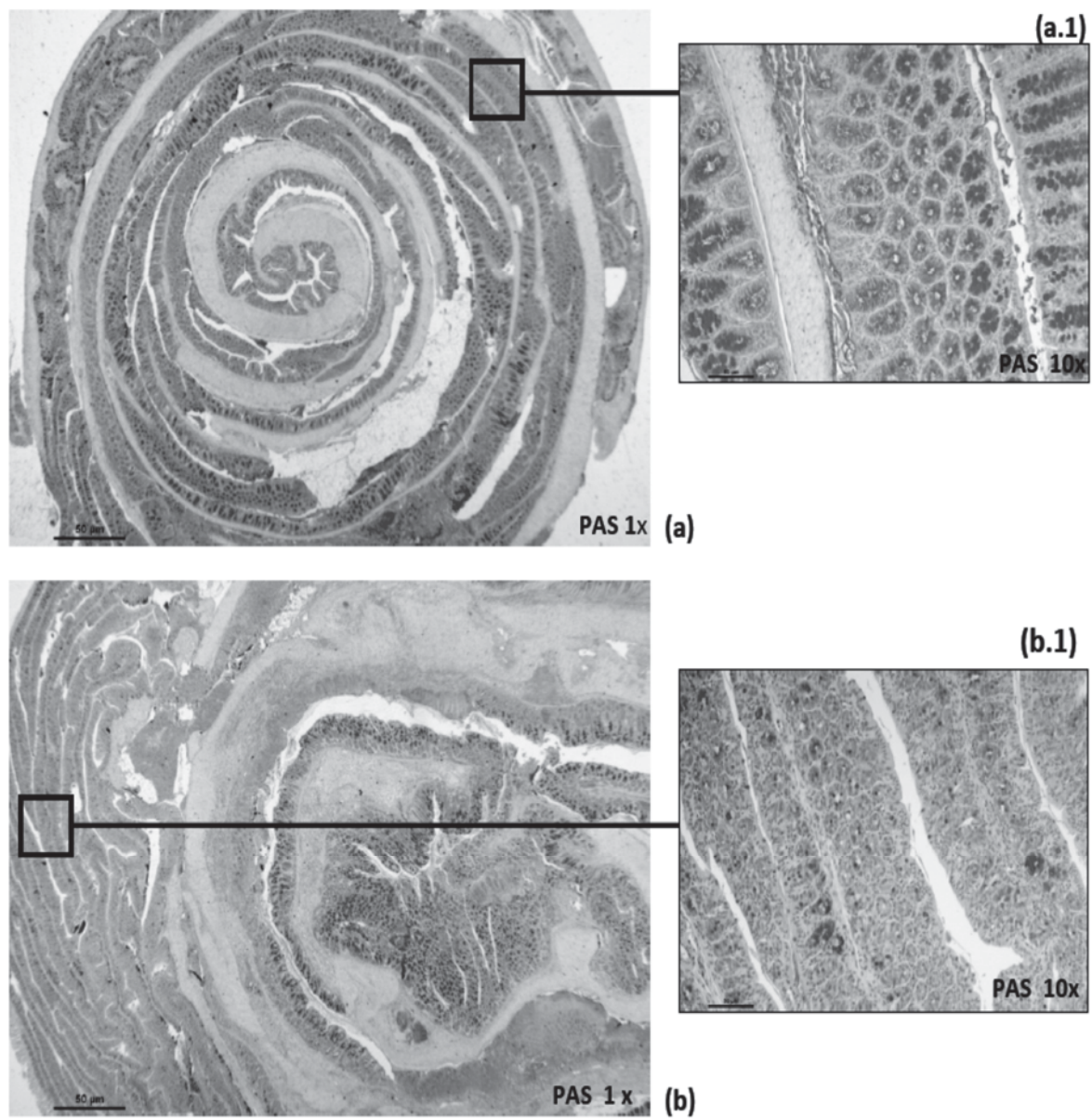


Fig. 21

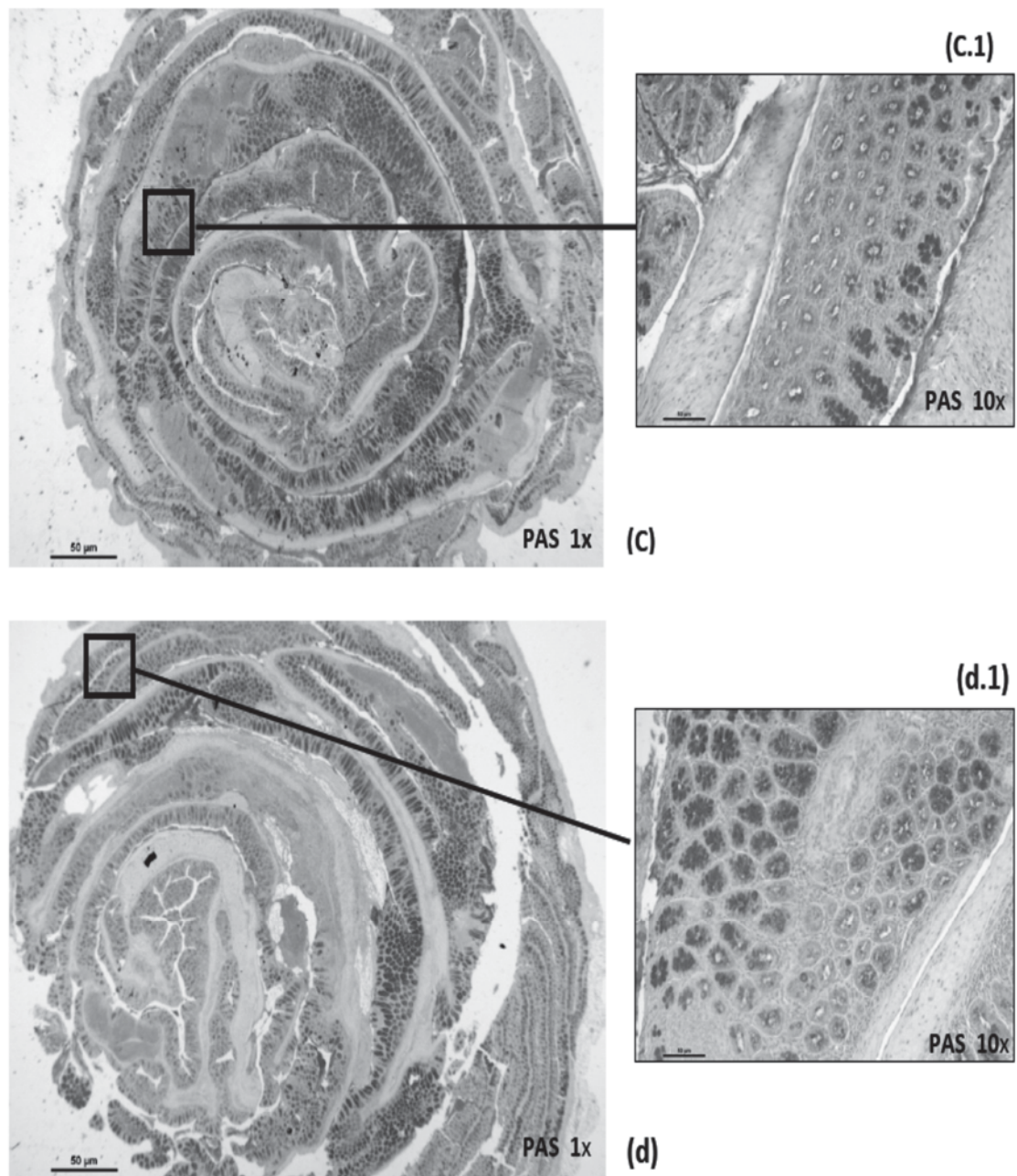
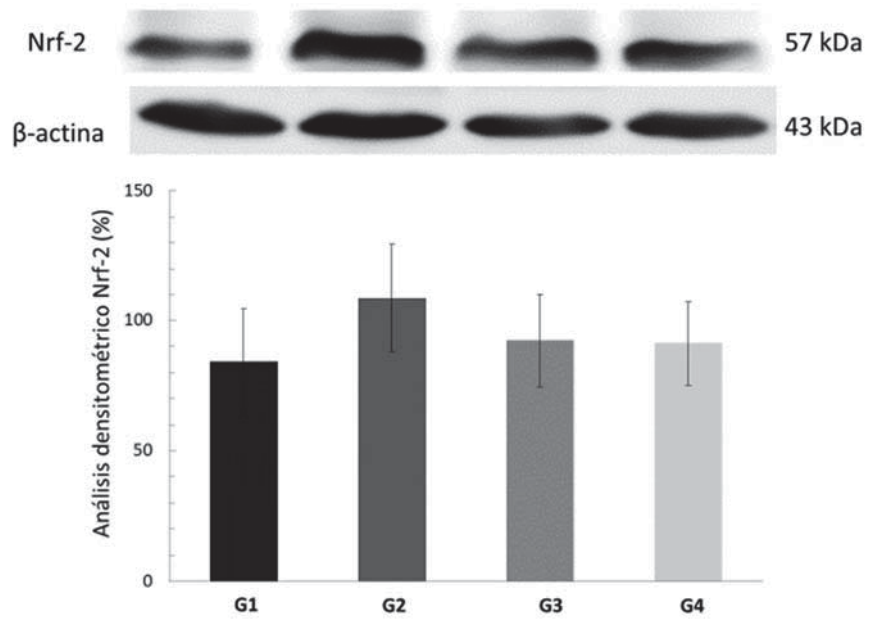


Fig. 21 (continuación)

A



B

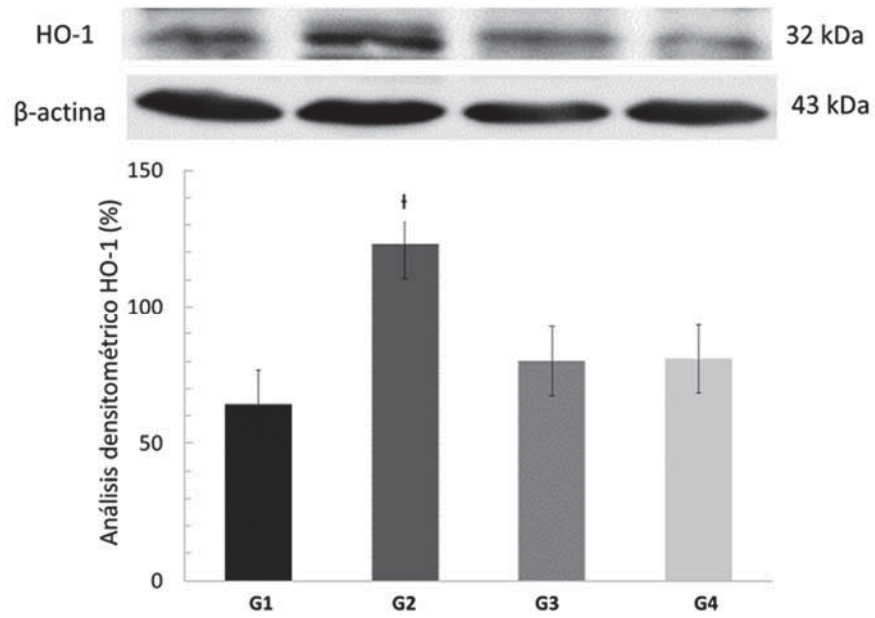
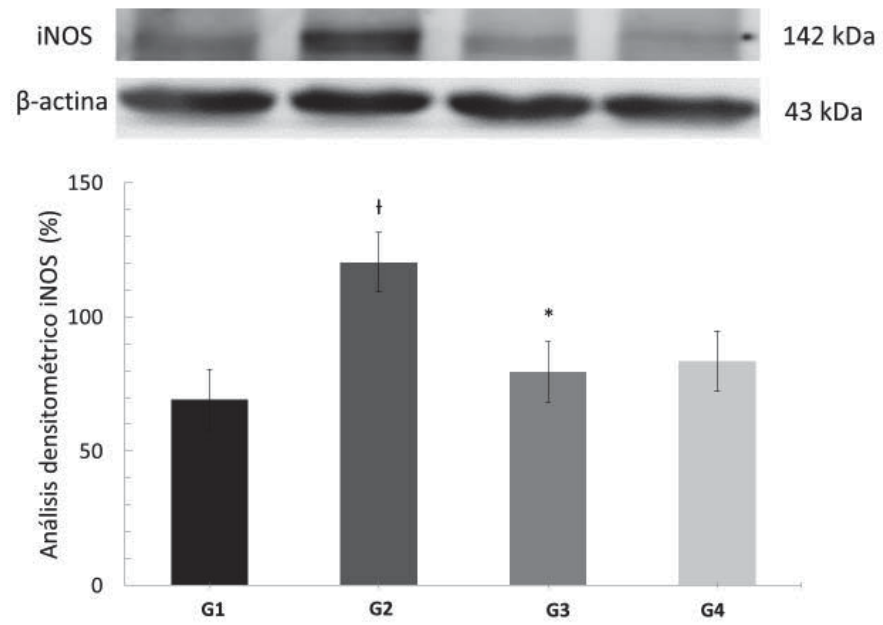


Fig. 22

A



B

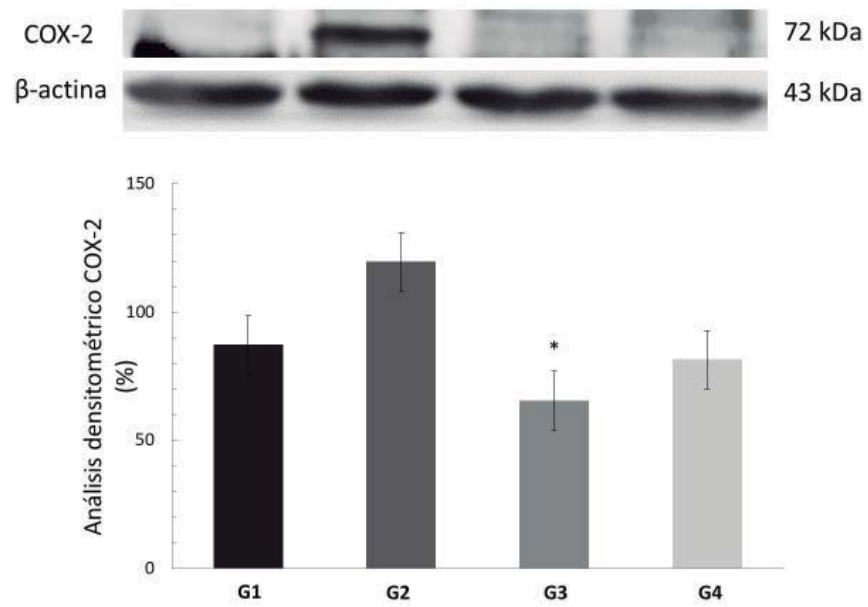
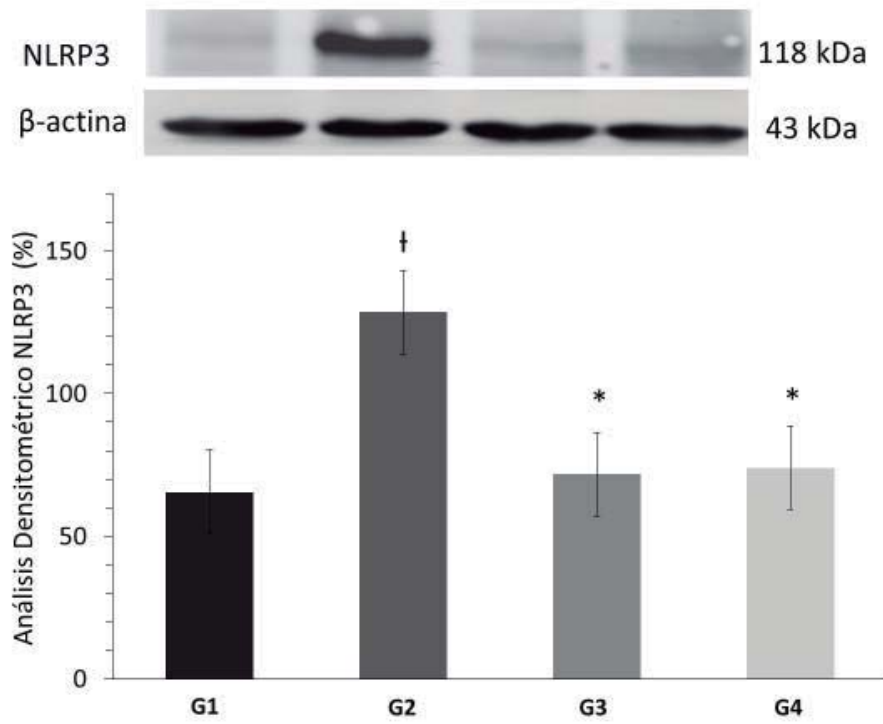


Fig. 23

A



B

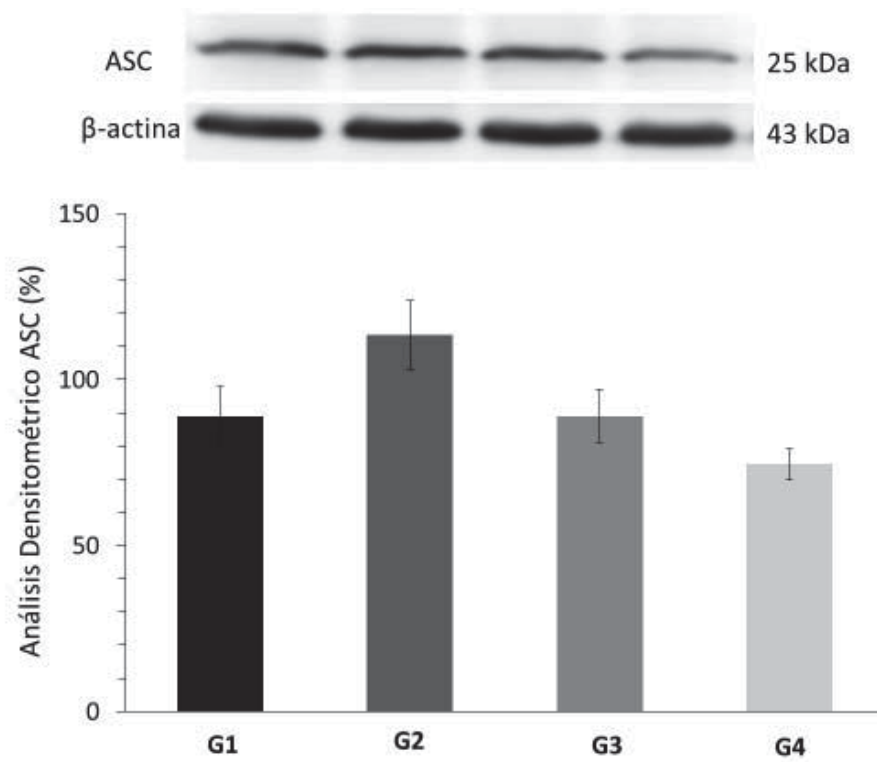


Fig. 24

C

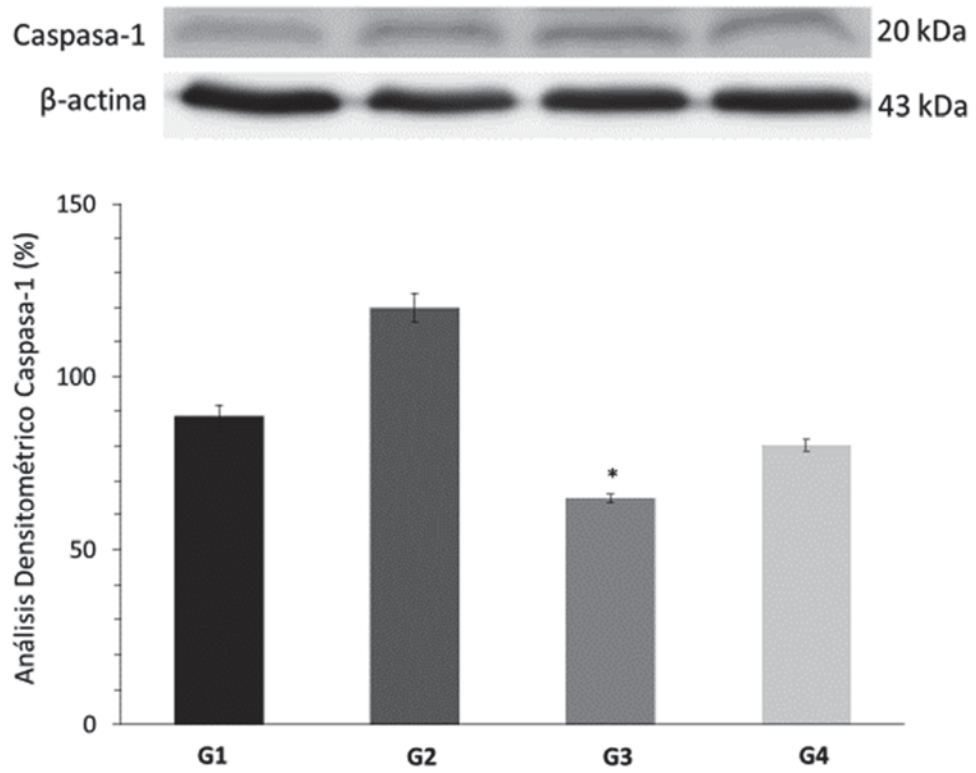


Fig. 24 (continuación)

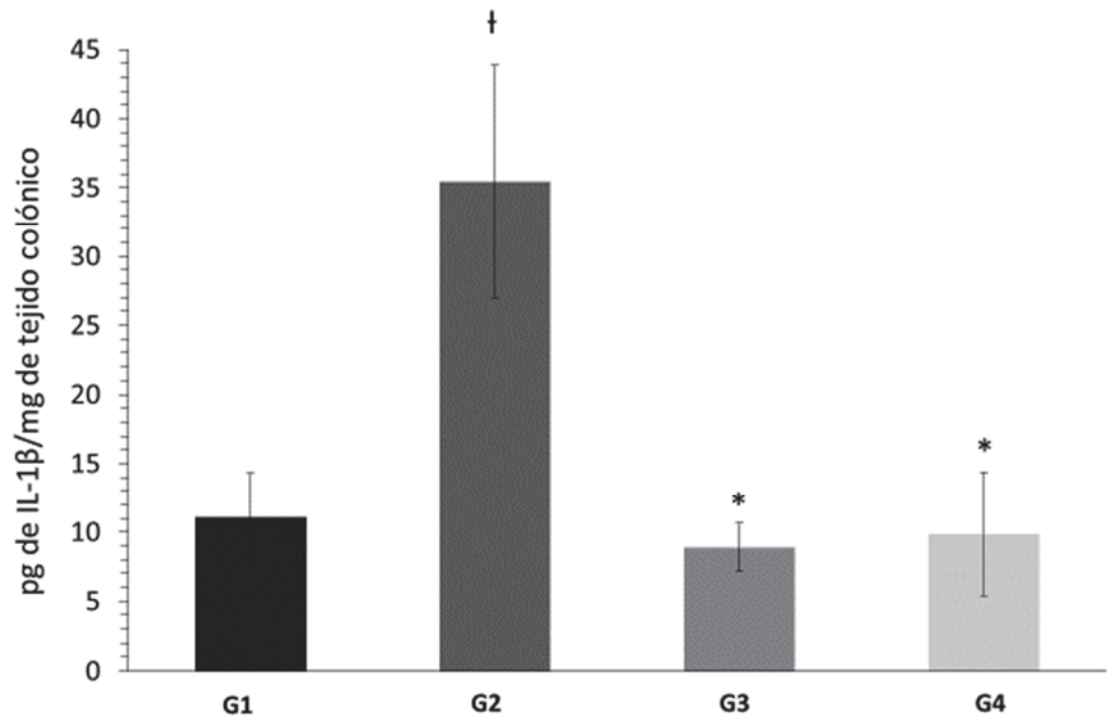


Fig. 25



- ②① N.º solicitud: 202030325
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.04.2020
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K36/185** (2006.01)
A61P1/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ORTIZ CERDA, T.A. Nuevas terapias bioactivas preventivas y terapéuticas en un modelo animal de enfermedad de Crohn. (Tesis Doctoral Inédita). 20/12/2019. Universidad de Sevilla, Sevilla. Recuperado el 21.04.2021. Recuperado de https://idus.us.es/handle/11441/92586 ,	1-11
A	SOLEDAD MIRANDA-ROTTMANN et al. Juice and Phenolic Fractions of the Berry <i>Aristotelia chilensis</i> Inhibit LDL Oxidation in Vitro and Protect Human Endothelial Cells against Oxidative Stress. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2002, 50, 7542-7547, resumen	1-11
A	Genskowsky, E, et al. Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui (<i>Aristotelia chilensis</i> (Molina) Stuntz) a Chilean blackberry. <i>J. Sci. Food Agric.</i> 2016, 96, 4235–4242, resumen	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.04.2021

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT, INTERNET