



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Influencia de la ingesta de cacao en la respuesta inflamatoria aguda y crónica inducida en rata

Sara Ramos Romero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



**Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia**

**Programa de doctorado:
NUTRICIÓN Y METABOLISMO
Bienio 2006-2008**

INFLUENCIA DE LA INGESTA DE CACAO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA Y CRÓNICA INDUCIDA EN RATA

**Memoria presentada por Sara Ramos Romero
para optar al título de Doctor con mención europea por la Universitat de Barcelona**

Directoras: Dra. Àngels Franch Masferrer y Dra. Margarida Castell Escuer

**SARA RAMOS ROMERO
Barcelona, 2011**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Grup d'Autoimmunitat i Tolerància
Departament de Fisiologia

Facultat de Farmàcia
Edifici B, 3a planta
08028 Barcelona
Tel. 93 402 45 05
Fax 93 403 59 01

Margarida Castell Escuer, catedràtica, i **Àngels Franch Masferrer**, professora titular, del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN

Que la memòria titulada *Influencia de la ingesta de cacao en la respuesta inflamatoria aguda y crónica inducida en rata* presentada per **SARA RAMOS ROMERO** per optar al Grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la nostra direcció al Departament de Fisiologia, i considerant-la conclosa, autoritzem la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè així consti, signem el present a

Barcelona, 19 de juliol de 2011

Dra. Margarida Castell
Catedràtica de Fisiologia
Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona

Dra. Àngels Franch
Professora Titular
Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona

El presente trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-002823). Se ha dispuesto de una ayuda predoctoral de formación de personal investigador (BES-2006-13640) durante el período 2006-2010 y de dos ayudas para la realización de estancias breves en otros centros de I+D (2007 y 2009) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Índice

Objetivos	3
Introducción	9
1 La respuesta inflamatoria	9
1.1 Inductores de la respuesta inflamatoria.....	9
1.1.1 Receptores celulares de los inductores de la respuesta inflamatoria.....	11
1.1.1.1 Receptores tipo <i>Toll</i>	11
1.1.1.2 Receptores citosólicos de patrones de reconocimiento	13
1.2 Mediadores de la respuesta inflamatoria	14
1.2.1 Aminas vasoactivas	14
1.2.1.1 Histamina.....	14
1.2.1.2 Serotonina.....	15
1.2.2 Péptidos	15
1.2.2.1 Neuropeptidos.....	15
1.2.2.2 Péptidos de la cascada de la coagulación	16
1.2.3 Mediadores del sistema del complemento.....	17
1.2.4 Mediadores lipídicos	18
1.2.5 Citocinas	20
1.2.5.1 Factor de necrosis tumoral α	21
1.2.5.2 Interleucina 1	23
1.2.5.3 Interleucina 6	24
1.2.6 Quimiocinas.....	24
1.2.7 Enzimas proteolíticos	25
1.3 Células implicadas en la respuesta inflamatoria.....	25
1.3.1 Neutrófilos	28
1.3.2 Macrófagos	28
1.4 Estrés oxidativo en la respuesta inflamatoria.....	29
1.5 La respuesta inflamatoria aguda	30
1.6 Resolución de la respuesta inflamatoria	33
1.7 La respuesta inflamatoria crónica	33
1.8 La artritis reumatoide como enfermedad inflamatoria crónica.....	34
1.8.1 Etiología de la artritis reumatoide	35
1.8.2 Patogenia de la artritis reumatoide	36
1.8.3 Autoinmunidad en la artritis reumatoide.....	38
1.8.4 Semiología de la artritis reumatoide.....	40
1.8.4.1 Manifestaciones articulares	40
1.8.4.2 Manifestaciones extraarticulares	42
1.8.5 Tratamiento de la artritis reumatoide.....	42

1.8.6	Modelos experimentales de artritis reumatoide	43
1.8.6.1	Artritis adyuvante en rata	45
1.8.6.2	Artritis inducida por colágeno en rata	45
2	El cacao	47
2.1	Composición del cacao	47
2.2	Efectos biológicos del cacao.....	48
2.2.1	Efectos del cacao sobre el sistema cardiovascular	48
2.2.1.1	Estudios <i>in vitro</i>	49
2.2.1.2	Estudios <i>in vivo</i>	49
2.2.2	Efectos del cacao sobre la carcinogénesis.....	51
2.2.2.1	Estudios <i>in vitro</i>	51
2.2.2.2	Estudios <i>in vivo</i>	52
2.2.3	Efecto del cacao sobre el sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria.....	52
2.2.3.1	Estudios <i>in vitro</i>	53
2.2.3.2	Estudios <i>in vivo</i>	53
Resultados	55
Artículo 1	57
Resumen	59
Artículo 2	79
Resumen	81
Artículo 3	93
Resumen	95
Artículo 4.....	115
Resumen	117
Discusión	129
Conclusiones	139
Bibliografía	143

Índice de figuras

Figura 1.- Reconocimiento de PAMPs por TLR de superficie	11
Figura 2.- Reconocimiento de PAMPs por TLRs intracelulares.....	12
Figura 3.- Vías de señalización activadas por TLRs en macrófagos y células dendríticas.	13
Figura 4.- Vías de la cascada de coagulación	16
Figura 5.- Vías de activación del sistema del complemento	18
Figura 6.- Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico	19
Figura 7.- Migración leucocitaria. A) Arrastre de leucocitos antes de la migración a través de las células endoteliales, B) migración leucocitaria a través de la ruta paracelular, C) migración leucocitaria a través de la ruta transcelular, D) migración a través de pericitos y matriz extracelular	27
Figura 8.- Relación entre radicales libres y sus metabolitos	29
Figura 9.- Flujo de información en las primeras etapas de trauma con infección	32
Figura 10.- Estructura de una articulación sinovial normal y afectada por artritis reumatoide	37
Figura 11.- Red de señalización por medio de implicada en artritis inflamatorias	38
Figura 12.- Inflamación metacarpal-falangeal e interfalangeal proximal propias de la RA representadas en el óleo ‘La familia de Jodaens en un jardín’ de Jacob Jordaens (1630; Museo del Prado, Madrid)	41

Índice de tablas

Tabla 1.- Expresión de citocinas en estados patológicos inflamatorios mediados por el sistema inmunitario	20
Tabla 2.- Función de las citocinas proinflamatorias	21
Tabla 3.- Función de las principales citocinas antiinflamatorias	22
Tabla 4.- Características de la respuesta de fase aguda	33
Tabla 5.- Modelos de artritis experimental	44

Abreviaturas

5-HT	serotonina (5-hidroxitriptamina,)
AA	artritis adyuvante
ACE	enzima convertidora de angiotensina (<i>angiotensin I-converting enzyme</i>)
AFA	anticuerpo contra filagrina (<i>antifilaggrin antibody</i>)
AGEs	productos finales originados por la glicosilación avanzada (<i>advanced glycation end products</i>)
AKA	anticuerpo contra queratina (<i>anti-keratin antibody</i>)
anti-CCP	anticuerpos contra péptido citrulinado cíclico (<i>anti-cyclic citrullinated peptide</i>)
AP-1	proteína activadora 1 (<i>activator protein-1</i>)
APF	factor antiperinuclear (<i>antiperinuclear factor</i>)
C5bC6C7C8C9	complejo de ataque a membrana
CIA	artritis inducida por colágeno (<i>collagen-induced arthritis</i>)
COX	ciclooxigenasa
CRP	proteína C reactiva (<i>C reactive protein</i>)
CX ₃ CL1	fractalina
CXCL8	quimiocina IL-8
CXCR4	receptor 4 de la quimiocina CXC (<i>CXC chemokine receptor 4</i>)
DAG	diacilglicerol
DC	células dendríticas (<i>dendritic cells</i>)
DMARDs	fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (<i>disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
dsRNA	dobles cadenas de RNA (<i>double-stranded RNA</i>)
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
ERM	ezrina/radixina/moesina
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ESL-1	ligando 1 de E-selectina (<i>E-selectin ligand-1</i>)
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G (<i>G protein-coupled receptors</i>)
GPx	glutación peroxidasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HDL	lipoproteínas de alta densidad (<i>high-density lipoprotein</i>)
HETEs	hidroxieicosatetraenoicos
HEV	vénulas postcapilares altas (<i>high endothelial venules</i>)
HIF-1 α	factor 1 α inducible por hipoxia (<i>hypoxia-inducible factor-1α</i>)

HMGB1	factor de transcripción de grupo B1 de alta movilidad (<i>high mobility group B1</i>)
ICAM	molécula de adhesión intercelular (<i>inter-cellular adhesion molecule</i>)
IFN	interferón
IL-	interleucina
IL-1RA	antagonista del receptor de IL-1 (<i>IL-1 receptor antagonist</i>)
IL-2R	receptor de IL-2
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	inositol trifosfato
IRFs	factores reguladores de IFN (<i>IFN-regulatory factors</i>)
JB6 ⁺ P	línea celular JB6 de queratinocitos de ratón
JNK	quinasa C-Jun N terminal (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
LFA1	$\alpha_L\beta_2$ integrina
LDL	lipoproteínas de baja densidad (<i>low-density lipoprotein</i>)
LPS	lipopolisacárido
LT	leucotrienos
LX	lipoxinas
Mac-1	$\alpha_M\beta_2$ integrina
MAPK	proteínas quinasas activadas por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MAPKK1	quinasa 1 de MAPK
MBL	complejo de lectina de unión a manosa (<i>mannose-binding lectin</i>)
MCP-1 ó CCL2	proteína quimiotáctica de monocitos (<i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
MEK1	quinasa MAPK/ERK 1 (<i>MAPK/ERK kinase</i>)
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-1 α	proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (<i>macrophage inflammatory proteins 1α</i>)
MyD88	vía dependiente del gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (<i>myeloid differentiation primary response gene</i>)
NF- κ B	vía del factor nuclear κ B (<i>nuclear factor κB</i>)
NLR	receptores tipo NOD (<i>NOD-like receptors</i>)
nNOS	NOS neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa (<i>nitric oxide synthase</i>)
Nrf2	factor nuclear de células T activadas y el factor 2 relacionado con NF-E2 (<i>NF-E2 related factor-2</i>)
O ₂ ⁻	anión superóxido
·OH	radical hidroxilo
PAD	peptidil-arginina deiminasa (<i>peptidyl-arginine deiminase</i>)
PAF	factor activador de plaquetas

PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PARs	receptores activados por proteasas (<i>protease-activated receptors</i>)
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PG	prostaglandina
PGI ₂	prostaciclina
PRR	receptores de reconocimiento de patrones (<i>pattern-recognition receptors</i>)
PSGL1	ligando 1 de la glucoproteína P-selectina (<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>)
RA	artritis reumatoide (<i>rheumatoid arthritis</i>)
RANTES	proteína regulada por la activación, expresada en células T y secretada (<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>)
RLRs	receptores tipo RIG-I (<i>RIG-I-like receptors</i>)
RNS	especies reactivas de nitrógeno (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
SOD	superóxido dismutasa
STAT3	transductor de señales y activador de transcripción 3 (<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
SYK	tirosina quinasa de bazo (<i>spleen tyrosine kinase</i>)
TBARS	sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TLR	receptor tipo <i>Toll</i> (<i>Toll like receptor</i>)
TNF- α	factor de necrosis tumoral α (<i>tumor necrosis factor</i>)
TRIF	dominio TIR que contiene el adaptador inductor de interferón β (<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β,</i>)
TX	tromboxano
VEGF	factor de crecimiento vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLA4	$\alpha_4\beta_1$ -integrina (también llamada <i>very late antigen-4</i>)
XCL1	linfotactina- α
XCL2	linfotactina- β

Objetivos

La respuesta inflamatoria es una reacción fisiológica ante una agresión con el fin de recuperar la homeostasis del organismo. Sin embargo, esta respuesta provoca dolor y llega a mermar sustancialmente la calidad de vida de las personas que la padecen de forma crónica y/o sistémica. Entre las patologías asociadas a la respuesta inflamatoria crónica se encuentra la artritis reumatoide, enfermedad que afecta alrededor del 1% de la población mundial. La artritis reumatoide comporta consecuencias negativas sobre la salud de las personas que la padecen, siendo además un problema para la sociedad en general por el gran impacto económico que supone. En este contexto resulta muy interesante hallar productos no farmacológicos que ayuden a paliar las consecuencias de la respuesta inflamatoria o que actúen como coadyuvantes de terapias antiinflamatorias.

En los últimos años, la alimentación ha pasado de ser una fuente de energía y satisfacción sensitiva a considerarse un factor esencial para disminuir el riesgo a padecer determinadas patologías crónicas, como enfermedades cardiovasculares, obesidad u osteoporosis. Debido a ello existe un interés creciente por conocer los posibles beneficios que pudiera aportar el consumo de ciertos alimentos sobre el inicio y gravedad de las patologías crónicas. En este sentido, un producto como el cacao podría aunar tanto el componente placentero asociado a algunos alimentos como el aspecto beneficioso para la salud que actualmente se persigue en ellos. En numerosos países occidentales el cacao constituye una fuente importante de flavonoides ya que otros alimentos ricos en flavonoides, como ciertos vegetales, el vino y el té, son poco habituales en su dieta.

El cacao, además de su correspondiente aporte de macronutrientes, proporciona una cantidad relativamente elevada de flavonoides, compuestos polifenólicos con reconocida actividad antioxidante, antiproliferativa, protectora de los sistemas cardiovascular y nervioso e inmunomoduladora. Algunos de los flavonoides presentes en el cacao muestran actividad antiinflamatoria *in vitro*, y además, se han descrito efectos antiinflamatorios de otros flavonoides *in vivo*. Por lo tanto es posible que una dieta enriquecida con cacao actúe sobre la capacidad antioxidante del organismo y pueda así prevenir y modular la respuesta inflamatoria *in vivo*.

La hipótesis de partida sobre la que se han erigido los objetivos de este estudio ha sido que la actividad inmunomoduladora de los flavonoides del cacao puede mantenerse tras su metabolismo y llegar a modular la respuesta inflamatoria *in vivo*.

En base a esta hipótesis, el objetivo general del presente trabajo ha sido: **Establecer el efecto de la ingesta de cacao sobre la respuesta inflamatoria experimental.**

Para alcanzar este objetivo general se han planteado como objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de la administración oral de cacao sobre la inflamación aguda en modelos experimentales inducidos por carragenina, histamina, serotonina, bradicinina y prostaglandina E₂.

Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de este primer objetivo han dado lugar al capítulo de un libro:

Castell M, Franch A, Ramos-Romero S, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano F.J., Castellote C.
Effect of a diet rich in cocoa flavonoids on experimental acute inflammation.
En: Flavonoids: Biosynthesis, biological effects and dietary sources. Keller R.B. (Ed.)
Hauppauge (NY): Nova Science Publishers, Inc., 2009. Chapter 6, pp 213-229.

Una vez establecido el efecto de la ingesta de cacao sobre la respuesta inflamatoria aguda, los objetivos se han dirigido a determinar el efecto de dietas enriquecidas con cacao sobre la respuesta inflamatoria crónica. Para ello se han desarrollado dos modelos experimentales de artritis bien establecidos como son la artritis adyuvante y la artritis inducida por colágeno. Paralelamente, se ha valorado la capacidad antioxidante que confiere la ingesta de cacao a organismos en estado patológico. Los objetivos específicos que se han perseguido son:

2. Establecer el efecto de dietas ricas en cacao sobre variables clínicas e inmunológicas de la artritis adyuvante.

Los resultados derivados de este objetivo han sido publicados en:

Ramos-Romero S., Perez-Cano F.J., Castellote C., Castell M., Franch A.
Effect of cocoa-enriched diets on lymphocytes involved in adjuvant arthritis in rats.
Br J Nutr 2011; doi: 10.1017/S0007114511003035; en prensa.

3. Establecer el efecto de una dieta rica en cacao sobre una patología inflamatoria crónica con carácter autoinmunitario, como es la artritis inducida por colágeno.

Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de este objetivo han sido aceptados para su publicación en:

Ramos-Romero S., Pérez-Cano F.J., Pérez-Berezo T., Castellote C., Franch A., Castell M.
Effect of a cocoa flavonoid-enriched diet on experimental autoimmune arthritis.
Br J Nutr 2011; doi: 10.1017/S000711451100328X; en prensa.

4. Determinar la influencia de la ingesta de cacao y del flavonoide quercetina sobre el estrés oxidativo producido durante un proceso artrítico experimental.

Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de este objetivo se muestran en el manuscrito:

Ramos-Romero S., Perez-Cano F.J., Ramiro-Puig E., Castellote C., Franch A., Castell M.

Cocoa intake attenuates oxidative stress associated to rat adjuvant arthritis.

Pendiente de aceptación.

Introducción

1 La respuesta inflamatoria

La inflamación (del latín *inflammatio*: encender, hacer fuego) fue descrita por primera vez hace más de 2000 años por Aulus Cornelius Celsus en su tratado '*De medicina*' datado en el siglo I d.C. Este médico romano describió la respuesta del organismo ante agresiones por medio de cuatro signos cardinales: '*rubor et tumor cum calore et dolore*'. En 1858, Rudolph Virchow en su libro '*Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*' añadió a esta definición un quinto signo: '*function laesa*'. Además Virchow introdujo un gran cambio en la medicina, ya que estableció las bases celulares de la patología, cambiando así la teoría hipocrática, aceptada durante siglos, en la que la enfermedad era considerada como un desequilibrio entre los cuatro humores corporales. Las bases fisiológicas que explican la respuesta inflamatoria no fueron descritas hasta mediados del siglo XIX cuando Augustus Waller y Julius Cohnheim describieron la migración leucocitaria y algunos de los cambios vasculares característicos de la inflamación aguda (Medzhitov, 2010). Desde entonces hasta hoy se han realizado numerosos avances en el conocimiento y tratamiento de la respuesta inflamatoria; aún así, la inflamación sigue siendo objeto de numerosos estudios ya que cualquier avance en esta materia implica una mejora en la calidad de vida de millones de personas.

La inflamación se define como una respuesta fisiológica provocada por un estímulo nocivo para devolver la homeostasis al organismo. Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva puede producir daño en el tejido circundante a la zona lesionada y, en casos graves, puede provocar la disfunción de los órganos implicados e incluso la muerte (Nathan, 2002). Paradójicamente, los mismos elementos moleculares y celulares implicados en la respuesta inflamatoria pueden realizar funciones fisiológicas o patológicas. La respuesta inflamatoria se divide clásicamente en dos grandes categorías basadas en la duración de la misma y en sus características patológicas: la respuesta inflamatoria aguda y la respuesta inflamatoria crónica. A pesar de esta agrupación, existe una gran diversidad dentro de cada categoría ya que la respuesta inflamatoria puede estar dirigida por diferentes mecanismos de inducción, regulación y resolución, pudiendo promover patologías tan diversas como la diabetes tipo 2, la aterosclerosis, el asma, las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer (Sherwood y col., 2004).

1.1 Inductores de la respuesta inflamatoria

Los inductores de la respuesta inflamatoria están constituidos por señales detectadas por receptores de la superficie celular, pudiendo ser de tipo endógeno o exógeno. Los inductores exógenos incluyen señales microbianas y no microbianas. Entre los inductores microbianos se encuentran los patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) y los factores de virulencia (Medzhitov, 2008).

Los PAMPs son un conjunto de patrones moleculares muy conservados evolutivamente, que se hallan tanto en microorganismos patógenos como en comensales. En respuesta a los PAMPs, el organismo ha evolucionado y ha dado lugar a receptores expresados en las células del sistema inmunitario innato que reconocen a los PAMPs y que se denominan receptores de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition receptors*, PRR) (Medzhitov, 1997).

Los factores de virulencia, a diferencia de los PAMPs, son inductores de la respuesta inflamatoria presentes sólo en microorganismos patógenos y no son detectados directamente por receptores específicos del organismo. El reconocimiento de los factores de virulencia se realiza a través de sensores celulares que localizan una actividad patogénica, como la formación de poros, la actividad proteasa de helmintos o los productos endógenos producidos por las mismas células dañadas del organismo (Mariathasan y col., 2006; Sokol y col., 2008).

En cuanto a los inductores exógenos no microbianos, éstos incluyen a alérgenos, irritantes, cuerpos extraños y compuestos tóxicos. La respuesta inflamatoria producida tanto por alérgenos como por irritantes y tóxicos es similar e implica la neutralización y evacuación del agente lesivo. Los cuerpos extraños, sin embargo, son partículas indigeribles debido a su tamaño o a la lesión que producen en la membrana de los macrófagos que intentan fagocitarlos. Ante la imposibilidad de realizar la función fagocítica, los macrófagos encapsulan a los cuerpos extraños y forman un granuloma (Medzhitov, 2008).

Los inductores endógenos de la respuesta inflamatoria son señales producidas por estrés, lesión o malfuncionamiento tisular. Este tipo de respuesta se inicia principalmente con la detección de moléculas de células o tejidos que se encuentran en el compartimento intracelular o unidos a membrana, superficie epitelial o endotelio vascular. Dentro de este tipo de inductores endógenos se incluyen los fragmentos de matriz extracelular originados durante una lesión tisular, como el hialuronato cuya fragmentación produce polímeros de bajo peso molecular que activan al receptor tipo *Toll-4* (*Toll like receptor-4*, TLR-4) (Jiang y col., 2005). Los inductores endógenos de este tipo se asocian principalmente a la respuesta inflamatoria aguda (Rock y col., 2008). Otra clase de inductores endógenos son los productos de una respuesta inflamatoria previa. Estos inductores se relacionan con una respuesta inflamatoria crónica y entre ellos se encuentran cristales de urato sódico y cálcico producidos en la gota y pseudogota (Martinon y col., 2006), productos finales originados por la glucosilación avanzada (*advanced glycation end products*, AGEs), por la diabetes tipo 1 y 2 o por el envejecimiento (Yan y col., 2007), o lipoproteínas oxidadas generadas durante la aterosclerosis (Navab y col., 2006).

1.1.1 Receptores celulares de los inductores de la respuesta inflamatoria

Los inductores de la respuesta inflamatoria son detectados por el organismo mediante los receptores de reconocimiento de patrones o PRRs. Entre los PRRs se hallan los receptores tipo *Toll* TLRs y varias clases de PRRs citosólicos, incluyendo receptores tipo RIG-I (*RIG-I-like receptors*, RLRs) y receptores tipo NOD (*NOD-like receptors*, NLR).

1.1.1.1 Receptores tipo *Toll*

Los TLRs son proteínas transmembrana tipo 1 formados por un ectodominio rico en leucina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (Kawai y col., 2010). Hasta ahora se han identificado doce TLRs funcionales en ratón (TLR1-12) y diez en humanos (TLR1-10), de los cuales TLR1 al TLR9 están conservados en ambas especies. Los PAMPs reconocidos por los TLRs se encuentran en un amplio rango de microorganismos como bacterias, virus, parásitos y hongos (Akira y col., 2006).

Los TLRs se dividen en 2 grandes grupos según su localización y sus ligandos. El primer grupo está compuesto por TLRs expresados en la superficie celular que reconocen principalmente componentes de la membrana de microorganismos (**Figura 1**).

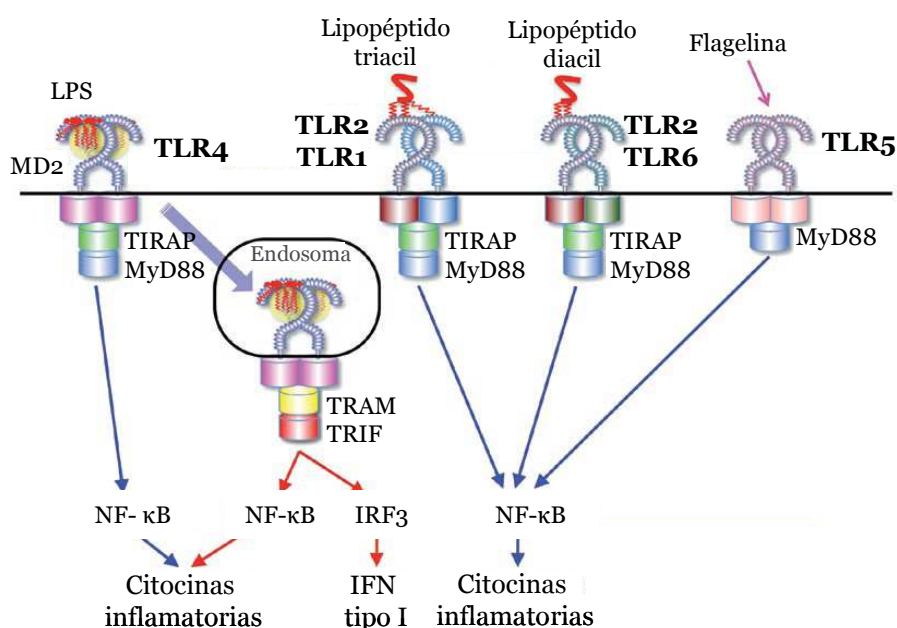


Figura 1.- Reconocimiento de PAMPs por TLRs de superficie celular (adaptado de Kawai y col., 2010).

Entre los TLRs presentes en superficie celular se encuentran TLR1, 2, 4, 5, 6 y 11 (Kawai y col., 2010). TLR2 forma complejos con TLR1 y TLR6 que reconocen lipopéptidos tri y diacetilados respectivamente, presentes en bacterias Gram-negativas y en micoplasmas.

TLR4 forma un complejo en la superficie celular con la proteína MD2 para responder ante la presencia de lipopolisacárido (LPS), que forma parte de la pared externa de bacterias Gram-negativas. TLR5 reconoce a la flagelina, proteína del flagelo bacteriano. La unión de los ligandos correspondientes a los TLRs produce la activación de la vía dependiente del gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (*myeloid differentiation primary response gene*, MyD88) que seguidamente activa la vía del factor nuclear κB (*nuclear factor κB* , NF- κB), induciendo la formación de mediadores inflamatorios como citocinas (Kawai y col., 2010).

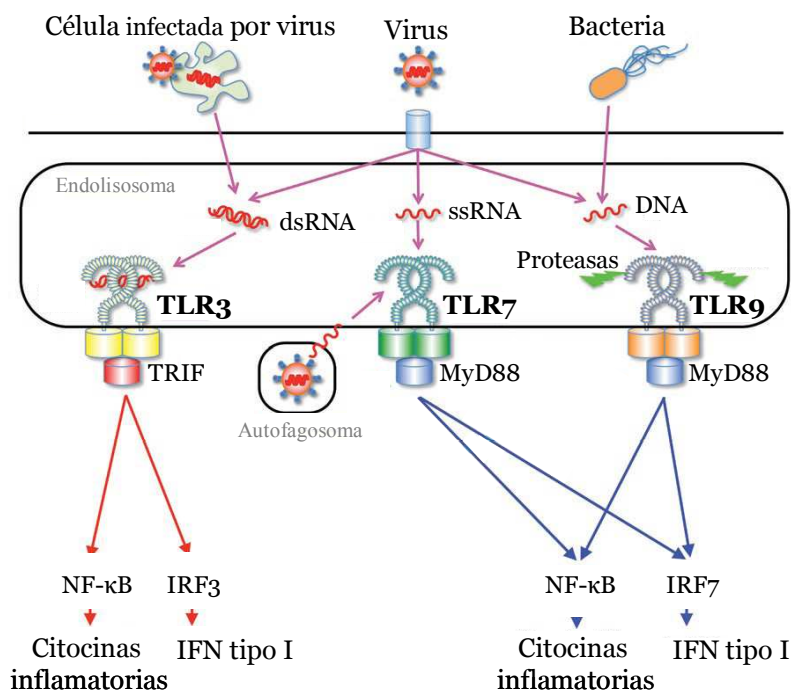


Figura 2.- Reconocimiento de PAMPs por TLRs intracelulares (adaptado de Kawai y col., 2010).

El segundo grupo de TLRs lo forman receptores expresados en vesículas intracelulares, como endosomas, lisosomas y endolisosomas, y reconocen ácidos nucleicos de microorganismos (**Figura 2**). A este segundo grupo pertenecen los TLR3, 7, 8 y 9. TLR3, en forma de homodímero, reconoce dobles cadenas de RNA (*double-stranded RNA*, dsRNA) derivadas de virus. TLR3 activa la vía de señalización intracelular dependiente del dominio TIR que contiene el adaptador inductor de interferón (IFN) β (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* , TRIF), induciendo así la producción de IFN tipo I y la activación de la vía NF- κB (Kawai y col., 2008). Los TLR7 y 9 están presentes principalmente en células dendríticas y reconocen RNA vírico y DNA vírico y bacteriano, respectivamente.

Las respuestas mediadas por TLRs activan diversas cascadas proteicas (**Figura 3**). En macrófagos y células dendríticas, los TLRs inducen la respuesta inflamatoria mediante la activación de las vías NF- κB , proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-*

activated protein kinases, MAPK) o factores reguladores de IFN (*IFN-regulatory factors*, IRFs). La activación de estas vías comporta finalmente la producción de citocinas proinflamatorias.

1.1.1.2 Receptores citosólicos de patrones de reconocimiento

Además de la familia de los TLR, existen otras familias de receptores intracelulares para el reconocimiento de inductores de la respuesta inflamatoria. La familia de los NLRs, formada por más de veinte miembros, detecta tanto PAMPs como inductores no PAMPs, así como señales de estrés celular.

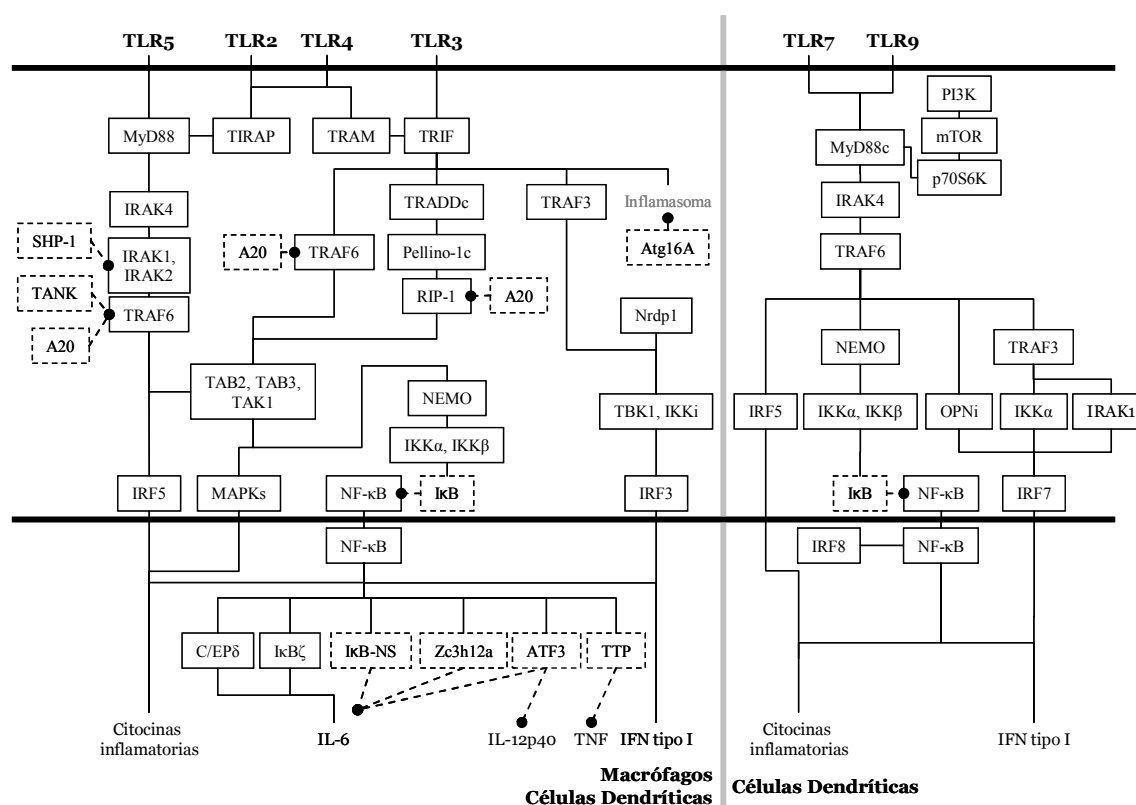


Figura 3.- Vías de señalización activadas por TLRs en macrófagos y células dendríticas. Los recuadros discontinuos señalan factores inhibidores (adaptado de Kawai y col., 2010).

La función de los NLRs citosólicos en la respuesta inflamatoria es similar a la de los TLRs, activando la producción de citocinas proinflamatorias (Lamkanfi, 2011). Los NLRs forman complejos citoplasmáticos llamados inflamasomas (Pétrilli y col., 2007; Martinon y col., 2009), que son complejos multiproteicos relacionados con numerosas patologías, como la enfermedad inflamatoria intestinal, el vitíligo, la artritis gotosa, la diabetes tipo 1 y 2, y enfermedades autoinflamatorias raras denominadas colectivamente como criopirinopatías (Lamkanfi, 2011).

Otro grupo de receptores para los inductores de la respuesta inflamatoria lo constituye la familia de los receptores de tipo RIG (RLRs) que detectan RNA vírico. Este grupo está formado por 3 miembros: RIG-I, Mda5 y LGP2 (Yoneyama y col., 2009).

1.2 Mediadores de la respuesta inflamatoria

Los inductores de la respuesta inflamatoria estimulan la producción de mediadores que alteran la funcionalidad de los tejidos afectados. Los mediadores de la inflamación derivan de proteínas plasmáticas o son secretados por células implicadas en la respuesta inflamatoria. Los mediadores de la respuesta inflamatoria pueden clasificarse en 7 grupos según sus propiedades bioquímicas (Medzhitov, 2008): aminas vasoactivas, péptidos, mediadores del sistema del complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas y enzimas proteolíticos.

1.2.1 Aminas vasoactivas

Las aminas vasoactivas incluyen histamina y serotonina. Se encuentran contenidas en los gránulos de mastocitos, basófilos y plaquetas. Estas aminas son componentes preformados que se liberan por la degranulación de estos elementos celulares. El efecto fisiológico de las aminas vasoactivas durante la respuesta inflamatoria se centra principalmente en los vasos sanguíneos.

1.2.1.1 Histamina

La histamina (2-[4-imidazol]-etilamina) es una amina de bajo peso molecular sintetizada a partir de L-histidina, mediante la enzima L-histidina descarboxilasa, dependiente del cofactor piridoxal-5'-fosfato. La síntesis de histamina tiene lugar en numerosos tipos celulares como células gástricas, nerviosas histaminérgicas, linfocitos, monocitos, plaquetas y neutrófilos, y se almacena sobre todo en mastocitos y basófilos.

La histamina realiza sus funciones a través de receptores específicos presentes en la membrana celular. Los receptores de histamina pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs), de los que se han definido cuatro subtipos principales con diferente afinidad de unión (H₁, H₂, H₃ y H₄) (Jones y col., 2011). Los macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y linfocitos T y B presentan receptores de histamina y también son capaces de secretarla, aumentando así su efecto en el sitio afectado (Jutel y col., 2009).

La histamina inicia los síntomas agudos de la respuesta inflamatoria gracias a su rápida actividad sobre las células del músculo liso del endotelio vascular y de los bronquios, provocando rinitis aguda, broncoconstricción o desarrollo de eritema cutáneo. Además de estas respuestas inmediatas, la histamina también modula algunos eventos de la respuesta

inflamatoria crónica, incrementando la secreción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas en la respuesta alérgica, regulando la acumulación de granulocitos en los tejidos, e inhibiendo la quimiotaxis, activación, degranulación y la formación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en neutrófilos. La histamina también regula numerosas funciones fisiológicas como la proliferación y diferenciación celular, la hematopoyesis, la memoria, la regulación del ciclo de sueño y vigilia, la homeostasis energética y endocrina y la regeneración tisular (Jutel y col., 2009).

1.2.1.2 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una amina formada por la descarboxilación del triptófano consumido en la dieta. Existen al menos 15 receptores de 5-HT diferentes que se agrupan en 7 familias, en función de los mecanismos de señalización que desencadenan.

La principal fuente de serotonina en humanos se encuentra en las plaquetas, aunque también está presente en células neuroendocrinas del tracto respiratorio y en nervios periféricos. En roedores la serotonina también se encuentra en mastocitos (Berger y col., 2009).

La serotonina provoca vasoconstricción o vasodilatación dependiendo del receptor que active en vasos sanguíneos y en tejido muscular liso circundante (Kaumann y col., 2006). La serotonina realiza otras funciones fisiológicas sobre numerosos sistemas, modulando procesos relacionados con el comportamiento humano a través del sistema nervioso central, regulando el balance energético y la toma de alimentos por medio de los sistemas gastrointestinal y endocrino, y modulando la fisiología pulmonar y cardiovascular (Berger y col., 2009).

1.2.2 Péptidos

1.2.2.1 Neuropéptidos

Los neuropéptidos desempeñan su función al inicio de la respuesta inflamatoria. Entre los neuropéptidos se encuentra la familia de la taquicinina cuyos principales miembros son la sustancia P, la neurocinina A y la neurocinina B.

Los neuropéptidos median numerosos procesos fisiológicos en el tracto gastrointestinal, respiratorio y genito-urinario. Se unen a GPCRs expresados en numerosos tipos celulares, lo que desencadena la activación de la vía de AMPc y proteína quinasa A, que provoca un aumento en el contenido de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Varela y col., 2007). Las taquicininas parecen estar implicadas en la contracción de la musculatura lisa, vasodilatación, quimiotaxis y activación de células inmunitarias. Intervienen en diferentes

patologías de carácter inflamatorio, en la hiperalgesia y en los trastornos de ansiedad, y son responsables de la inflamación neurogénica cuando se liberan a nivel periférico (Lecci y col., 2000).

1.2.2.2 Péptidos de la cascada de la coagulación

El sistema de la coagulación se activa mediante dos vías que convergen en una cascada común: la vía intrínseca, dependiente del contacto con una superficie cargada negativamente, y la vía extrínseca, dependiente de que el factor tisular sea expuesto a la circulación (**Figura 4**). Ambas vías convergen en la activación del factor X que transforma la protrombina en trombina, la cual a su vez transforma fibrinógeno en fibrina (Adams y col., 2009).

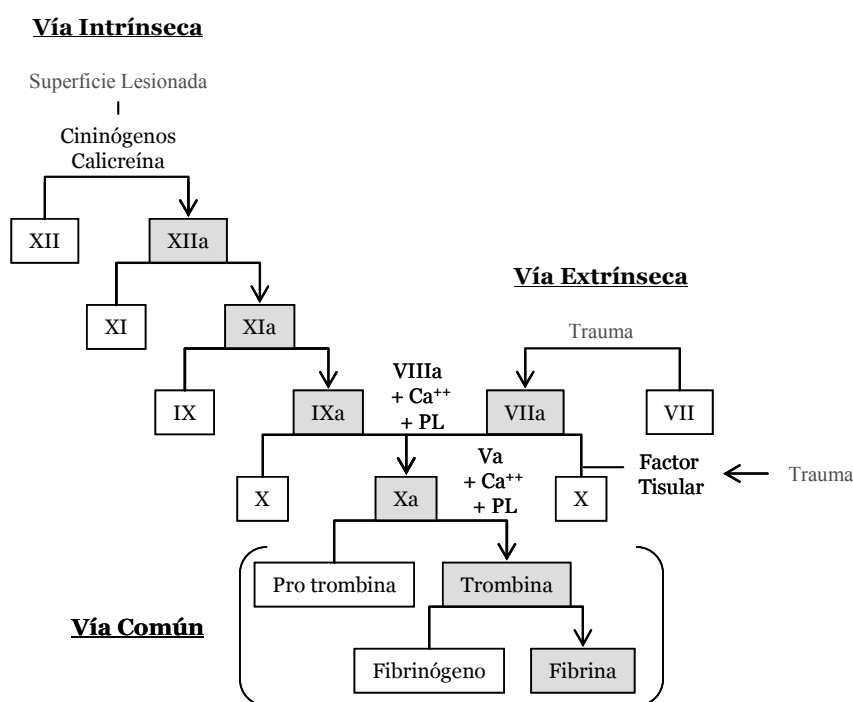


Figura 4.- Vías de la cascada de la coagulación (adaptado de Adams y col., 2009)

La vía intrínseca de la cascada de la coagulación se inicia con la activación del factor de Hageman (factor XII). Este factor se activa por unión a colágeno, a la membrana basal o a plaquetas activadas. El factor XIIa comporta la activación de una cascada de proteínas que finaliza con la formación de trombina (Brune y col., 1993).

La vía extrínseca se inicia con la acción del factor tisular, glucoproteína transmembrana de 47 kDa miembro de la superfamilia de citocinas de clase II (Key y col., 2007). Se cree que esta es la principal vía activada durante la respuesta inflamatoria, particularmente durante la sepsis y el síndrome de respuesta a la inflamación sistémica (Riewald y col., 2003). El factor tisular se expresa en una superficie tisular inflamada y en capas adventicias de los vasos sanguíneos. Además, células endoteliales y monocitos activados también producen

factor tisular como respuesta al factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor*, TNF- α), interleucina (IL-)1, IL-6 y proteína C reactiva (*C reactive protein*, CRP). La presencia del factor tisular provoca la activación y unión del factor VII, activando consecuentemente la formación de trombina (Carraway y col., 2003).

Además de promover la formación del coágulo, la activación de estas proteínas también tiene un efecto proinflamatorio indirecto, ya que el factor Xa, la trombina y el complejo formado por el factor tisular y factor VIIa inducen la síntesis de citocinas como TNF- α en células endoteliales y mononucleares. Esta función parece ser mediada por la unión de factores de coagulación a receptores activados por proteasas (*protease-activated receptors*, PARs) en la superficie de las células diana (Pawlinski y col., 2003).

Entre todos los componentes de la cascada de la coagulación, el factor Xa y la trombina específicamente se relacionan con la respuesta inflamatoria (Carrillo-Esper y col., 2002). El factor Xa provoca aumento de la permeabilidad vascular y de la migración leucocitaria (Cirino y col., 1997). La trombina fragmenta el fibrinógeno circulante y conduce a la formación de una red de fibrina, pero además es capaz de inducir la proliferación celular mediante la estimulación de la formación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF) y del factor de crecimiento β . La trombina también amplifica la respuesta inflamatoria gracias a la expresión de moléculas de adhesión y a la activación del quimiotactismo de granulocitos, los cuales potencian los efectos de la trombina ya que estimulan la liberación de elastasa, que puede inactivar al inhibidor de la antitrombina III.

1.2.3 Mediadores del sistema del complemento

El sistema del complemento está formado por más de 30 proteínas, solubles o asociadas a membrana, presentes en sangre y otros tejidos. El sistema complemento se activa por 3 vías diferentes: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de la lectina (**Figura 5**).

La vía clásica se activa mediante complejos formados por IgG o IgM unidas al antígeno en la superficie de agentes patógenos. La vía alternativa se activa por moléculas presentes en la superficie de microorganismos patógenos que se unen al componente C3 del complemento. La vía de las lectinas se activa por la unión del complejo de lectina de unión a manosa (*mannose-binding lectin*, MBL) o de ficolina a carbohidratos de la superficie de levaduras, bacterias, parásitos o virus (Sarma y col., 2011).

Todas las vías de activación del complemento convergen en la activación del factor C3, que es el más abundante en sangre. Su activación da lugar a la formación de C3a, C3b, C5a y el complejo de ataque a membrana (C5bC6C7C8C9). C3a tiene capacidad quimiotáctica. C3b promueve la fagocitosis uniéndose a la superficie del patógeno y favorece la formación de un complejo proteolítico con otros componentes del sistema del

complemento, provocando la división de C5 en C5a y C5b (Pangburn y col., 2002). C5a también tiene capacidad quimiotáctica y además aumenta la permeabilidad vascular en el foco inflamatorio. C5b se une a la superficie microbiana y facilita la formación del complejo de ataque a membrana, formado por C6, C7, C8 y C9 (Cole y col., 2003). Los factores C3a y C5a son también anafilatoxinas que promueven la contracción del músculo liso, la liberación de histamina en mastocitos, el aumento del consumo de O₂ en neutrófilos y la apoptosis (Sarma y col., 2011).

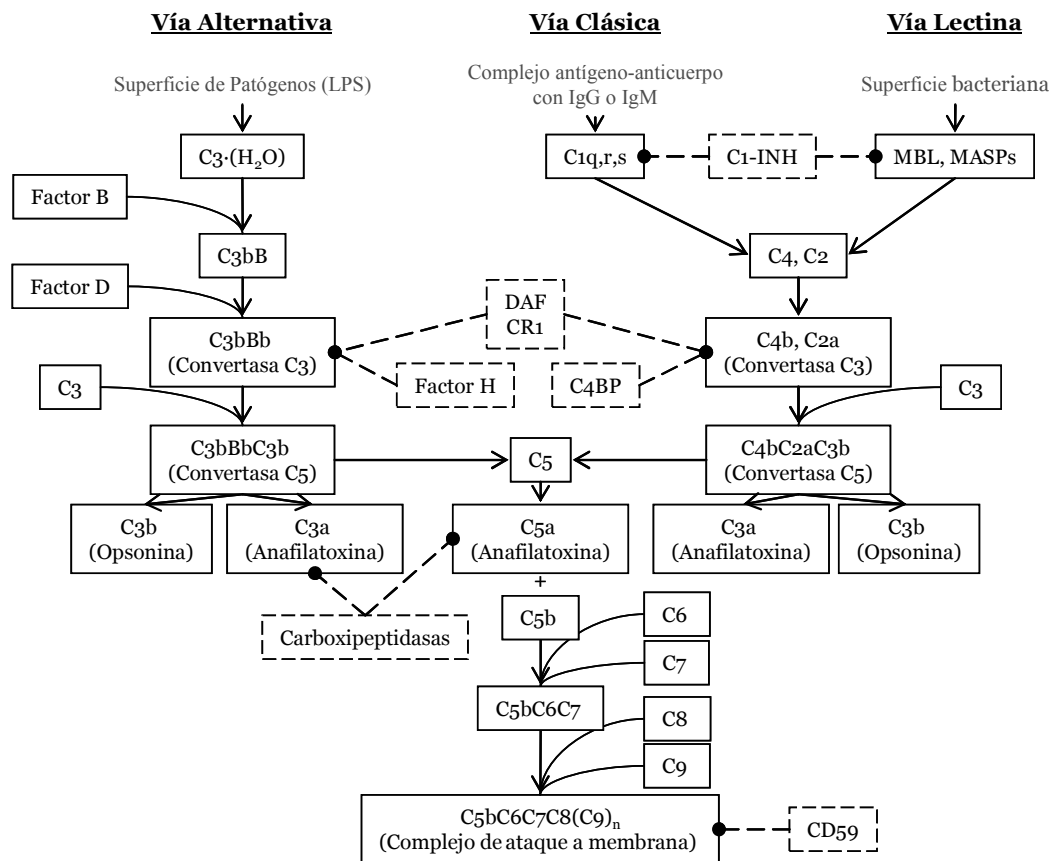


Figura 5.- Vías de activación del sistema del complemento.

Los recuadrados discontinuos señalan factores inhibidores (adaptado de Sarma y col., 2011).

El sistema del complemento se considera parte de la inmunidad innata, sin embargo, recientemente, algunos autores le otorgan un papel en la inmunidad adaptativa ya que mediante el sistema del complemento se implica en la respuesta inflamatoria a linfocitos T y B que ayudan a la eliminación de patógenos y mantienen la memoria inmunológica para prevenir invasiones posteriores (Dunkelberger y col., 2010).

1.2.4 Mediadores lipídicos

Los mediadores lipídicos derivan de los fosfolípidos presentes en las membranas celulares. La fosfolipasa A₂ citosólica, activada por Ca²⁺ intracelular, genera ácido araquidónico y

ácido lisofosfatídico. Estos compuestos son los precursores de dos clases de mediadores lipídicos: eicosanoides y factores activadores de plaquetas.

El ácido araquidónico se metaboliza a través de enzimas con actividad ciclooxigenasa, lipooxigenasa o del citocromo P450 para formar eicosanoides (**Figura 6**). Las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) generan prostaglandinas (PG) como PGD₂, PGF_{2a} y PGE₂, prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TX) TXA₂ y TXB₂. Las lipooxigenasas generan leucotrienos (LT) y lipoxinas (LX), y la vía del citocromo P450 genera ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs) y epóxidos.

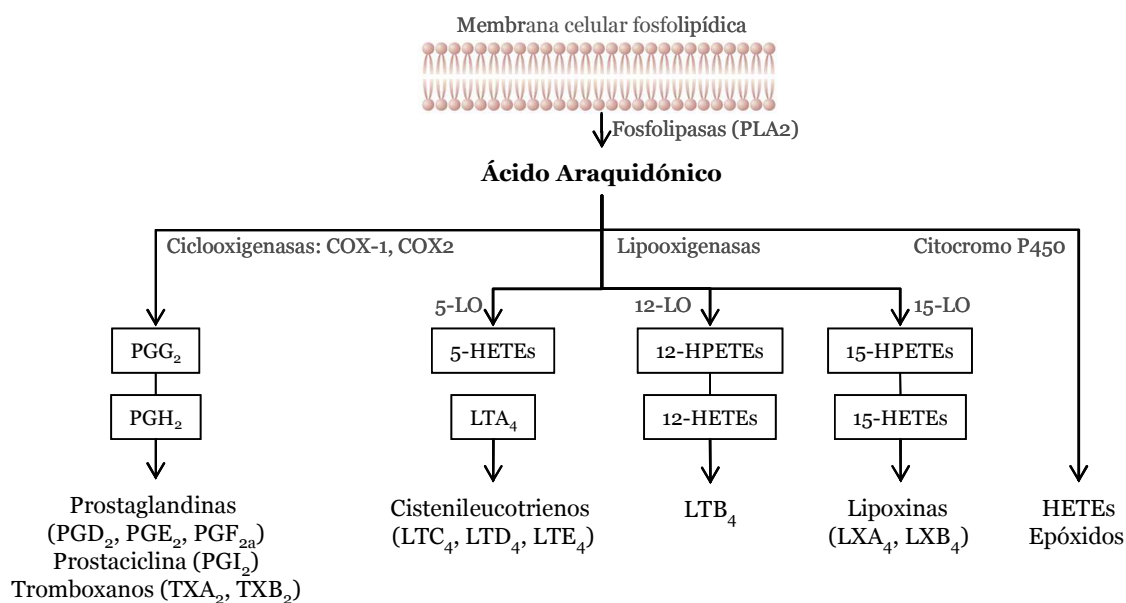


Figura 6.- Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico (adaptado de Harizi y col., 2008).

Los eicosanoides actúan sobre diversas funciones fisiológicas y patológicas. Durante la respuesta inflamatoria, los eicosanoides presentan propiedades proinflamatorias (PGH₂), quimiotácticas (LTB₄), agregantes de plaquetas (TXA₂), con capacidad de contraer el músculo liso (cistenil-LT) y de aumentar la permeabilidad vascular (LTs).

Según los receptores y las vías de transducción implicadas, las prostaglandinas pueden actuar como mediadores proinflamatorios o como mediadores antiinflamatorios. Otros eicosanoides también tienen efectos biológicos opuestos, como la PGI₂ y TXA₂. PGI₂ es antiagregante plaquetario, vasodilatadora e inhibe la adherencia de neutrófilos, y TXA₂ induce la agregación plaquetaria y tiene un efecto vasoconstrictor con aumento de la permeabilidad capilar (Harizi y col., 2008). Efectos similares a los producidos por TXA₂ son los de PGF_{2a}, sin embargo PGE₂ produce vasodilatación sistémica, además de interactuar con IL-1 y TNF para producir fiebre durante el curso de respuestas inflamatorias sistémicas (Mena y col., 1996).

Los LTs y LXs son mayoritariamente vasoconstrictores y son capaces de activar granulocitos y plaquetas, lo que conlleva la liberación de otros mediadores que pueden potencializar el daño tisular (West y col., 1993). Sin embargo, las LXs también realizan un importante papel en la resolución de la respuesta inflamatoria por medio de la estimulación de vías antiinflamatorias endógenas (Harizi y col., 2008).

El LTB₄ es un potente agente proinflamatorio que estimula la quimiotaxis, la adhesión celular, la producción de O₂[·] y la liberación de enzimas hidrolíticas por parte de neutrófilos. Por el contrario, los cisteinil-LT (LTC₄, LTD₄ y LTE₄), que originalmente se identificaron como sustancias de reacción lenta liberadas en el curso de las reacciones alérgicas e inmunitarias, son potentes vasoconstrictores, incrementan la permeabilidad vascular, la secreción de muco y el broncoespasmo (Lewis y col., 1990).

Por otro lado, la acetilación del ácido lisofosfatídico da lugar a factores activadores de plaquetas. Estos factores activan el reclutamiento de leucocitos, favorecen la vasodilatación y la vasoconstricción, el aumento de la permeabilidad vascular y la activación plaquetaria.

1.2.5 Citocinas

Las citocinas son oligopéptidos sintetizados por diversas células que modulan la función de otros tipos celulares mediante la activación de receptores tipo GPCR. Las citocinas actúan sobre el endotelio vascular, los leucocitos y la inducción de la respuesta de fase aguda.

Las citocinas inflamatorias pueden producir efectos sistémicos promoviendo la síntesis de proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva y los factores de coagulación en hepatocitos y activando la formación de prostaglandinas, como PGE₂, en el endotelio cerebral. PGE₂ activa determinadas poblaciones neuronales en el sistema nervioso central y promueve alteraciones propias de la fase aguda, como fiebre, anorexia, fatiga e insomnio (Pecchi y col., 2009). El desequilibrio de las vías de señalización proinflamatorias dirigidas por citocinas es un mecanismo que subyace en numerosas patologías inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario (**Tabla 1**).

Tabla 1.- Expresión de citocinas en estados patológicos inflamatorios mediados por el sistema inmunitario (adaptada de Williams y col., 2002).

	Citocinas	
	Sobreexpresión	Infraexpresión
Enfermedad de Crohn	TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ	IL-3
Colitis ulcerosa	TNF- α , IL-1, IL-5, IL-6, IL-8	IL-3
Espondilitis anquilosante	TNF- α , IL-10	IL-2, IFN γ
Psoriasis	TNF- α	
Artritis psoriática	TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IFN γ	
Artritis reumatoide	TNF- α , IL-1, IL-6	

La respuesta inflamatoria depende de un estrecho equilibrio entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. No obstante, las citocinas tienen efectos pleiotrópicos y a veces contrarios, pudiendo actuar como pro o antiinflamatorias. Este es el caso de IL-4, IL-10 e IL-13, que son potentes activadores de linfocitos B pero también pueden comportarse como moléculas antiinflamatorias. IFN γ posee actividad antiviral y activa a linfocitos T citotóxicos pero generalmente es considerada como citocina proinflamatoria porque aumenta la producción de TNF- α e induce la liberación de óxido nítrico (NO) (Dirandello, 2000).

Entre las principales citocinas proinflamatorias se encuentran TNF- α , IL-1 e IL-6. Otras citocinas como IL-12, IL-18 e IFN γ también tienen efectos proinflamatorios. En la **Tabla 2** se desglosan los principales efectos realizados por estas citocinas y las células que las secretan.

Tabla 2.- Función de las citocinas proinflamatorias (adaptada de Sherwood y col., 2004).

Citocina	Células Secretoras	Funciones
TNF-α	Monocitos, macrófagos y linfocitos T	Activación de la respuesta inflamatoria, de la cascada de coagulación y de apoptosis, de liberación de vasodilatadores (NO), de la respuesta de fase aguda, de catabolismo. Supresión miocárdica. Liberación de otras citocinas
IL-1	Monocitos, macrófagos	Activación de la respuesta inflamatoria, de la cascada de coagulación, de liberación de vasodilatadores (NO), de la respuesta de fase aguda, de catabolismo
IL-6	Monocitos, macrófagos células T y endoteliales	Activación de la respuesta de fase aguda y activación de linfocitos B
IFNγ	Células T y NK	Activación de la inflamación mediada por macrófagos
IL-12	Macrófagos	Activación y diferenciación de linfocitos T, B y NK
IL-17	Linfocitos T	Reclutamiento de neutrófilos y monocitos
IL-18	Macrófagos	Activación y diferenciación de linfocitos T y NK

Las citocinas clásicamente consideradas antiinflamatorias son moléculas inmunoreguladoras que controlan la respuesta de las citocinas proinflamatorias. Entre estas citocinas se encuentran el antagonista del receptor de IL-1 (*IL-1 receptor antagonist*, IL-1RA), IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13 (Opal y col., 2000). En la **Tabla 3** se desglosan las funciones principales realizadas por estas citocinas y las células que las secretan.

1.2.5.1 Factor de necrosis tumoral α

TNF- α es la citocina proinflamatoria por excelencia. Fue descubierta en el suero de ratones infectados con endotoxinas bacterianas.

Tabla 3.- Función de las principales citocinas antiinflamatorias (adaptada de Opal y col., 2000).

Citocina	Células Secretoras	Funciones
IL-1RA	Monocitos, macrófagos y células dendríticas	Inhibidor específico de la activación celular mediada por IL1 α e IL-1 β a través del receptor celular de IL-1
IL-4	Células T (Th2), B, estromales y mastocitos	Promueve el desarrollo de linfocitos Th2 e inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias inducidas por LPS
IL-10	Monocitos, macrófagos, células T (Th2) y B	Inhibe la producción de citocinas en monocitos, macrófagos y neutrófilos e inhibe la respuesta tipo Th1
IL-11	Células estromales y fibroblastos	Inhibe la producción de citocinas en monocitos, macrófagos y promueve la respuesta tipo Th2
IL-13	Células T (Th2)	Atenúa la función de monocitos y macrófagos
TGF-β	Numerosos tipos celulares	Inhibe la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II en monocitos y macrófagos, y la síntesis de citocinas proinflamatorias

TNF- α es miembro de la superfamilia TNF que comprende 35 citocinas estructuralmente relacionadas. Los genes que codifican las citocinas de la familia TNF se encuentran en un *loci* estrechamente ligado dentro del MHC en el cromosoma 6 en humanos y en el cromosoma 17 en ratón. TNF se sintetiza inicialmente como monómero transmembrana que contiene un ‘dominio TNF homólogo’ en el C terminal extracelular, tres de estas unidades se ensamblan formando el trímero funcional (Keystone y col., 2010). La forma soluble se separa de la membrana celular por medio de la acción de la TNF- α convertasa. La forma transmembrana del TNF es 1000 veces más potente que la forma soluble (Schneider y col., 1998). Se han identificado dos formas moleculares de TNF, denominadas TNF- α o caquexina y TNF- β o linfotoxina 1 y 2.

TNF- α puede proceder de numerosos tipos celulares. Entre estos se encuentran macrófagos, linfocitos T, mastocitos, granulocitos, células NK, fibroblastos, neuronas, queratinocitos y células de músculo liso. Además de su potente actividad proinflamatoria, TNF- α también tiene actividad citotóxica, es mediador en el proceso de eliminación de células tumorales y en la respuesta inmunitaria aguda o crónica de enfermedades inflamatorias e infecciosas (Dinarello, 1999). Las propiedades proinflamatorias sobre el endotelio vascular causan necrosis hemorrágica en tumores, daño tisular y *shock*. En algunos tumores y líneas celulares transformadas induce apoptosis. TNF- α también causa caquexia, estimulando la lipólisis, inhibiendo la actividad de la lipasa en adipocitos y estimulando la lipogénesis hepática.

La síntesis de TNF- α se estimula por patógenos, células tumorales, isquemia, trauma e irradiación, así como por citocinas como IFN γ , IL-1, IL-2, IL-12, factor estimulante de

colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor activador de plaquetas (PAF) y por el mismo TNF- α . TNF- α induce la síntesis de citocinas y otras moléculas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , TGF- β , PAF, leucotrienos, proteínas de fase aguda y hormonas (cortisol, adrenalina, glucagón, insulina, noradrenalina). Otros mediadores inducidos por TNF- α como IL-6, IL-10, PGE₂ y cortisol actúan a su vez como inhibidores de la expresión de TNF- α (Dinarello, 1999).

A baja concentración, TNF- α tiene efectos beneficiosos en tejidos ya que aumenta su capacidad defensiva contra infecciones. Sin embargo, altas concentraciones de TNF- α pueden comportar edema y daño tisular, e incluso pueden llegar a producir *shock* séptico. La alteración de los mecanismos de regulación inmunitarios pueden implicar aumento de la producción de TNF que puede activar de forma crónica a las células del sistema inmunitario innato, conduciendo a inflamación crónica (Keystone y col., 2010).

1.2.5.2 Interleucina 1

La interleucina 1 fue descrita originalmente como una sustancia pirógena secretada por leucocitos activados (Atkins, 1960). Posteriormente se descubrió que IL-1 correspondía a varias moléculas descritas en función de su capacidad funcional, como el factor activador de leucocitos con capacidad de incrementar la proliferación y producción de citocinas de linfocitos, el mediador endógeno leucocítico, inductor de la síntesis de proteínas de la fase aguda, el factor de células mononucleares, inductor de la síntesis de PGE₂ y colagenasa en células sinoviales, la catabolina, el factor activador de osteoclastos o la hematopoyetina.

La IL-1 puede ser IL-1 α o IL-1 β , subclases sintetizadas como péptidos precursores de 31 kDa que son divididos para generar las formas maduras de 17 kDa (Gabay y col., 2010). IL-1 α e IL-1 β se unen a los mismos receptores y estimulan señales intracelulares similares.

En general, IL-1 promueve el reclutamiento de células inflamatorias hacia la zona lesionada e induce la síntesis de varias enzimas como fosfolipasa A₂, COX-2 y óxido nítrico sintasa inducible (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS). IL-1 estimula la producción de varias proteinasas que conllevan la destrucción del tejido conectivo, e inhibe la producción de proteoglicanos y de colágeno tipo II, ejerciendo así un efecto global negativo sobre el cartílago articular. Además, IL-1 modula la maduración de osteoclastos, por lo que participa en el desarrollo de erosiones óseas (Jacques y col., 2006).

Respecto a sus efectos sistémicos, IL-1 está implicada en los procesos de fiebre, hipotensión, neutrofilia, trombocitosis y producción de proteínas de fase aguda. Asimismo, IL-1 está implicada en la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, induciendo la diferenciación de células Th17 y la producción de IL-17 en ratones y humanos (Acosta-Rodriguez y col., 2007; Chung y col., 2009).

1.2.5.3 Interleucina 6

La interleucina 6 fue descrita originariamente como factor de diferenciación no específica de linfocitos B que inducía la producción de inmunoglobulinas (Yoshizaki y col., 1982). IL-6 presenta un amplio rango de actividades biológicas y es sintetizada por numerosos tipos celulares como linfocitos T y B, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y mesangiales y una gran variedad de células tumorales.

IL-6 induce el crecimiento y diferenciación de linfocitos T citotóxicos mediante aumento de la expresión del receptor de IL-2 (IL-2R) y de la síntesis de esta citocina. También induce la diferenciación de macrófagos, megacariocitos y osteoclastos, y actúa como factor de crecimiento de células renales mesangiales, queratinocitos epidérmicos y varios tipos de células tumorales.

En las reacciones de fase aguda, IL-6 actúa sobre el hígado donde inhibe la síntesis de albúmina y estimula la producción de proteínas de fase aguda como CRP, fibrinógeno, α 1-antitripsina y proteína amiloide A sérica (Naka y col., 2002).

1.2.6 Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular (8-10 kDa) que se agrupan en 4 familias en función de los residuos de cisteína presentes en los ligandos: CXC, CC, C y CX3C. Cada ligando y cada receptor se denomina según el código de su familia seguido de una L o una R, respectivamente, y por un número de identificación (IUIS/WHO Subcommittee on chemokine nomenclature, 2003).

Entre las CXC se encuentra IL-8 (CXCL8). IL-8 es secretada por macrófagos activados, células endoteliales y otros tipos celulares y realiza su función activadora sobre neutrófilos, monocitos y eosinófilos.

Las CC suelen tener capacidad quimiotáctica sobre monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos. En esta familia se encuentran la proteína quimiotáctica de monocitos (*monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1 o CCL2), la eotaxina, la proteína inflamatoria de los macrófagos 1 α (*macrophage inflammatory proteins 1 α* , MIP-1 α) y la proteína RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*).

Las quimiocinas C son relativamente específicas de linfocitos y comprenden a la linfotactina- α (XCL1) y linfotactina- β (XCL2).

La familia CX3C sólo contiene un miembro definido hasta ahora, la fractalina (CX₃CL1). Esta quimiocina se presenta ligada a la superficie celular o soluble. En células endoteliales

induce adhesión de monocitos y linfocitos T a células endoteliales activadas (Stievano y col., 2004).

Una misma quimiocina se puede unir a varios receptores y diferentes ligandos pueden unirse al mismo receptor, es decir, existe redundancia funcional entre las quimiocinas que permite un mayor control de la respuesta inmunitaria. No obstante, existen diferencias en el tipo de unión de las quimiocinas a los receptores y a los glucosaminoglucanos, hay una separación temporal y espacial de su expresión, y además ocurre un procesamiento post-translacional de las quimiocinas, así como oligomerizaciones tanto en quimiocinas como en sus receptores (Allen y col., 2007).

Las quimiocinas son potentes activadores fisiológicos de la adhesión leucocitaria mediada por integrinas. Las quimiocinas activan a las integrinas para que se inicie la adhesión leucocitaria (Laudanna y col., 2002). Las quimiocinas pueden regular rápidamente la capacidad de unión de las integrinas de forma célula-específica, incrementando tanto su afinidad al ligando como el número de posibles uniones con el mismo (Ley y col., 2007). Estas funciones las realizan activando una compleja red de señales intracelulares que inducen cambios conformacionales en las integrinas (Constantin y col., 2000).

A pesar de tener un papel primordial en el funcionamiento del sistema inmunitario, tanto ligandos como receptores de quimiocinas están asociados a numerosas patologías, tales como enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, enfermedades pulmonares y vasculares, rechazo de trasplantes, cáncer y SIDA.

1.2.7 Enzimas proteolíticos

Los enzimas proteolíticos cumplen diversas funciones en la respuesta inflamatoria, degradando la matriz extracelular y las proteínas de la membrana basal. Entre estos enzimas se encuentran elastina, catepsinas y proteinasas de la matriz. Estas proteasas realizan importantes funciones en diversos procesos como la defensa del huésped, la remodelación tisular y la migración leucocítica (Medzhitov, 2008).

1.3 Células implicadas en la respuesta inflamatoria

En la respuesta inflamatoria intervienen diversos tipos celulares:

- Neutrófilos, que migran al lugar de la lesión y fagocitan patógenos en respuesta a mediadores solubles.
- Monocitos y macrófagos, que complementan la función fagocítica de neutrófilos en la fase aguda y son fundamentales en la fase crónica.
- Linfocitos, que secretan citocinas y anticuerpos.

- Eosinófilos, que secretan proteínas y radicales libres que ayudan a combatir a los microorganismos infecciosos.
- Plaquetas, que liberan mediadores inflamatorios, activan a neutrófilos e interactúan con linfocitos para favorecer la síntesis de prostaglandinas.
- Células endoteliales, que contribuyen a la migración de neutrófilos y liberan mediadores inflamatorios.

Para que los leucocitos realicen su función en una región inflamada, el endotelio vascular debe permitir su extravasación de forma selectiva, mientras evita la salida de eritrocitos. (Poher y col., 2007). La extravasación celular a través del endotelio comprende la adhesión leucocitaria y la migración transendotelial. La adhesión leucocitaria está mediada por dos tipos de moléculas presentes en su membrana: las selectinas, que provocan el proceso de rodamiento, y las integrinas, que lo unen al endotelio vascular (Butcher, 1991).

El rodamiento se debe a las moléculas denominadas selectinas, formadas por una familia de tres lectinas tipo C. La L-selectina se expresa constitutivamente en leucocitos, la E-selectina se expresa en células endoteliales y la P-selectina se expresa en plaquetas y endotelio. Las selectinas interactúan con el ligando 1 de la glucoproteína P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand-1*, PSGL1) y con otros ligandos como CD44 y ligando 1 de E-selectina (*E-selectin ligand-1*, ESL-1) (Hidalgo y col., 2007).

La interacción de las selectinas con su ligando no sólo permite la adhesión de los leucocitos al endotelio inflamado, sino que también activa señales intracelulares en las células adheridas. En células mieloides, PSGL1 activa una vía de señalización que implica a la tirosina quinasa de bazo (*spleen tyrosine kinase*, SYK) y a proteínas de la familia de ezrina/radixina/moesina (ERM) (Urzainqui y col., 2002). La unión de neutrófilos humanos aislados a E-selectina activa la cascada p38 de MAPK (Simon y col., 2000). En el rodamiento también participan integrinas como $\alpha_4\beta_1$ -integrina (también llamada *very late antigen-4*, VLA4) o β_2 -integrina (Ley y col., 2007).

Los leucocitos circulantes, excepto linfoblastos y monocitos, presentan integrinas en forma no activada para evitar su unión no específica al endotelio vascular o a otros leucocitos circulantes con ligandos de integrinas, como la molécula de adhesión intercelular (*intercellular adhesion molecule*, ICAM) 1 y la ICAM-3 (Laudanna y col., 2006). Las quimiocinas activan a las integrinas y se inicia la adhesión leucocitaria. La adhesión de los leucocitos al endotelio vascular depende del tipo de leucocito y del ligando endotelial, de la cooperación entre integrinas α_4 , como $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) o $\alpha_4\beta_7$, e integrinas de la subfamilia β_2 , como $\alpha_L\beta_2$ (LFA1) o $\alpha_M\beta_2$ (*macrophage-1 antigen*, Mac-1) (Springer, 1994).

La migración celular transendotelial hacia los tejidos inflamados es el paso final en la extravasación celular (**Figura 7**). Antes de migrar a través de las paredes de las vénulas postcapilares altas (*high endothelial venules*, HEV), neutrófilos y monocitos se arrastran

lentamente por el endotelio mediante mecanismos dependientes de Mac-1 y de ICAM-1, hasta alcanzar el lugar definitivo de migración (Phillipson y col., 2006). Esta migración puede realizarse por dos vías, la vía paracelular o, en zonas endoteliales especialmente delgadas, la vía transcelular. Tras atravesar las células endoteliales, los leucocitos penetran a través de la membrana basal vascular y de la cubierta de pericitos. Esta migración puede ocurrir a través de los espacios entre pericitos adyacentes o a través de regiones de la matriz extracelular con baja concentración de proteínas (Ley y col., 2007).

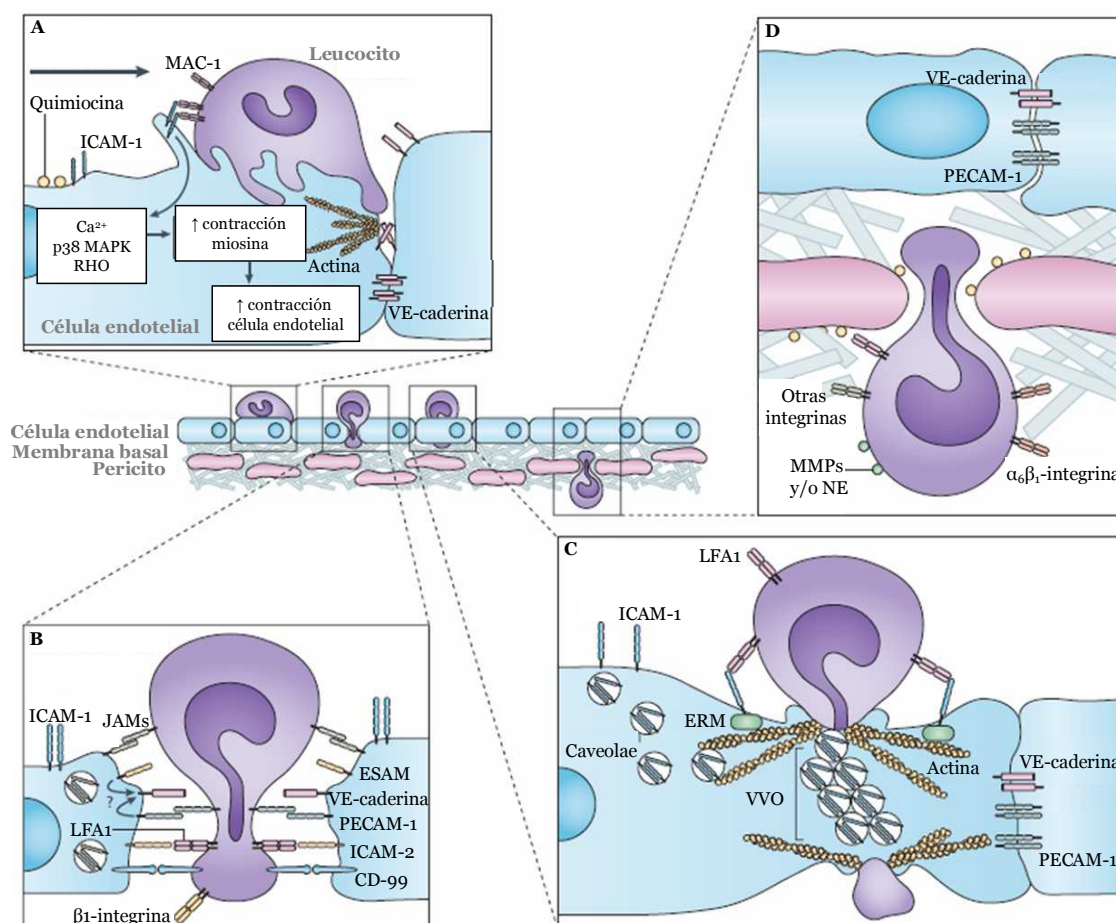


Figura 7.- Migración leucocitaria. A) Arrastre de leucocitos antes de la migración a través de las células endoteliales, B) migración leucocitaria a través de la vía paracelular, C) migración leucocitaria a través de la vía transcelular, D) migración a través de pericitos y matriz extracelular (adaptado de Ley y col., 2007).

Tras su extravasación, los leucocitos migran hasta el foco de lesión por el mecanismo de quimiotaxis, movimiento dirigido por un gradiente de productos bacterianos, citocinas, componentes del sistema del complemento y metabolitos del ácido araquidónico. Estas moléculas son detectadas por GPCR que emiten señales de polimerización de la actina, aumentando su concentración en la zona de avance de la célula.

Una vez que los leucocitos alcanzan el tejido lesionado mediante los mecanismos de extravasación leucocitaria, éstos se activan por contacto directo con los patógenos o por la acción de citocinas secretadas por las células residentes. La activación leucocitaria ocurre por la unión de los estímulos a alguno de los receptores que expresan estas células: TLRs, GPCRs, receptores de opsoninas y receptores de citocinas. El reconocimiento de microorganismos o células muertas por parte de neutrófilos y monocitos induce el proceso de fagocitosis, el cual tiene lugar en tres etapas: reconocimiento y unión a la partícula a ingerir, englobamiento de la partícula y formación de la vesícula fagocítica y destrucción o degradación del material fagocitado.

1.3.1 Neutrófilos

Los neutrófilos representan la primera línea de defensa del organismo contra patógenos tales como bacterias y constituyen el 40-60% de los leucocitos circulantes.

Los neutrófilos tratan de eliminar agentes invasores mediante la liberación del contenido de sus gránulos. Primero movilizan las vesículas secretoras, a continuación, los gránulos de gelatinasa y los gránulos específicos y, por último, los gránulos azurófilos. El arsenal de proteasas que poseen los neutrofilos generan especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y de nitrógeno (*reactive nitrogen species*, RNS) que pueden destruir rápidamente al patógeno lesivo (Wright y col., 2010).

Estos potentes efectores de la respuesta inflamatoria provocan daños colaterales en el tejido ya que no son capaces de discriminar entre el tejido y los patógenos (Nathan, 2006).

Los neutrófilos activados también son capaces de presentar antígenos vía MHC-II, estimulando así la activación y proliferación de linfocitos T. Asimismo, los neutrófilos sintetizan y secretan citocinas, como IL-1, IL-1RA, IL-12 y TGF β ; quimiocinas, como IL-8; leucotrienos, principalmente LTB $_4$ y prostaglandinas, principalmente PGE $_2$ (Wright y col., 2010), por lo que también reclutan otras células inmunitarias hacia la región lesionada, como macrófagos.

1.3.2 Macrófagos

Los macrófagos y las células dendríticas (*dendritic cells*, DC) se diferencian a partir de monocitos sanguíneos cuando migran hacia los tejidos (Cools y col., 2007).

El reclutamiento de macrófagos en la zona lesionada es básico durante la fase de resolución de la respuesta inflamatoria, ya que estas células fagocitan a neutrófilos muertos y a sus productos, así como a células en estado apoptótico. Los macrófagos, además, contribuyen a la resolución de la respuesta inflamatoria produciendo mediadores como TGF β e IL-10. La TGF β induce la producción de componentes de la matriz extracelular y

contribuye así a la reparación tisular (Huynh y col., 2002). IL-10 inhibe la síntesis y acción de otras citocinas proinflamatorias (Mege y col., 2006). Paradójicamente, la producción de TNF por parte de macrófagos también puede contribuir a la resolución de la inflamación ya que puede unirse al receptor TNF-RI, dominio que induce la apoptosis celular (Shen y col., 2006).

1.4 Estrés oxidativo en la respuesta inflamatoria

La utilización de oxígeno por parte de las mitocondrias de las células aeróbicas genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen radicales libres como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y también el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros peróxidos orgánicos. En condiciones de hipoxia, la cadena respiratoria mitocondrial también produce óxido nítrico (NO), que puede generar especies reactivas de nitrógeno (RNS). Los RNS a su vez pueden originar otras especies reactivas induciendo peroxidación lipídica (Poyton y col., 2009). Los radicales libres pueden participar en un gran número de reacciones subsiguientes a su formación a través de las cuales se forman nuevos metabolitos reactivos (**Figura 8**).

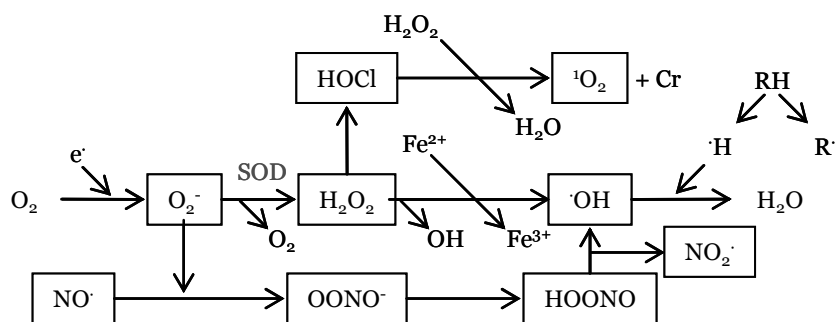


Figura 8.- Relación entre radicales libres y sus metabolitos (adaptado de Durackova, 2010).

El NO se origina a partir de L-arginina por acción de la sintasa de NO (*nitric oxide synthase*, NOS). Existen 3 isoformas de NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). En condiciones fisiológicas, la mayor parte del NO es sintetizado por la eNOS. En ciertos vasos, como en los cerebrales, el NO también es sintetizado por la nNOS presente en neuronas de la capa adventicia vascular. Tanto eNOS como nNOS son constitutivas en células sanas. Sin embargo, la iNOS se activa en estados inflamatorios inducidos por endotoxinas o citocinas (Vallance y col., 2001). Una vez sintetizado, NO difunde a través de la membrana celular endotelial, entra en las células del músculo liso vascular, activa a la guanilato ciclasa, e incrementa la concentración de cGMP intracelular que produce la relajación vascular y, por lo tanto, vasodilatación (Moncada y col., 2006). El cGMP media los efectos biológicos de NO sobre el tono vascular y la función plaquetaria. El NO, además de su potente acción vasodilatadora, también evita la

agregación plaquetaria, la migración leucocitaria y la adhesión celular al endotelio y atenúa la proliferación y la migración de leucocitos (Vallance y col., 2001).

ROS y RNS son productos normales del metabolismo celular y presentan efectos beneficiosos a bajas concentraciones. Las ROS juegan un importante papel en la señalización intracelular y NO induce vasodilatación y regula la activación plaquetaria. Sin embargo, el exceso de oxidantes puede producir importantes daños moleculares y celulares.

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos y su eliminación o neutralización, por medio de mecanismos protectores y antioxidantes (Durackova, 2010). Durante la respuesta inflamatoria, los mastocitos y leucocitos reclutados incrementan el consumo de oxígeno y liberan ROS (Hussain y col., 2003). Por otra parte, las citocinas y quimiocinas liberadas por las células efectoras de la respuesta inflamatoria pueden activar factores de transcripción que median la respuesta inmediata ante estrés celular como NF- κ B, transductor de señales y activador de transcripción 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3), factor 1 α inducible por hipoxia (*hypoxia-inducible factor-1 α* , HIF-1 α), proteína activadora 1 (*activator protein-1*, AP-1), factor nuclear de linfocitos T activados y el factor 2 relacionado con NF-E2 (*NF-E2 related factor-2*, Nrf2). Por otro lado, la inducción de COX-2 y de la iNOS, la expresión aberrante de citocinas inflamatorias como TNF, IL-1 e IL-6, y de quimiocinas y sus receptores como IL-8 y el receptor 4 de la quimiocina CXC (*CXC chemokine receptor 4*, CXCR4) producidas por las células efectoras de la respuesta inflamatoria, así como alteraciones en la expresión de microRNAs específicos, parece que también juegan un papel en la inflamación inducida por estrés oxidativo (Hussain y col., 2007). Este ambiente inflamatorio/oxidativo conduce a un círculo vicioso que puede dañar a células epiteliales y estromales circundantes e incluso puede conducir a la carcinogénesis tras un largo periodo de tiempo (Federico y col., 2007, Reuter y col., 2010).

El organismo posee un sistema de antioxidantes para preservarlo del exceso de oxidantes. Este sistema está formado por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa, catalasa, transferrina y metalotioninas, y antioxidantes no enzimáticos, como glutatión, albúmina, ácido úrico, ácido lipoico, ubiquinol, etc... Además, antioxidantes exógenos procedentes de la dieta como las vitaminas C, D y E, y flavonoides ayudan al organismo a mantener su equilibrio redox (Durackova, 2010).

1.5 La respuesta inflamatoria aguda

La inflamación aguda es la primera respuesta ante una lesión y puede durar desde minutos hasta varios días. Es una respuesta inespecífica que aparece antes de que se establezca la

respuesta inmunitaria adaptativa y tiene como finalidad eliminar al agente lesivo y limitar la magnitud de la agresión. La respuesta inflamatoria aguda implica la aparición de componentes sanguíneos (proteínas plasmáticas y leucocitos) en el sitio de infección o lesión.

Existen tres tipos de señales de lesión tisular que provocan la liberación de mediadores inflamatorios. Las neuronas liberan péptidos bioactivos en respuesta al dolor, producido por la estimulación de nociceptores por parte de ATP liberado por células muertas o por bradicinina, generada a partir de la cascada proteolítica inducida por el daño vascular (Basbaum y col., 2009). Por otro lado, las células lesionadas liberan proteínas intracelulares producidas constitutivamente, como las proteínas *heat-shock*, el factor de transcripción de grupo B1 de alta movilidad (*high mobility group B1*, HMGB1) y péptidos mitocondriales que presentan el grupo N-formilo, característico de proteínas procariontas, lo que provoca la producción de citocinas. En el caso de infección por microorganismos, éstos o sus productos son detectados a través de su unión a receptores solubles del organismo, como moléculas del sistema del complemento, proteínas de unión a manosa y de unión a lipopolisacárido, y a receptores celulares como TLRs, NLRs o RLRs (Nathan, 2002).

La lesión inicial comporta la activación de macrófagos y mastocitos residentes en el tejido (**Figura 9**), los cuales intentan eliminar al organismo patógeno o restos celulares mediante fagocitosis, activando la liberación de mediadores inflamatorios. Algunos de los mediadores producidos por mastocitos residentes y células endoteliales de la zona lesionada actúan sobre los vasos cercanos induciendo cambios en su calibre y su flujo para facilitar la salida de plasma y el reclutamiento de leucocitos circulantes. Concretamente, de forma inmediata a la lesión se produce una vasoconstricción transitoria de las arteriolas subyacentes mediada por aminas vasoactivas y eicosanoides (Monaco y col., 2003). A continuación, tiene lugar la vasodilatación arteriolar provocada principalmente por histamina, NO, leucotrienos y prostaglandinas (PGI₂, PGD₂, PGE₂ y PGF_{2α}), mediadores que inducen eritema (*rubor*) y calor en la zona lesionada. Asimismo aumenta la permeabilidad vascular a causa de la contracción de las células endoteliales, mediada por histamina, bradicinina, leucotrienos y sustancia P, permitiendo así que las proteínas plasmáticas salgan al compartimento intersticial. La salida de este exudado desarrolla el cuarto signo de la respuesta inflamatoria, el edema (Aller y col., 2004). La vasodilatación permite la llegada de mediadores solubles y células efectoras de la respuesta inflamatoria a la zona lesionada (Sherwood y col., 2004).

Además de la salida de proteínas plasmáticas en la zona lesionada, se produce la extravasación leucocitaria, principalmente neutrófilos, a través de mecanismos de adhesión leucocitaria y migración transendotelial (apartado 1.3). Cuando los leucocitos extravasados se ponen en contacto con microorganismos o mediadores de la respuesta inflamatoria

aguda, como citocinas, se estimulan y se activa la formación de nuevos mediadores inflamatorios.

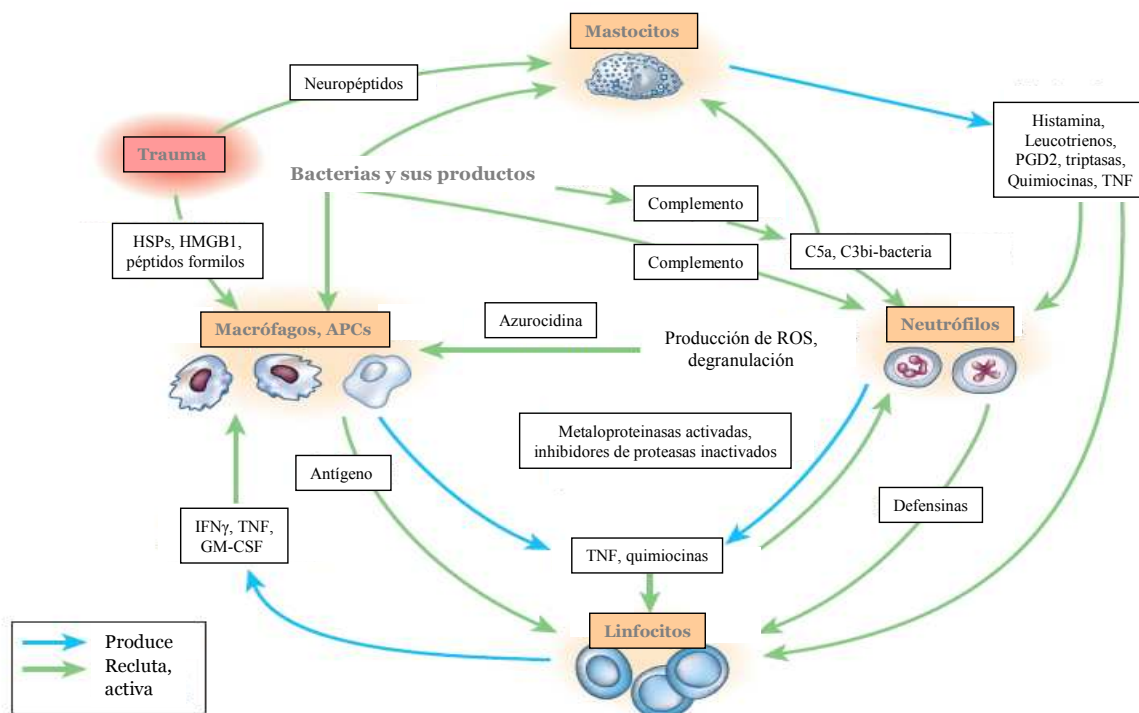


Figura 9.- Flujo de información en las primeras etapas de trauma con infección (adaptado de Nathan, 2002).

Se asume que la fase aguda de la inflamación es beneficiosa para el individuo ya que es una respuesta muy conservada entre especies animales. Sin embargo, existen casos en los que se observan manifestaciones sistémicas después de una respuesta inflamatoria aguda que constituyen la ‘respuesta de fase aguda’. Estas manifestaciones sistémicas se producen cuando los mediadores químicos generados en el sitio inflamado alcanzan la sangre y se distribuyen por todo el organismo (Cone, 2002). Entre los síntomas de la respuesta de fase aguda se incluyen fiebre, somnolencia, letargo, anorexia, etc... (**Tabla 4**).

La respuesta inflamatoria aguda puede evolucionar a:

- Resolución completa de la inflamación
- Cicatrización y sustitución por tejido conectivo (fibrosis) en caso de que se haya producido una importante destrucción tisular, de que la lesión afecte a tejidos no regenerativos, o de que haya habido una abundante exudación de fibrina hacia tejidos o cavidades serosas
- Progresión hacia una respuesta inflamatoria crónica

Tabla 4.- Características de la respuesta de fase aguda (adaptado de Cone, 2001).

Cambios Sistémicos	
Proteínas plasmáticas	Incremento de proteína C reactiva (CRP), proteína amiloide A sérica, componentes del sistema del complemento, fibrinógeno, plasminógeno, ceruloplasmina, haptoglobina, IL-1RA y fibronectina Decremento de albúmina, transferrina, globulinas de unión a tiroxina y α -fetoproteína
Componentes plasmáticos no proteicos	Incremento de cobre Decremento de zinc e hierro.
Cambios endocrinos	Incremento de catecolaminas, cortisol, arginina, vasopresina Decremento del factor de crecimiento insulínico tipo 1
Cambios hematológicos	Leucocitosis, trombocitosis
Cambios metabólicos	Incremento de la tasa metabólica y lipólisis, fiebre Decremento de gluconeogénesis
Cambios comportacionales	Somnolencia, letargo, anorexia

1.6 Resolución de la respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria aguda finaliza cuando el daño producido por el inductor es eliminado y el tejido es reparado. La finalización de la respuesta inflamatoria es un proceso activo y regulado, conocido como resolución de la inflamación. Los mecanismos reguladores que conllevan la resolución de la respuesta inflamatoria implican un cambio en la secreción de mediadores.

La interacción de plaquetas y leucocitos en vasos sanguíneos provoca la producción de lipoxinas A₄ y B₄, que actúan como señales de parada ya que bloquean el reclutamiento de neutrófilos desde las vénulas postcapilares.

En la zona inflamada, las prostaglandinas señalizan el final de la respuesta inflamatoria activando la regulación transcripcional de la lipooxigenasa 15 en neutrófilos. De este modo, en estas células se activa la producción de lipoxinas a partir del ácido araquidónico. La disminución de la migración de neutrófilos hacia el foco inflamatorio se asocia también a un cambio en los mediadores lipídicos a resolvinas de las series D y E y protectinas. Estos cambios en la producción de eicosanoides inician la resolución de la inflamación. Si el inductor inflamatorio no es eliminado y persiste, no tiene lugar la fase de resolución (Serhan y col., 2005).

1.7 La respuesta inflamatoria crónica

El bloqueo de alguno de los pasos de la respuesta inflamatoria aguda puede desviar el proceso hacia un patrón patológico. Así, se pueden originar granulomas por la infiltración de leucocitos, fibrosis por la formación de paquetes de colágeno que puede llegar a la

distorsión tisular e incluso a la transformación neoplásica de algunas células debido a la oxidación del DNA por una respuesta inflamatoria persistente (Nathan, 2002).

Una respuesta inflamatoria puede convertirse en patológica si se cronifica o se exagera. La etiología y los mecanismos de la respuesta inflamatoria crónica son mucho menos conocidos que los de la respuesta inflamatoria aguda.

Clásicamente, la cronificación de la respuesta inflamatoria se ha definido como un bucle de procesos sin resolución que desemboca en una patología crónica. Este estado puede ser causado por infecciones crónicas, daños tisulares no reparados, contacto persistente con alérgenos, partículas extrañas indigeribles o cristales endógenos como el urato monosodio. Este tipo de respuesta inflamatoria crónica está localizada típicamente en la zona donde el inductor inflamatorio está presente y, a veces, provoca la remodelación de los tejidos locales (Medzhitov, 2010).

Sin embargo, la respuesta inflamatoria crónica no siempre está causada por los inductores clásicos de la inflamación, es decir, por infección o por lesión. La respuesta inflamatoria crónica también puede estar asociada a enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario como la autoinmunidad y la alergia. Una enfermedad autoinmune puede ser causada por una reacción inmunitaria autoperepetuada contra tejidos del propio organismo, como son la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple, o bien por una reacción inmunológica no controlada contra patógenos, como es la enfermedad inflamatoria intestinal.

Paradójicamente, la resolución de la respuesta inflamatoria y la respuesta inflamatoria crónica comparten numerosos mediadores y efectores, como componentes del sistema del complemento, quimiocinas y citocinas. Los macrófagos juegan un papel primordial en la resolución de la inflamación, pero pueden contribuir a la lesión tisular y al mantenimiento de la respuesta inflamatoria crónica como resultado del estrés celular crónico (Gordon y col., 2003). Quimiocinas y citocinas secretadas por macrófagos activados, como TNF e IL-1, inducen el reclutamiento de linfocitos, que son fundamentales durante la respuesta inflamatoria crónica mediada por anticuerpos y células. A su vez los linfocitos T activados producen citocinas que reclutan macrófagos de la circulación y los activan (como IFN γ). Esta compleja interacción entre macrófagos y linfocitos hace que una respuesta inflamatoria tienda a agravarse y cronificarse.

1.8 La artritis reumatoide como enfermedad inflamatoria crónica

La artritis reumatoide (*rheumatoid arthritis*, RA) es una enfermedad inflamatoria articular de origen desconocido que afecta al 1% de la población mundial. La RA se define como

una enfermedad inflamatoria sistémica autoinmune caracterizada principalmente por sinovitis crónica simétrica y erosiva de las articulaciones sinoviales. Los pacientes que padecen RA presentan diferentes autoanticuerpos séricos y exhiben destrucción de las articulaciones pequeñas sinoviales. Además la RA puede afectar también a otros tejidos y órganos como piel, vasos sanguíneos, corazón, pulmones y músculos.

El término de artritis reumatoide deriva del de fiebre reumática (del griego *rheumatos*: flujo) que cursa con dolor en articulaciones. La RA se conoce desde la antigüedad. En el libro hindú '*Caraka Samhita*', escrito entre el año 500 a.C. y el 100 d.C., aparece una descripción bastante ajustada a la de la RA y diversos autores, desde Hipócrates hasta Galeno, hacen referencia a dolencias y deformaciones articulares atribuibles a la RA. No obstante, la primera descripción reconocida de la RA fue publicada en la tesis doctoral de Augustin Jacob Landré-Beauvais en 1800, en la que describía la poliartritis en una serie de mujeres a la que denominó 'gota asténica primitiva'.

1.8.1 Etiología de la artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad de origen multifactorial en la que están implicados tanto factores ambientales como genéticos. La RA es más común en mujeres que en hombres, presenta una mayor prevalencia en individuos entre 40 y 70 años, y en su desarrollo también influyen la etnia y factores ambientales como tabaquismo, agentes contaminantes y dieta (Tobón y col., 2010). Se ha descrito que dietas ricas en pescado, aceite de oliva y vegetales protegen de la RA debido a su alto contenido en ácidos grasos ω -3 (Rosenbaum y col., 2010). Un elevado consumo de vitamina D también comporta un menor riesgo de padecer RA. La vitamina K, presente en legumbres y vegetales, puede inhibir la proliferación de sinoviocitos disminuyendo así la gravedad de la RA (Tobón y col., 2010).

Por otro lado, el desarrollo de la RA se asocia a factores genéticos en un 50-60% de los casos. El principal gen relacionado con la RA es el HLA-DR1, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad en 1 de cada 3 casos (Lee y col., 2009). El epítipo de susceptibilidad es QKRAA o QRRAA, presente también en otros genes DR asociados a RA, como DR4 y DR14. La presencia del epítipo de susceptibilidad también influye en la gravedad de la enfermedad ya que se asocia a un mayor riesgo de desarrollar RA extrarticular y erosiva (Weyand y col., 1992). Otro factor de susceptibilidad genética para desarrollar RA se localiza en el cromosoma 1, en el gen de la tirosina fosfatasa PTPN22. La sustitución de un solo nucleótido en posición 1856 en este gen hace que la proteína transcrita presente triptófano en lugar de arginina en posición 620, lo cual permite a los linfocitos T específicos de autoantígeno escapar de la delección clonal, predisponiendo así a padecer autoinmunidad (Begovich y col., 2004). En la RA también se han identificado polimorfismos de TRAF1-C5 y TNFAIP3.

1.8.2 Patogenia de la artritis reumatoide

La destrucción de las articulaciones sinoviales en RA se debe a una respuesta continuada del sistema inmunitario, con activación de linfocitos y producción de mediadores inflamatorios. La teoría patogénica más aceptada hasta hace unos años era que la RA se desencadena por la exposición de un individuo genéticamente susceptible a un antígeno artritogénico. No obstante, existe otra hipótesis alternativa en la que se plantea que el inicio de la inflamación sinovial se produce por mecanismos independientes del antígeno iniciados por la respuesta inmunitaria innata que derivan posteriormente en una respuesta del sistema inmunitario adaptativo (García de Vicuña y col., 2005).

Para comprender los cambios morfológicos que se producen en la RA es necesario explicar la estructura de una articulación sinovial normal. La articulación sinovial se caracteriza por presentar una cavidad articular revestida por la membrana sinovial, que contiene líquido sinovial, por presentar los extremos óseos recubiertos por cartílago articular y por estar unida mediante una cápsula articular (**Figura 10**). La membrana sinovial está formada por tejido conectivo vascular que produce el líquido sinovial, el cual nutre al cartílago y lubrica las superficies articulares. Esta membrana presenta una monocapa poco vascularizada de sinoviocitos en la capa íntima y un espacio subsinovial de estroma conjuntivo relativamente acelular. La cápsula articular se define como una cápsula fibrosa que encierra a las superficies que se articulan y a la cavidad articular. Las articulaciones sinoviales presentan frecuentemente ligamentos accesorios que las refuerzan (Moore y col., 2003).

Durante las primeras etapas de la RA se produce neoangiogénesis inducida por factores angiogénicos, principalmente el factor de crecimiento vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), y activación del endotelio de las HEV, que recluta desde la circulación sanguínea leucocitos activados, incluyendo macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T, mastocitos y células NK y NKT. Reforzada por el incremento de vascularización se produce sinovitis con hipertrofia e hiperplasia de sinoviocitos tanto de tipo macrófago (tipo A) como de tipo fibroblasto (tipo B). Con el progreso de la enfermedad, la sinovitis da lugar al cambio histológico más característico de la RA, la formación del *pannus* (**Figura 10**). Este *pannus* es un tejido de granulación, invasivo y altamente vascularizado, compuesto fundamentalmente por sinoviocitos activados que, a través de la producción de metaloproteinasas, invaden el cartílago. La progresiva destrucción del cartílago da lugar al pinzamiento del espacio articular. La invasión del tejido óseo por el *pannus* produce erosiones óseas y acaba destruyendo el hueso subcondral, la cápsula articular, tendones y ligamentos.

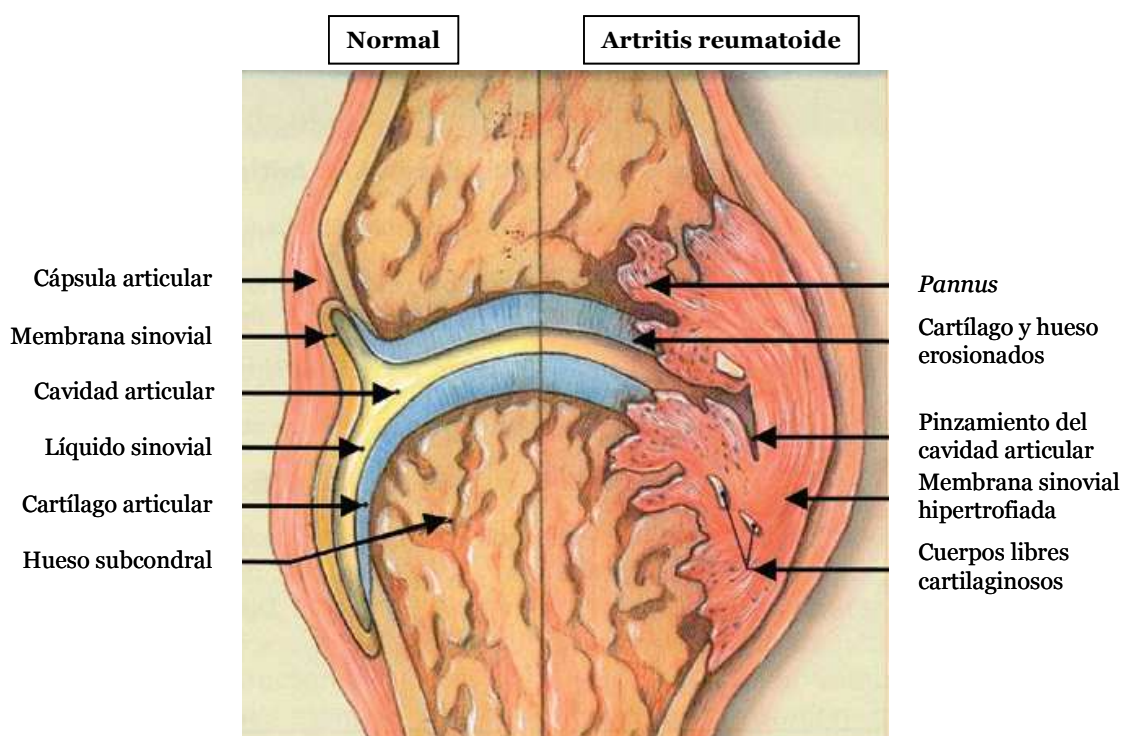


Figura 10.- Estructura de una articulación sinovial normal y afectada por artritis reumatoide (adaptado de García de Vicuña y col., 2005).

Paradójicamente, a pesar de presentar una gran vascularización, la lesión sinovial en RA se encuentra en un ambiente marcadamente hipóxico y ácido, con baja concentración de glucosa y alta concentración de lactato, indicativo de un metabolismo anaeróbico (Taylor y col., 2005). Los factores que contribuyen a la hipoxia en las articulaciones con RA son principalmente la alta demanda metabólica del tejido sinovial inflamado y la rápida tasa de proliferación sinovial (Stevens y col., 1991). Por otro lado, la expresión local de enzimas degradativos en RA, como metaloproteinasas, serin-proteasas y agrecanasas, provocan la digestión de la matriz extracelular y la destrucción de las estructuras articulares (Firestein, 2003).

En las articulaciones de pacientes con RA, los linfocitos Th y B y los macrófagos infiltrados pueden llegar a formar agregados linfoides discretos con centros germinales, asociados a la expresión de $LT\beta$, CCL13 y CCL21. Recientemente se ha demostrado que estos centros germinales pueden contribuir a la maduración y cambio de clase de linfocitos B y, por tanto, pueden promover la producción de autoanticuerpos dirigidos contra autoantígenos articulares, sistémicos y/o péptidos antigénicos de agentes infecciosos (Humby y col., 2009).

Las citocinas juegan un papel primordial en la perpetuación de la RA. Curiosamente, citocinas propias de linfocitos T como IL-2 e $IFN\gamma$ se encuentran presentes en relativa baja concentración en tejido y líquido sinovial, mientras que productos propios de macrófagos y fibroblastos son abundantes, principalmente IL-1, IL-6, $TNF-\alpha$, IL-15, IL-18, GM-CSF,

quimiocinas, etc... (Firestein y col., 2003). Parece ser que existe una red paracrina y autocrina de citocinas que perpetúa la sinovitis de las articulaciones en RA, así como la acumulación de leucocitos, ya que los sinoviocitos del revestimiento sinovial producen factores que mantienen la inflamación (**Figura 11**). Estas células a su vez son capaces de expresar otras citocinas, metaloproteinasas, prostaglandinas y NO. Las intervenciones terapéuticas con inhibidores de citocinas subrayan la importancia de éstas en la RA. Fármacos contra TNF- α ralentizan o previenen la progresión de las lesiones en hueso y cartílago (Lipsky y col., 2000).

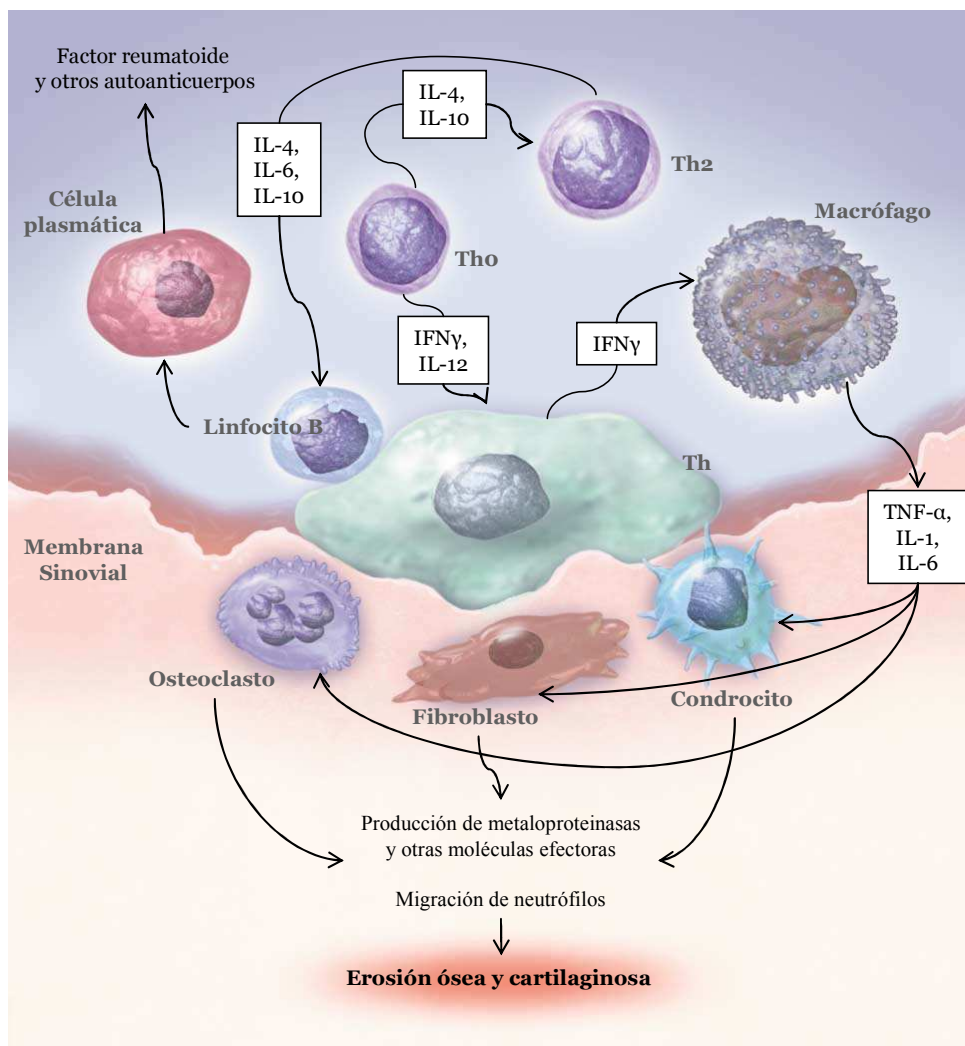


Figura 11.- Vías de señalización por citocinas implicadas en la artritis inflamatoria (adaptado de Choy y col., 2001).

1.8.3 Autoinmunidad en la artritis reumatoide

La respuesta humoral que se presenta en pacientes con RA incluye numerosos autoanticuerpos contra diversos autoantígenos articulares (colágeno tipo II, proteína p205, agregano y otras proteínas del cartílago), sistémicos (región Fc de la IgG, filagrina, proteína p68, ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares y glucosa 6 fosfato isomerasa) y

péptidos antigénicos de agentes infecciosos (glucoproteína 110 del virus Epstein Barr, proteínas de *Mycoplasma*, proteínas tipo *heat shock* de micobacterias) (García Vicuña y col., 2005).

El factor reumatoide fue el primer autoanticuerpo observado por Waaler en 1939, y posteriormente fue caracterizado por Kunkel (Franklin y col., 1957). El factor reumatoide es un anticuerpo generalmente de clase IgM dirigido contra la IgG concretamente contra los dominios $\gamma 2$ - $\gamma 3$ del Fc (Song y col., 2010). En 1973 se consideró que el factor reumatoide era el principal factor patogénico de la RA ya que forma inmunocomplejos que activan al sistema del complemento y conducen a la liberación de factores quimiotácticos como C5a, que atraen células inflamatorias, en particular neutrófilos, hacia la articulación sinovial (Zvaifler, 1973). Sin embargo, el factor reumatoide se encuentra también en personas sanas y en pacientes con otras patologías inflamatorias crónicas como hepatitis B crónica, por lo que no puede ser considerado como el agente causal de la RA (Duskin y col., 2010). No obstante, el factor reumatoide es un buen indicador clínico ya que, en general, pacientes seropositivos para este autoanticuerpo desarrollan una enfermedad más grave (Bas y col., 2002).

El colágeno tipo II es uno de los principales constituyentes del cartílago articular. Aunque los anticuerpos contra colágeno tipo II fueron identificados en el suero de pacientes con RA hace más de 20 años, su prevalencia y significado aún no están totalmente claros, por lo que no son considerados diagnósticos ni indicadores de la actividad de esta enfermedad (Duskin y col., 2010), aunque son importantes en modelos animales para el estudio de RA como en la artritis inducida por colágeno. Otros autoanticuerpos presentes en pacientes que padecen RA son los anticuerpos contra Jo-I, anticuerpos antinucleares y anticuerpos antiglucosa-6-fosfato isomerasa.

Los anticuerpos contra proteínas o péptidos citrulinados postraduccionalmente constituye otra respuesta autoinmune en la RA, definida en el año 2000. El determinante antigénico incluye el aminoácido citrulina, que se produce cuando la arginina es modificada por el enzima peptidil-arginina deiminasa (*peptidyl-arginine deiminase*, PAD) (Børretzen y col., 1997). Desde su primera descripción se han identificado numerosos anticuerpos de este tipo como el factor antiperinuclear (*antiperinuclear factor*, APF), el anticuerpo contra queratina (*anti-keratin antibody*, AKA), el anticuerpo contra filagrina (*antifilaggrin antibody*, AFA), el anticuerpo contra Sa y los anticuerpos contra péptido citrulinado cíclico (*anti-cyclic citrullinated peptide*, anti-CCP). APF y AKA generalmente se encuentran en pacientes con RA de larga duración y raramente se detectan en RA temprana (Duskin y col., 2010). Estos anticuerpos séricos son capaces de unirse a fibrina y se ha observado de forma característica depósitos de fibrina en el tejido sinovial de pacientes con RA (Masson-Bessiere y col., 2001). El anticuerpo contra Sa reacciona contra el citoesqueleto, concretamente contra la vimentina citrulinada. Este anticuerpo se ha encontrado en bazo, placenta y *pannus* reumatoide humanos (Vossenaar y col., 2004) y se asocia con

manifestaciones articulares graves, siendo tres veces más prevalente en pacientes con erosión articular grave (Hayem y col., 1999), por lo que se considera indicador de RA erosiva. Los anticuerpos séricos anti-CCP también se correlacionan con una mayor destrucción articular (Vallbracht y col., 2004). Parece que algunos factores de riesgo a desarrollar RA, como el alelo HLA-DRB1 o el tabaquismo, promueven el desarrollo de anticuerpos anti-CCP (Cooles y col., 2011).

A pesar de la estrecha relación entre los autoanticuerpos contra proteínas citrulinadas y la RA, estos anticuerpos también se han identificado en otras enfermedades como poliartritis inflamatoria, lupus eritematoso, esclerosis sistémica, artritis psoriática, artritis idiopática juvenil o infección crónica por virus de la hepatitis C (Duskin y col., 2010).

1.8.4 Semiología de la artritis reumatoide

El inicio de la clínica de RA en el 60% de los casos es insidiosa, lenta y gradual, y casi siempre predominan manifestaciones sistémicas no específicos como astenia, anorexia, fatiga, pérdida de peso y febrícula, que permanecen durante semanas o meses antes de la afectación articular (Felson, 1993). No obstante, la enfermedad puede aparecer siguiendo otros patrones denominados inicio agudo o intermedio (8-15% de los casos), en el que las manifestaciones articulares se instauran en pocos días, inicio como la enfermedad de Still, en el que el síntoma predominante es la fiebre y se asocia a complicaciones como vasculitis o serositis, inicio palindrómico, inicio agudo con dolor e inflamación de una o dos articulaciones que remite espontáneamente en horas o días, e inicio de RA tardía, en el que se presentan características semejantes a la polimialgia reumática (Sánchez y col., 2009).

1.8.4.1 Manifestaciones articulares

Las manifestaciones articulares, en la mayoría de los pacientes con RA, se caracterizan por inflamación de una o varias articulaciones pequeñas sinoviales de manera simétrica y por afectación con dolor articular. La sinovitis se manifiesta por aumento de volumen blando y sensible en articulaciones sinoviales. El dolor generalmente se presenta durante la fase de actividad de la enfermedad, durante el movimiento de las articulaciones afectadas.

La afectación de manos y muñecas aparece en casi todos los casos de RA y puede variar según se trate de la fase aguda o crónica de la enfermedad. En la etapa aguda se presenta afectación de muñecas, articulaciones metacarpofalángicas e interfalángicas proximales (**Figura 12**).

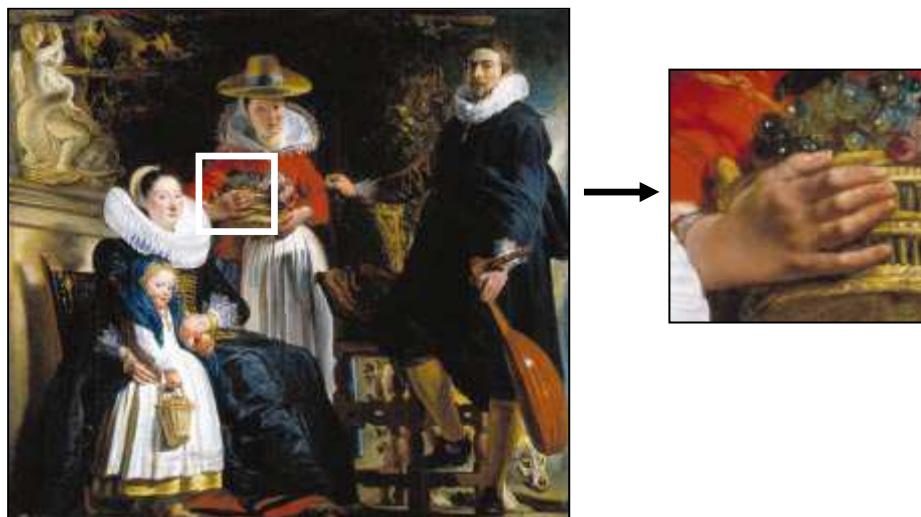


Figura 12.- Inflammation metacarpofalángica e interfalángica proximal propias de la RA representadas en el óleo 'La familia de Jodaens en un jardín' de Jacob Jordaens (1630; Museo del Prado, Madrid).

En la fase crónica, especialmente si la enfermedad ha tenido una evolución destructiva, se distinguen las siguientes deformaciones en manos:

- Dedos de cuello de cisne: hiperextensión de las articulaciones interfalángicas proximales e hiperflexión de las interfalángicas distales.
- Dedos en *Boutonnière* o en ojal: hiperflexión de las articulaciones interfalángicas proximales e hiperextensión de las interfalángicas distales.
- Mano en ráfaga: desviación cubital de los dedos a nivel de articulaciones metacarpofalángicas.

Aunque la afectación de manos y muñecas sean las más frecuentes, cualquier articulación puede verse afectada por RA. Entre las articulaciones afectadas por RA se encuentran más habitualmente las de pies, columna vertebral, caderas, rodillas, hombros y codos. Si la enfermedad sigue su curso evolutivo, durante aproximadamente los dos primeros años se presentan lesiones articulares y tendinomusculares más graves, apareciendo deformidades características en estas articulaciones como desviación cubital, pulgar en zeta, *hallux valgus*, dedos en martillo, pie plano-valgo, pie reumatoideo y retracciones articulares, sobre todo en rodillas, caderas y codos (Peña, 1997; Sánchez Atrio y col., 2009).

Una manifestación importante de la RA es la rigidez matutina de articulaciones, que aparece tras un periodo prolongado de reposo, persiste al menos durante 45 minutos y cede con el paso del tiempo. La rigidez se observa en el 80-95% de los pacientes y está relacionada con el grado de inflamación de la articulación y con la falta de movimiento muscular que ayuda al retorno de la sangre al sistema venoso (Peña, 1997).

1.8.4.2 Manifestaciones extraarticulares

Entre las manifestaciones extraarticulares más comunes de la RA se encuentran (Peña, 1997; Sánchez Atrio y col., 2009):

- Debilidad y atrofia muscular, principalmente de la musculatura cercana a las articulaciones afectadas en estadios precoces de la enfermedad.
- Nódulos reumatoides, que aparecen frecuentemente en zonas que soportan presión como codos pero también pueden aparecer en tendones, pericardio, pleura... Estos nódulos son de tamaño variable, firmes, no dolorosos y no se adhieren a la piel. Son la manifestación extraarticular más frecuente y aparecen hasta en el 25% de los casos.
- Manifestaciones oculares, principalmente queratoconjuntivitis seca, escleritis y epiescleritis. Aparecen hasta en un 25% de los pacientes de RA.
- Manifestaciones pulmonares, como derrame pleural, neumonitis intersticial y bronquitis obliterante.
- Manifestaciones cardiovasculares como pericarditis, miocarditis, endocarditis y vasculitis.
- Anemia
- Síndrome de Sjögren, caracterizado por destrucción de glándulas de secreción externa como glándulas lagrimales, salivales, sudoríparas y glándulas de la vagina, intestino y bronquios. Su destrucción progresiva provoca sequedad generalizada. Este síndrome constituye una de las complicaciones más frecuentes de la RA, ocurriendo en el 80% de los casos de RA.
- Manifestaciones en el sistema tegumentario. En periodos avanzados, la piel de los pacientes con RA se atrofia, aparece lisa y brillante, lo que favorece la aparición de úlceras, sobre todo en las piernas. También es relativamente frecuente el eritema palmar.
- Manifestaciones neurológicas, como el síndrome del túnel carpiano, ansiedad y depresión.

1.8.5 Tratamiento de la artritis reumatoide

Para inducir la remisión de la RA la primera línea de tratamiento suele implicar el uso de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (*disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARDs), entre los cuales el más comúnmente prescrito es el metotrexato. En pacientes refractarios se usa un DMARD alternativo, como sulfasalazina o leflunomida, o una combinación de DMARDs (Smolen y col., 2010). Los DMARDs se pueden prescribir con coadyuvantes antiinflamatorios no esteroideos.

Dada la importancia de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6 en la patogénesis de RA, se ha desarrollado una nueva clase de fármacos remisores de RA

denominados fármacos biológicos ya que su finalidad es neutralizar la actividad biológica de estas citocinas. Los primeros agentes biológicos aprobados para el tratamiento de RA son antagonistas del TNF como el infliximab (anticuerpo quimérico monoclonal), el adalimumab (anticuerpo humano monoclonal) y el etanercept (anticuerpo receptor soluble de TNF) (Taylor y col., 2009). Otros fármacos biológicos son el golinumab (anticuerpo monoclonal humano contra TNF) o el certolizumab pegol (anticuerpo monoclonal humanizado que neutraliza al TNF tanto soluble como unido a membrana). Todos estos fármacos mejoran los signos y síntomas de RA y ralentizan o previenen los daños estructurales (Nam y col., 2010) pero no son efectivos en todos los pacientes o durante todo el tratamiento (Atzeni y col., 2011).

Durante el tiempo en el que no se logra la remisión de la RA y en aquellos casos en los que haya una ausencia de respuesta o el tratamiento no se haya realizado de forma precoz existen tratamientos paliativos para mejorar la calidad de vida del paciente. Estos tratamientos incluyen analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos, como paracetamol, codeína y tramadol, que provocan un alivio sintomático pero no alteran el curso de la enfermedad. Por otro lado, los corticoides se emplean actualmente de forma puntual ya que ayudan al control de los síntomas de forma local en articulaciones inflamadas o de forma sistémica durante el tiempo de latencia de los DMARDs, sin embargo no existen evidencias de que contribuyan a evitar el progreso de la enfermedad y se han demostrado efectos deletéreos a largo plazo (Sivera y col., 2005).

Además de las estrategias farmacológicas, existen otras no farmacológicas como seguir una dieta equilibrada rica en ácidos grasos ω -3, realizar una actividad física adecuada, seguir las indicaciones fisioterapéuticas y recibir apoyo psicológico que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida de los pacientes de RA (Sánchez y col., 2009).

1.8.6 Modelos experimentales de artritis reumatoide

Existen numerosos modelos experimentales de RA. En rata se han desarrollado modelos como la artritis adyuvante, artritis inducida por colágeno, artritis inducida por LPS entre otros (**Tabla 5**) (Di Paola y col., 2008).

A pesar de existir numerosos modelos experimentales, los más comúnmente utilizados para el 'screening' de fármacos antirreumáticos son la artritis adyuvante y la artritis inducida por colágeno, ya que son modelos sencillos y fácilmente reproducibles.

Tabla 5.- Modelos de artritis experimental. Vías i.d. (intradérmica), i.a. (intraarticular), i.p. (intraperitoneal), i.v. (intravenosa).

Modelo de artritis	Descripción	Animal	Antígeno	Vía
Adyuvante	Pearson y col., 1956	Rata Lewis Ratón C57B6 y	Adyuvante completo de Freund	i.d.
Inducida por antígeno	Dumonde y col., 1962	BALB/c	BSA	i.a.
Inducida por LPS	Padmanabhan y col., 1962	Rata Rata y ratón	LPS	
Inducida por colágeno	Trentham y col., 1977	DBA/1	Colágeno tipo II	i.d.
Inducida por zimosano	Keystone y col., 1977	Ratón	Zimosano	i.a.
Inducida por pared celular de estreptococo	Cromartie y col., 1977	Rata	Pared celular de estreptococo	i.p.
Inducida por <i>Lactobacillus casei</i>	Lehman y col., 1983	Rata	<i>Lactobacillus casei</i>	i.p.
Inducida por muramil dipéptido	Koga y col., 1986	Ratón BALB/c	Muramil dipéptido	i.v.
Inducida por pristano	Potter y col., 1981	Ratón BALB/cJ	Pristano	i.p.
Inducida por proteoglicano	Glant y col., 1987	Ratón BALB/c (C3H)	Proteoglicano	i.p.
Lyme	Barthold y col., 1987	Rata	<i>Borrelia burgdorferi</i>	i.p.
Inducida por colágeno tipo IX y X	Boissier y col., 1990	Ratón DBA/1	Colágeno tipo IX y X	
Inducida por aceite mineral	Kleinau y col., 1991	Rata DA	Adyuvante incompleto de Freund	i.d.
Inducida por micoplasma	Cole, 1991		Mitógeno de <i>Mycoplasma arthritidis</i>	
Inducida por <i>Staphylococcus aureus</i>	Abdelnour y col., 1994	Ratón Swiss	<i>Staphylococcus aureus</i> (LS-1)	i.v.
Inducida por <i>Avridine</i>	Vingsbo y col., 1995	Rata	N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxiethyl) propandiamina	
Inducida por hibridoma	Búzas y col., 1995	Ratón BALB/c	Proteoglicano específico de hibridoma de células T	
Inducida por HTLV-1	Beilke y col., 1996	Macaco	Virus linfotrópico humano tipo 1	
Inducida por COMP	Carlsén y col., 1998	Rata	Proteína de la matriz oligomérica del cartílago	
Inducida por Hcgp-39	Verheijden y col., 1997	Ratón BALB/c	Glicoproteína 39 de cartílago humano	
Inducida por la proteína <i>Link</i>	Zhang y col., 1998	Ratón BALB/c	Proteína <i>link</i>	
Inducida por TGF- β 1/2	Allen y col., 1990	Rata	factor de crecimiento transformante	i.a.
Inducida por IL-1	Hrubey y col., 1991		IL-1	i.a.
Inducida por IL-8	Endo y col., 1994	Conejo	IL-8	i.a.
Inducida por Cpg	Deng y col., 1999	Ratón	DNA y oligonucleótidos CpG oligos bacterianos	
Artritis inducida por DC	Leung y col., 2002	Ratón DBA/1	Células dendríticas	
Artritis inducida por GAGs	Wang y col., 2002	Ratón BALB/c	Glicosaminoglicanos	i.d.
Artritis inducida por versicano	Shi y col., 2003	Ratón BALB/c	Versicano	
Artritis inducida por dsRNA	Zare y col., 2004	Ratón NMRI	Dobles cadenas de RNA	i.a.

1.8.6.1 Artritis adyuvante en rata

El modelo de artritis adyuvante (AA) en rata fue el primer modelo experimental de RA, descrito por Pearson (1956) inducido por *Mycobacterium butyricum* inactivado. AA se caracteriza por el desarrollo de poliartritis fácilmente ponderable, marcada destrucción ósea y proliferación de hueso periosteal. La AA afecta principalmente a tobillos, muñecas, articulaciones interfalángicas terminales y columna vertebral.

Las lesiones se inician por sinovitis, seguida de periartritis, peritendinitis y periostitis, formación de *pannus* con destrucción de cartílago, destrucción ósea y, por último, fibrosis o anquilosis ósea. A nivel histológico, las lesiones se inician con la infiltración de leucocitos, posteriormente aparece edema, depósitos de fibrina, formación de focos necróticos con neutrófilos, acompañado o seguido por proliferación de sinoviocitos y activación de osteoblastos y osteoclastos (Waksman, 2002). Las manifestaciones clínicas se evidencian a partir del décimo día post-inducción y pueden perdurar hasta más de ocho semanas (Franch y col., 1994a).

La patogenia de la AA implica linfocitos T y neutrófilos. El papel de los linfocitos B no está claro, aunque en esta patología aparecen anticuerpos específicos contra el agente inductor, el colágeno articular y también de tipo factor reumatoide (Franch y col., 1994). Las citocinas pro-inflamatorias de tipo Th1 y Th17 tienen también un importante papel en el desarrollo de la AA, habiéndose descrito el acúmulo de TNF- α , IFN γ , IL-6 e IL-17A en ganglios linfáticos y articulaciones inflamadas de ratas con AA (Ayer y col., 2000; Bush y col., 2001).

AA comparte varias características con la RA humana como inflamación de las extremidades, degradación del cartílago, pérdida de función de las articulaciones afectadas, infiltración de linfocitos en las articulaciones y afección de la piel y los ojos. Sin embargo, a diferencia de la RA humana, la AA en ratas afecta a la columna vertebral (Hegen y col., 2008).

1.8.6.2 Artritis inducida por colágeno en rata

El modelo de artritis inducida por colágeno (*collagen-induced arthritis*, CIA) fue descrito por primera vez por Trentham y col. (1977) en rata, aunque actualmente también se utiliza en ratón. La CIA sólo afecta a cepas de animales susceptibles, que presentan *locis* que contribuyen a esta susceptibilidad en MHC, Fc γ RIIb y C5 (Johansson y col., 2001).

La CIA cursa con poliartritis grave caracterizada por una marcada destrucción del cartílago asociada con el depósito de inmunocomplejos en la superficie articular, destrucción ósea y proliferación periosteal, junto con sinovitis, inflamación periarticular y formación de *pannus* (Hegen y col., 2008). En las sinovias inflamadas aparecen centros germinales

ectópicos, similares morfológica e inmunohistoquímicamente a los existentes en bazo y ganglios linfáticos (Han y col., 2001).

Los signos clínicos de la CIA en rata se aprecian a partir de 10-13 días después de la inducción, alcanzando la máxima inflamación a los 20 días.

La CIA es una patología articular que requiere tanto de la respuesta de linfocitos B como de linfocitos Th. El componente humoral es esencial en el desarrollo de CIA, produciéndose la respuesta específica de linfocitos B contra epítomos de la triple hélice del colágeno tipo II (Wernhoff y col., 2001). Las células Th parece que están implicadas en la evolución de la CIA tanto como efectoras como activadoras de la formación de anticuerpos a través de la producción de citocinas. La patogénesis de CIA parece estar mediada tanto por la respuesta Th1 (secreción de IL-12) como Th2 (secreción de IL-4) (Ortmann y col., 2001).

El modelo de CIA en rata presenta numerosas similitudes con la RA humana ya que es una patología autoinmune con generación de autoanticuerpos y morfológicamente presenta un patrón de sinovitis, formación de *pannus* y erosión ósea y cartilaginosa semejante a la RA (Zhang y col., 2009). Además, CIA comparte con RA el perfil de citocinas presente en el tejido sinovial y en cartílago (Thornton y col., 1999; Roark y col., 2007). Sin embargo, la CIA en rata difiere de la RA humana en que no presenta exacerbaciones y remisiones de las manifestaciones clínicas. Además el infiltrado celular en CIA está compuesto predominantemente por neutrófilos, mientras que en RA la mayor proporción de células infiltradas son células mononucleares.

Por otro lado, CIA y AA en rata también difieren en varios aspectos. El desarrollo de CIA es menos grave que el de AA y presenta una incidencia menor, además su patogenia implica a linfocitos B y depende del sistema complemento.

2 El cacao

El cacao es un producto derivado de la semilla del árbol *Theobroma cacao*. Tras moler, tostar, desenvainar y fermentar el grano de cacao se obtiene el licor de cacao. El polvo de cacao se elabora eliminando la manteca del licor de cacao (World Cocoa Foundation, 2010).

El cacao ya se consumía en el año 600 a.C. por la civilización Maya preclásica (Hurst y col., 2002). El cacao fue descubierto por los europeos en 1502, gracias al cuarto viaje al ‘Nuevo Mundo’ de Cristóbal Colón. El consumo de cacao se extendió por Europa a partir del año 1528, a partir de que Hernán Cortés enviara al rey Carlos I de España las recetas para elaborar bebidas con cacao, tal y como era consumido por el emperador azteca Moctezuma (Seligson y col., 1994). A partir de entonces, el consumo de las bebidas de cacao se extendió entre la aristocracia europea, sin embargo, el cacao no fue utilizado como golosina hasta el siglo XIX, cuando se elaboró el primer chocolate sólido.

Desde la antigüedad, mayas y aztecas utilizaban el cacao para fines medicinales, y los europeos también lo emplearon como fármaco entre los siglos XVI y XIX. Existe documentación sobre unas 100 funciones farmacológicas diferentes atribuidas al cacao. Entre las aplicaciones médicas más comunes del cacao se encontraban aumentar el peso y estimular el sistema nervioso y el digestivo (Dillinger y col., 2000).

2.1 Composición del cacao

El polvo de cacao contiene fibra (26-40%), proteínas (15-20%), carbohidratos (~15%) y lípidos (10-24%) (Borchers y col., 2000). Además presenta minerales, como calcio, magnesio, cobre y potasio, vitaminas A, E, B y ácido fólico, y metilxantinas, principalmente teobromina (2-3%) y cafeína (0,2%) (Pura Naik, 2001). El cacao es una fuente de polifenoles, concretamente flavonoides (Katz y col., 2011).

Las semillas de cacao contienen un 12-18% de polifenoles en peso seco y el polvo de cacao puede contener hasta 50 mg/g de polifenoles. El 60% de los polifenoles del cacao son flavanoles como (-) epicatequina, (+) catequina y sus polímeros, llamados procianidinas. Las procianidinas del cacao son homodímeros y homotrímeros de (-) epicatequina, o bien heterodímeros de (-) epicatequina y (+) catequina, que pueden llegar a presentar más de 10 unidades. Además de estos flavonoides, el cacao contiene pequeñas cantidades de quercetina y sus glucósidos, flavonas como luteonina, y flavanonas como naringenina (Griffiths, 1958; Sánchez-Rabaneda y col., 2003).

2.2 Efectos biológicos del cacao

El cacao posee efecto antioxidante debido a su capacidad de neutralización directa de radicales libres (Lee y col., 2006), a su capacidad de inhibir enzimas relacionados con la producción de oxidantes, como la xantina oxidasa (Lee y col., 2006), y a su capacidad de proteger las defensas antioxidantes propias del organismo (Cotelle, 2001; Pérez-Cano y col., 2009). Los efectos antioxidantes del cacao se han relacionado proporcionalmente a los flavonoides que contiene (Counet et al., 2003). La capacidad antioxidante de los flavonoides presentes en el cacao ha sido extensamente documentada (Hatano y col., 2002; Pollard y col., 2006; Alia y col., 2006, Pazos y col., 2007). No obstante otros componentes del cacao, como las metilxantinas, también contribuyen a su poder antioxidante (Azam y col., 2003).

Además de la capacidad antioxidante del cacao, y en parte gracias a ella, el cacao presenta numerosos efectos beneficiosos en el organismo. Los principales efectos saludables del consumo de cacao se refieren al sistema cardiovascular (Corti y col., 2009) y a la carcinogénesis (Maskarinec, 2009). Además también se han descrito efectos sobre el sistema nervioso central, la piel, la obesidad, la resistencia a insulina (Katz y col., 2011), y sobre la respuesta inflamatoria y el sistema inmunitario (Ramiro-Puig y col., 2009).

2.2.1 Efectos del cacao sobre el sistema cardiovascular

Numerosos estudios demuestran que la suplementación con cacao o productos derivados regula diversos biomarcadores asociados a enfermedades cardiovasculares, tanto en voluntarios sanos, como en individuos con hipertensión, intolerancia a la glucosa o hipercolesterolemia (Erdman y col., 2008; Corti y col., 2009; Grassi y col., 2010; Fraga y col., 2011).

Las primeras evidencias epidemiológicas que relacionaron el consumo de cacao con la disminución del riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares se detectaron en aborígenes de la tribu Kuna, originarios de las islas de San Blas en Panamá (Hollenberg y col., 1997). Esta población consume grandes cantidades de cacao como parte de su dieta habitual y la incidencia de hipertensión es muy baja (2,2%), y su presión arterial no incrementa con la edad. Sin embargo, cuando miembros de esta tribu migran a áreas urbanas, la prevalencia de hipertensión incrementa. Este cambio se ha asociado a los cambios dietéticos que conlleva la inmigración, incluyendo un importante descenso del consumo de cacao (McCullough y col., 2006).

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han identificado dianas celulares y moleculares a través de las cuales el cacao puede mediar sus efectos sobre el sistema cardiovascular (Kurosawa y col., 2005; Cienfuegos-Jovellanos y col., 2009; Persson y col., 2011). El efecto beneficioso del cacao se ha atribuido a la activación del sistema de la NOS, a la

modulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, al potencial para mejorar el perfil lipídico y la sensibilidad a la insulina, y a su capacidad para inhibir la activación y agregación plaquetaria (Ottaviani y col., 2006; Corti y col., 2009).

2.2.1.1 Estudios *in vitro*

Estudios *in vitro* demuestran que el cacao puede inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (*angiotensin I-converting enzyme*, ACE) (Actis-Goretta y col., 2006; Persson y col., 2011). Así, el extracto de cacao (6,25 - 100 µg/mL) disminuye de forma dosis-dependiente la actividad de ACE en células endoteliales umbilicales humanas, tras 10 min de exposición y una dosis superior incrementa la síntesis de NO a las 24 h (Persson y col., 2011).

Por otra parte, estudios realizados con células de músculo liso vascular aórtico humano demuestran que procianidinas del cacao son capaces de inhibir la expresión de la metaloproteínasa-2 inducida por trombina e inhibir la migración e invasión de estas células, lo cual puede contribuir a un efecto antiaterosclerótico (Lee y col., 2008).

Estudios llevados a cabo en células endoteliales humanas sugieren que (-) epicatequina inhibe la expresión y la actividad de la arginasa 2, lo que puede implicar mayor disponibilidad del NO en la pared vascular (Schnorr y col., 2008). Estos resultados se correlacionan con otro estudio realizado en conejo en el que procianidinas poliméricas del cacao inducen la relajación endotelial en los anillos aórticos mediada por la activación la NOS (Karim y col., 2000). Además, el cacao *in vitro* evita la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoprotein*, LDL), que tienen un papel importante en la formación de la placa de ateroma (Adamson y col., 1999; Osakabe y col., 2002).

2.2.1.2 Estudios *in vivo*

El efecto del cacao en el desarrollo de placas de ateroma y sobre el perfil lipídico se ha estudiado principalmente en conejo, hámster y rata. Estudios llevados a cabo en conejos hipercolesterolémicos sugieren que el consumo prolongado de cacao pueden aumentar el tiempo de oxidación de las LDL y disminuir la superficie de las lesiones ateroscleróticas en la aorta (Kurosawa y col., 2005). Similarmente, la administración de cacao durante un largo periodo de tiempo reduce los niveles de colesterol, triglicéridos y LDL en un modelo de aterosclerosis en hámsteres (Vinson y col., 2006).

La administración de cacao incorporado al pienso durante 4 semanas disminuye la concentración de colesterol en plasma de ratas Wistar alimentadas con una dieta hipercolesterolémica e incrementa la concentración de colesterol en heces y en ácidos biliares totales. Sin embargo, este efecto no se produce con una dieta que contiene una mezcla de epicatequina y catequina (Yasuda y col., 2008).

Cienfuegos-Jovellanos y col. (2009) han demostrado que una única administración de un extracto de cacao enriquecido en flavonoides (CocoanOX[®]) provoca un efecto claramente antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas pero no en ratas normotensas. Asimismo se ha demostrado que una ingesta prolongada de un producto de fibra de cacao atenúa la hipertensión durante el periodo de consumo y disminuye la concentración de malondialdehído en plasma al final del estudio en ratas espontáneamente hipertensas; sin embargo, la retirada del producto provoca un incremento de la presión arterial (Sánchez y col., 2010).

Los resultados clínicos sobre el efecto cardiovascular del cacao son menos concluyentes que los obtenidos en animales (Scheid y col., 2010). Diversas intervenciones en individuos sanos indican que el consumo de cacao disminuye la oxidación de LDL (Osakabe y col., 2001) e incrementa las lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL) en plasma (Mursu y col., 2004; Baba y col., 2007). También se ha descrito el consumo de cacao asociado a un descenso de triglicéridos y de biomarcadores de peroxidación lipídica, como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) e isoprostanos F₂, en plasma (Wang y col., 2000; Rein y col., 2000; Wiswedel y col., 2004). Sin embargo, otros estudios en individuos sanos indican que la ingesta de productos de cacao durante 2-3 semanas no influye en la concentración de isoprostanos (Mursu y col., 2004; Engler y col., 2004) y la oxidación de LDL no varía por el consumo diario de 48 g de chocolate o 18 g de cacao durante 6 semanas en pacientes con enfermedades coronarias (Farouque y col., 2006).

Por otro lado, el cacao y el chocolate han demostrado poseer ciertos efectos moduladores de la actividad plaquetaria. En este sentido, 40 g de chocolate negro (70% cacao) provoca una rápida mejoría de la función endotelial y plaquetaria en voluntarios sanos fumadores tras 2-8 horas y estos resultados no se reproducen en individuos que han tomado la misma cantidad de chocolate blanco (4% cacao) (Hermann y col., 2006). De forma similar, el consumo de 40 g de chocolate negro (70% de cacao) disminuye la adhesión plaquetaria e induce vasodilatación coronaria en individuos con transplante de corazón (Flammer y col., 2007). Estos efectos están asociados a la presencia de epicatequina en plasma.

Los efectos antiplaquetarios del cacao pueden ser debidos a un incremento en la producción de NO, que provoca vasodilatación e inhibe la agregación plaquetaria (Engler y col., 2006). Asimismo, también se ha propuesto que el cacao ejerce su acción antiplaquetaria por un incremento de la síntesis de prostaciclina (Schramm y col., 2001).

Otros estudios muestran el efecto beneficioso del cacao en la función del endotelio vascular. Voluntarios sanos que han consumido diariamente durante 5 días cacao rico en flavanoles (821 mg flavanoles/día) mejoran su función endotelial y aumentan su vasodilatación, este incremento se revierte al suministrar un inhibidor de la NOS (Fisher y col., 2003). Asimismo, el consumo de chocolate negro sólido y de cacao líquido mejora la

función endotelial y disminuye la presión arterial en adultos con sobrepeso (Faridi y col., 2008).

2.2.2 Efectos del cacao sobre la carcinogénesis

El desarrollo del cáncer se halla íntimamente relacionado con procesos de producción de ROS, por lo que el cacao y sus flavonoides pueden tener efectos anticancerígenos debidos en parte a su capacidad antioxidante. En este sentido, diversos estudios *in vitro* y un número limitado de estudios *in vivo* muestran un amplio rango de efectos antitumorales asociados al cacao, entre los que destacan la inhibición de diversas quinasas y factores de transcripción y de la capacidad proliferativa en algunas células.

2.2.2.1 Estudios *in vitro*

Diversos estudios muestran que el cacao o alguno de sus componentes pueden modular la actividad de la familia de MAPK (Kang y col., 2008; Ramiro-Puig y col., 2009). Dentro de esta familia de quinasas se encuentran, entre otras, la quinasa regulada por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK), la quinasa C-Jun N terminal (*c-Jun N-terminal kinase*, JNK) y la p38 MAPK. La adición de un extracto de cacao a células Caco-2 es capaz de reducir la expresión de la quinasa 1 de MAPK (MAPKK1), que fosforila a su vez a la proteína ERK implicada en la supervivencia celular a través de vías antiapoptóticas (Noe y col., 2004).

Procianidinas de cacao inhiben la transformación neoplásica inducida por mitógeno en la línea celular JB6 de queratinocitos de ratón (JB6⁺P) a través de la inhibición de la actividad de la quinasa MAPK/ERK 1 (*MAPK/ERK kinase*, MEK1) que se encarga de fosforilar y activar a ERK (Kang y col., 2008). Asimismo, procianidinas de cacao reducen VEGF, citocina clave en la angiogénesis, en células JB6⁺P a través de la inhibición directa de la actividad de MEK1 y de la quinasa fosfatidilinositol 3 (*Phosphatidylinositol 3-kinases*, PI3K) (Kim y col., 2010).

Por otro lado, extractos de diversos flavonoides de cacao son capaces de disminuir la actividad de JNK y p38 MAPK, quinasas implicadas en la diferenciación y muerte celular y en la respuesta inflamatoria (Zhang y col., 2006; Ramiro-Puig y col., 2009; Rodríguez-Ramiro y col., 2011). Se ha visto que el cacao tiene efecto sobre NF-κB, que constituye uno de los principales factores nucleares inducibles que controla la respuesta inflamatoria, la adhesión, la proliferación y el crecimiento celular (Zhang y col., 2006; Kang y col., 2008). El NF-κB se encuentra inactivo en el citoplasma unido a la proteína inhibitoria IκBα y se activa tras la fosforilación de este inhibidor por la quinasa de IκBα (IKK). El NF-κB activado es translocado al interior del núcleo donde se une a secuencias específicas de DNA llamadas elementos de respuesta (*response elements*, RE). Se ha observado que epicatequina, catequina, quercetina y un extracto de procianidinas de cacao

inhiben la vía NF- κ B en diferentes líneas celulares (revisado por Pérez-Cano y col., 2011). Asimismo, Granado-Serrano y col. (2010) han demostrado que el tratamiento con epicatequina, incrementa la translocación nuclear de NF- κ B en la línea celular humana HepG2. Adicionalmente, el cacao o sus flavonoides pueden afectar la función de otros factores de transcripción como la AP-1 o STAT (Jeong y col., 2004; Noé y col., 2004).

Por otra parte, se ha demostrado *in vitro* la capacidad antiproliferativa del cacao. Así, se ha observado que flavonoides del cacao presentan un efecto antiproliferativo sobre el crecimiento de células prostáticas cancerígenas (Jourdain y col., 2006). El extracto de cacao reduce la proliferación de linfocitos estimulados con acetato de forbol-miristato (Sanbongi y col., 1997; Mao y col., 1999; Ramiro y col., 2005a). También se ha observado que células humanas procedentes de cáncer de mama son susceptibles a los efectos citotóxicos de procianidinas pentaméricas del cacao, sugiriendo que la inhibición de la proliferación celular por estos flavonoides está asociada a la desfosforilación específica o disminución de proteínas reguladoras del ciclo celular como la p53 (Ramljak y col., 2005). Además, el tratamiento de células Caco2 con un extracto enriquecido de procianidinas de cacao bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G2/M e inhibe su crecimiento (Carnésecchi y col., 2002).

2.2.2.2 Estudios *in vivo*

El efecto antitumoral del cacao *in vivo* ha sido descrito fundamentalmente en modelos murinos. Así, se ha visto que proantocianidinas del licor de cacao ejercen una acción protectora frente a cáncer de pulmón en un modelo de carcinogénesis múltiple en ratas F344 y en las fases iniciales de un modelo de carcinogénesis pancreático en ratas Sprague-Dawley (Yamagishi y col., 2002, 2003). Más recientemente, se ha descrito la actividad antitumoral de la fracción de albúmina de cacao semifermentado y secado en el modelo murino de linfoma L5178Y (Preza y col., 2010). Asimismo, una dieta enriquecida en cacao atenúa parcialmente el daño hepático inducido por N-nitrosodietilamina en ratas a través de la modulación de enzimas antioxidantes y de proteínas clave en la cascada de señalización celular asociada a la muerte celular (Granado Serrano y col., 2009).

2.2.3 Efecto del cacao sobre el sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria

Además de las acciones descritas, diversos estudios muestran la capacidad inmunomoduladora del cacao tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adquirida.

2.2.3.1 Estudios *in vitro*

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado el efecto inmunomodulador del cacao (revisado por Ramiro-Puig y col., 2009). Un extracto de cacao rico en flavonoides disminuye la secreción de TNF- α , proteína quimotáctica de monocitos 1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) y NO en macrófagos estimulados con LPS (Ono y col., 2003; Ramiro y col., 2005b, Kenny y col., 2009).

Recientemente se ha observado que extractos obtenidos a partir de granos de cacao fermentados y de *nibs* tostados, así como su extracto fenólico, disminuyen de manera dosis dependiente la secreción de TNF- α e IL-6 por parte de monocitos procedentes de sangre periférica estimulados con PMA (Zeng y col., 2011).

Procianidinas constituidas por 1-4 flavanoles disminuyen la liberación de IL-1 β en monocitos, sin embargo procianidinas de cadenas más largas la incrementan (Mao y col., 2000). Sin embargo, este mismo grupo detectó también que las procianidinas del cacao promueven la secreción de niveles homeostáticos del factor de crecimiento β (*transforming growth factor β* , TGF β), citocina reguladora que puede actuar como mediador proinflamatorio, induciendo el reclutamiento y la activación de células inmunitarias (Mao y col., 2003). Diferentes fracciones de procianidinas del cacao incrementan la secreción de IL-1 β , TNF- α e IL-6 por parte de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS (Kenny y col., 2007).

El extracto de cacao reduce la proliferación de linfocitos estimulados mediante la inhibición de la secreción de IL-2, citocina secretada por linfocitos Th1 y la expresión de su receptor IL-2R (Sanbongi y col., 1997; Mao y col., 1999; Ramiro y col., 2005a). Además el extracto de cacao suprime la producción de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA (Jenny y col., 2009). Por otro lado, el cacao incrementa la secreción de IL-4 *in vitro*, respuesta de tipo Th2 (Ramiro y col., 2005a). Este efecto opuesto sobre las citocinas Th1/Th2 puede deberse a la inhibición recíproca entre ambos tipos de respuesta y/o a la modulación diferencial de los factores de transcripción STAT4 y STAT6 implicados en la expresión de estas citocinas (Mowen y Glimcher, 2004).

2.2.3.2 Estudios *in vivo*

A pesar de que no existen estudios clínicos que demuestren la acción del cacao sobre el sistema inmunitario, existen algunas evidencias preclínicas obtenidas en animales de experimentación. Una dieta enriquecida con cacao administrada a ratas jóvenes promueve la progresión de timocitos inmaduros hacia linfocitos T en estado más maduro (Ramiro-Puig y col., 2007). Además, el consumo de cacao durante 3 semanas incrementa el porcentaje de linfocitos B en bazo y placas de Peyer, y disminuye el de Th en esos mismos órganos y en ganglios linfáticos mesentéricos de ratas jóvenes (Ramiro-Puig y col., 2007b

y 2008). Estos estudios también muestran que el cacao inhibe la secreción de IL-4 en bazo y ganglios linfáticos mesentéricos.

En animales inmunizados con ovoalbúmina y alimentados con una dieta rica en cacao se ha descrito una menor secreción de IL-4 en bazo y ganglios linfáticos mesentéricos y una mayor liberación de IFN γ por parte de esas mismas células, lo cual puede relacionarse con una cierta inhibición de la respuesta Th2 (Pérez-Berezo y col., 2009).

Respecto a la producción de anticuerpos, una dieta enriquecida en cacao reduce la concentración sérica de IgG, IgM e IgA y la secreción intestinal de IgA e IgM (Pérez-Berezo y col., 2011a y 2011b). Por otro lado, una dieta rica en cacao modula la respuesta inmunitaria de anticuerpos específicos, inhibiendo la producción de anticuerpos de isotipo IgG1, IgG2a, IgG2c e IgM e incrementando la de IgG2b (Pérez-Berezo y col., 2009)

Resultados

Artículo 1

‘EFFECT OF A DIET RICH IN COCOA FLAVONOIDS ON EXPERIMENTAL ACUTE INFLAMMATION’

(Efecto de una dieta rica en flavonoides de cacao
sobre la inflamación aguda experimental)

Margarida Castell, Àngels Franch, Sara Ramos-Romero, Emma Ramiro-Puig,
Francisco José Pérez-Cano, Cristina Castellote.

En: ***Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources***. Keller RB (Ed.)
Hauppauge (NY): Nova Science Publishers, Inc.; 2009. Chapter 6, p.p. 213-229.

Los resultados del presente capítulo han sido presentados en formato póster en los congresos siguientes:

- 1st International Immunonutrition Workshop. Valencia, España. 3-5 de Octubre, 2007.
Ramos-Romero S, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. ‘Cocoa anti-inflammatory effects in rat carrageenin-induced paw oedema’. Publicado en *Proc Nutr Soc* 2008; 67: E65.
- VI Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Básica y Aplicada. Córdoba, España. 25-27 de Marzo, 2009.
Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. ‘Efecto de la ingesta de cacao sobre modelos de inflamación aguda experimental’.
- 3rd International Immunonutrition Workshop. Platja d’Aro, España. 21-24 de Octubre, 2009.
Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Pérez-Berezo T, Castellote C, Franch A, Castell M. ‘A seven-day high cocoa diet decreases oxidant and inflammatory properties of peritoneal macrophages in rats’
Publicado en *Proc Nutr Soc* 2010; 69: E253.

Resumen

Objetivo: Establecer el efecto de la ingesta de cacao sobre la respuesta inflamatoria aguda experimental y sobre la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de macrófagos.

Material y Métodos: Ratas Wistar hembras recibieron por vía oral, diariamente y durante 7 días, cacao *Natural Forastero* (2,4 o 4,8 g/kg rata). Al día siguiente de la última administración se indujo una reacción inflamatoria aguda mediante una inyección subplantar de carragenina, histamina, serotonina, bradicinina o prostaglandina E₂ en una de las extremidades posteriores. Se cuantificó el volumen de las extremidades posteriores (inflamada y referencia) mediante un pletismómetro de agua cada 30 o 60 min. Por otra parte, se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratas Wistar sanas que también recibieron cacao p.o. durante 7 días. En estas células se cuantificó la producción de ROS por medio del ensayo con diclorofluoresceína. Asimismo, se cuantificó la liberación de óxido nítrico (NO) mediante la técnica de Griess y la secreción de TNF- α e IL-6 tras su estimulación con lipopolisacárido por técnicas de ELISA.

Resultados: Los animales que recibieron 4,8 g/kg de cacao mostraron una reducción significativa del edema provocado por carragenina desde la primera hora tras la inducción hasta el final del estudio, a las 6 h post-inducción. La administración de cacao no modificó la evolución de la respuesta inflamatoria provocada por histamina, serotonina o prostaglandina E₂. Sin embargo, en el modelo inducido con bradicinina, los animales que recibieron 2,4 g/kg de cacao presentaron un volumen inferior en la extremidad inflamada respecto al de los animales sin intervención dietética. Por otro lado, los macrófagos peritoneales de ratas que recibieron 4,8 g/kg de cacao mostraron cierta tendencia a reducir la síntesis de ROS y disminuyeron la cantidad de NO, TNF- α e IL-6 producida comparada con los macrófagos procedentes de animales alimentados con dieta estándar. Las células procedentes de animales que recibieron la dosis menor de cacao no mostraron cambios respecto a los de referencia.

Conclusiones: La ingesta de cacao es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria aguda, efecto que puede ser debido, en parte, a la atenuación del poder inflamatorio y oxidante de los macrófagos.

Chapter 6

**EFFECT OF A DIET RICH IN COCOA FLAVONOIDS ON
EXPERIMENTAL ACUTE INFLAMMATION**

***M. Castell^{1,4}, A. Franch^{1,2,4}, S. Ramos-Romero¹, E. Ramiro-Puig³,
F. J. Pérez-Cano^{1,4} and C. Castellote^{1,2,4}***

¹Department of Physiology, Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona, Barcelona, Spain

²CIBER *Epidemiología y Salud Pública*, Barcelona, Spain

³INSERM U793, Faculté Necker-Enfants Malades, Paris, France

⁴Members of *Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària*
(INSA, University of Barcelona)

ABSTRACT

Cocoa has recently become an object of interest due to its high content of flavonoids, mainly the monomers epicatechin and catechin and various polymers derived from these monomers called procyanidins. Previous *in vitro* studies have shown the ability of cocoa flavonoids to down-regulate inflammatory mediators produced by stimulated macrophages, but there are no studies that consider the effects of *in vivo* cocoa intake on inflammatory response. In the present article, we report the *in vivo* cocoa inhibitory effect on the acute inflammatory response. Female Wistar rats received Natural Forastero cocoa containing 21.2 mg flavonoids/g for 7 days (2.4 or 4.8 g per rat kg, p.o.). Then, acute inflammation was induced by means of carrageenin, histamine, serotonin, bradykinin or PGE₂ hind-paw injection. Rats fed 4.8 g/kg/day cocoa showed a significant reduction in the hind-paw edema induced by carrageenin from the first hour after induction (P<0.05). However, cocoa intake did not modify the edema induced by histamine, serotonin or PGE₂. Only a certain protective effect was observed at the lowest dose of cocoa in the bradykinin model. Moreover, peritoneal macrophages from rats that received 4.8 g/kg/day cocoa for 7 days showed a reduced ability to produce radical oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin 6 (IL-6). This fact could justify, at least partially, the beneficial effect of cocoa on carrageenin-induced inflammation. In summary, a diet rich in cocoa flavonoids was able to down-regulate the acute inflammatory response by decreasing the inflammatory potential of macrophages.

* E-mail: margaridacastell@ub.edu

1. INTRODUCTION

One of the foods with a relatively high content of flavonoids is cocoa, which is obtained from the beans of the *Theobroma cacao* tree (Lee, 2003). The beneficial effects of cocoa were known as early as 600 BC: the Mayans and Aztecs roasted and ground cocoa beans to prepare a divine beverage called *xocolatl*, which was mainly used to cure fatigue, fever, infections, and heart pain (Hurst et al., 2002). Although most people presently see cocoa and its derivatives only as snacks, scientific evidence of the health benefits of cocoa known by the ancients is emerging now.

In addition to being a rich source of fiber (26–40%), proteins (15–20%), carbohydrates (~15%), and lipids (10–24%), cocoa powder contains minerals, vitamins (A, E, B and folic acid) and a high amount of flavonoids. However, cocoa flavonoid content is difficult to establish because it depends on geographic origin, climate, storage methods and manufacturing processes (Manach et al., 2004; McShea et al., 2008). Cocoa powder mainly contains the flavanols (-)-epicatechin, (+)-catechin and polymers derived from these monomers called procyanidins; it is reported to contain up to 70 mg/g of polyphenols (Vinson et al., 1999). Epicatechin and catechin are biologically active, but epicatechin is more efficiently absorbed than catechin (Baba et al., 2001). Procyanidins are the major flavonoids in cocoa and chocolate products ranging from 2.16 to 48.70 mg/g (Gu et al., 2006). Short procyanidins (dimers and trimers) are absorbed in the small intestine and rapidly detected in plasma (Baba et al., 2000). However, large procyanidins are less efficiently absorbed in its polymeric form, but can be metabolized by colon microflora to phenolic acids and then absorbed (Manach et al., 2004). Quercetin and its derivatives, naringenin, luteolin and apigenin, are also present in smaller quantities (Sanchez-Rabaneda et al., 2003).

Experimental and clinical data suggest that the consumption of cocoa flavonoids can produce positive clinical benefits in the cardiovascular system (review by Buijsse et al., 2006 and Cooper et al., 2008) and also in brain function (reviewed by McShea et al., 2008). Cocoa intake reduces the risk of cardiovascular disease by modulating blood pressure (Grassi et al., 2005; Taubert et al., 2007) as well as decreasing blood cholesterol (Baba et al., 2007), moreover it produces vasodilatation and inhibits platelet activation and aggregation (Hermann et al., 2006). *In vitro* assays and studies in animal models suggest that cocoa has beneficial effects on neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease (Datla et al., 2007; Ramiro-Puig et al., 2009a). However, it remains to establish doses and length of treatment because a recent trial in healthy adults does not find neuropsychological effects after a short-term dark chocolate intake (Crews et al., 2008). Biological effects of cocoa are mainly attributed to the high content of antioxidant polyphenols (reviewed in Ramiro-Puig et al., 2009b). Cocoa has a potent antioxidant capacity compared to products traditionally considered high in antioxidants (Lee et al., 2003; Vinson et al., 2006). Flavonoids act as antioxidants by directly neutralizing free radicals, chelating Fe^{2+} and Cu^{+} which enhance highly aggressive ROS, inhibiting xanthine oxidase that is responsible for ROS production, and up-regulating or protecting antioxidant defense (Cotelle, 2001). Epicatechin and catechin are very effective in neutralizing several types of free radicals (Hatano et al., 2002; Yilmaz et al., 2004). Procyanidins account for the highest percentage of antioxidants in cocoa products (Gu et al., 2006) and they also scavenge radicals with an

activity that is proportional to the number of monomeric units they contain (Counet et al., 2003). In addition, quercetin and other compounds such as methylxanthines contribute to cocoa's antioxidant activity (Lamuella-Raventos et al., 2001; Azam et al., 2003). The antioxidant properties of flavonoids in cocoa lead us to consider it as a potential beneficial ingredient able to down-regulate the inflammatory response. *In vitro* studies showed that cocoa flavonoids modulate cytokines and eicosanoids produced during inflammation (Mao et al., 2000; Schramm et al., 2001). In response to inflammatory stimulus, macrophages produce nitric oxide (NO) and cytokines, mainly tumor necrosis factor- α (TNF α) and interleukin (IL-) 1, IL-6, and IL-12, and chemokines, such as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (reviewed by Medzhitov, 2008). *In vitro* studies have demonstrated the regulatory effects of cocoa on secretion of inflammatory mediators (reviewed by Ramiro-Puig et al., 2009b). Flavonoid-rich cocoa extract added to LPS-stimulated macrophages decreases secretion of TNF α , MCP-1, and NO (Ono et al., 2003; Ramiro et al., 2005). However, other studies with purified cocoa flavonoid fractions show an enhanced secretion of TNF α , IL-1, IL-6 and IL-10 from stimulated human peripheral blood mononuclear cells (Kenny et al., 2007). Although these *in vitro* studies concerning the anti-inflammatory ability of cocoa flavonoids, alone or in the whole product, few studies focus on the *in vivo* effect. It has been described that supplementation with cocoa products in humans did not affect markers of inflammation (Mathur et al., 2002); however, a recent cross-sectional analysis shows that the regular intake of dark chocolate by a healthy population from southern Italy is inversely related to serum C-reactive protein concentration (di Giuseppe et al., 2008).

The aim of this study was, firstly, to ascertain the potential anti-inflammatory activity induced by cocoa intake and, secondly, to test this potential on several rat models of acute inflammation. The first goal was developed in peritoneal macrophages obtained from rats that had received daily cocoa for a week, and was focused on the production of oxidants (ROS and NO) and cytokines (TNF α and IL-6). Secondly, in rats with the same cocoa diet, the development of acute inflammation was determined after induction with carrageenin, histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandin E₂ (PGE₂).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Eight-week-old female Wistar rats were obtained from Harlan (Barcelona, Spain). Rats were housed 3 per cage in controlled conditions of temperature and humidity in a 12:12 light:dark cycle. Rats had free access to food (chow ref. 2014, Harlan Teklad, Madison, WI, USA) and water. Animals were randomly distributed in 3-4 experimental groups in each experimental design (n = 8-10/group). Two of them were daily administered, by oral gavage, with cocoa in mineral water at doses of 2.4 g/kg/day and 4.8 g/kg/day for 7 days. We used Natural Forastero cocoa (Nutrexp, Barcelona, Spain) containing 21.2 mg of total phenols/g according to the Folin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999). The remaining animals received the same volume of vehicle (mineral water). Handling was done in the same time range to avoid the influence of biological rhythms. At the end of the study rats were sacrificed by CO₂ inhalation. Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for

the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona and approved by the Catalanian Government.

2.2. Isolation of Peritoneal Macrophages

After 7 days of cocoa or vehicle administration p.o., rats were anaesthetized with ketamine/xylazine (i.m., 90 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) to obtain peritoneal macrophages. 40 mL ice-cold sterile phosphate buffer solution (PBS) pH 7.2 was injected to peritoneal cavity. Abdominal massages were immediately performed to induce cell migration. Cell suspension was aspirated, centrifuged (170 g, 5 min, 4 °C) and resuspended in cold DMEM+GlutaMAX media (Invitrogen, Paisley, UK) containing 10% fetal bovine serum (PAA, Pasing, Austria), 100 IU/mL streptomycin-penicillin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (DMEM-FBS). Cell count and viability was determined by double staining with acridine orange and ethidium bromide (Sigma) followed by fluorescence light microscopical analysis. Cells were plated and cultured in different conditions according to the assay.

2.3. ROS Production by DCF Assay

To determine the effects of cocoa on ROS production, peritoneal macrophages (25×10^3 cells/100 μ L in DMEM-FBS) were plated in 96 well black plates (Corning Inc, NY, USA) and allowed to attach overnight (37 °C, 5% CO₂). Macrophages were washed once with warm RPMI-1640 medium without phenol red (Sigma) containing 100 IU/mL streptomycin-penicillin and incubated with 20 μ mol/L of reduced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA, Invitrogen) probe for 30 min at 37 °C. H₂DCF-DA diffuses through the cell membrane and is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form non-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (H₂DCF) which is oxidized by ROS to a fluorescent compound (DCF). Thus, DCF fluorescence intensity is proportional to intracellular ROS production. Fluorescence was measured every 30 min by fluorometry (excitation 538 nm, emission 485 nm) up to 3.5 h. For each animal, background from corresponding wells without fluorescent probe was subtracted.

2.4. Cytokine and NO Production

Immediately after isolation, macrophages were plated in 12-well flat-bottom plate (TPP, Trasadingen, Switzerland) at 1.2×10^6 /mL in DMEM-FBS (37 °C, 5% CO₂) overnight to allow macrophage adhesion. Non-adherent cells were removed by washing three times with warm sterile PBS. The attached macrophages were stimulated by addition of 1 μ g/mL lypopolysaccharide (LPS) from *E.coli* O55:B5 (Sigma). Supernatants were collected for quantification of TNF α after 6 h and IL-6 and NO after 24 h. Supernatants were stored at -80 °C until evaluation. Cells were harvested to determine cell viability. The concentration of TNF α and IL-6 in supernatants was quantified using rat ELISA sets from BD Pharmingen (Erembodegen, Belgium), following the manufacturer's instructions.

Stable end product of NO, NO₂⁻, was quantified by a modification of Griess reaction. Briefly, macrophage supernatants (100 µL) were mixed with 60 µL sulphanilamide 1% (in 1.2 N HCl) and 60 µL N-(1-naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride 0.3% (in distilled water) for 10 min at room temperature. Absorbance was read spectrophotometrically at 540 nm. The concentration of NO₂⁻ was calculated using known concentration of NaNO₂.

2.5. Induction of Acute Inflammation in Rat Hind Paws

Five rat models of acute inflammation were induced by subplantar injection of carrageenin λ, histamine, serotonin, bradykinin or PGE₂, all from Sigma-Aldrich. After 7 days of cocoa or vehicle administration p.o., animals were injected with 0.1 mL carrageenin λ (10 mg/mL), histamine (5 mg/mL), serotonin (5 mg/mL), bradykinin (0.08 mg/mL) or PGE₂ (0.01 mg/mL), in saline solution. The left hind paw was injected with the same volume of saline solution. A reference treatment group was constituted by animals administered with vehicle during 7 days that received one dose of indomethacin (p.o., 10 mg/kg, Sigma in 0.1% CMC-Tween 20) 1 h prior to the induction of inflammation.

2.6. Inflammation Assessment

Paw volume was measured by using a water plethysmometer (UGO Basile, Comerlo, VA, Italy). Left and right hind paws were measured just before the induction (time 0). After carrageenin injection, paw volumes were quantified at 30 min and every hour until 6 h. In the other 4 experimental models, the measurements were performed each 15 min during the first hour, and each 30 min up to 2 h. All determinations were performed in a blinded manner. Paw volumes were expressed as percentage of increase with respect to time 0. Area under curve (AUC) was calculated between time 0 and the end of the inflammatory period evaluation.

2.7. Statistics

The software package SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Conventional one-way ANOVA was performed, considering the experimental group as independent variable. When treatment had a significant effect on dependent variable, Scheffe's test was applied. Significant differences were accepted when P<0.05.

3. RESULTS

3.1. Peritoneal Macrophages Viability

Peritoneal macrophages were obtained from rats after cocoa intake (2.4 or 4.8 g/kg/day) or vehicle for 7 days. Cells were 98% viable when isolated. After overnight culture and washing, some cells were LPS-stimulated and 6 h later, they showed a viability of about 40%

whereas non-stimulated cultures were ~50% viable. However, 24 h after LPS stimulation, macrophage viability reached ~70% and 75% in LPS-stimulated and non-stimulated macrophages, respectively. There were no differences among cells obtained from both cocoa-administered rats and those from reference animals.

3.2. ROS and NO Production by Peritoneal Macrophages

ROS production from peritoneal macrophages increased progressively along the 3.5 h assay (Figure 1A). Cells obtained from 2.4 g/kg cocoa animals produced the same ROS levels as reference macrophages. Macrophages isolated from animals that received 4.8 g/kg/day of cocoa synthesized lower ROS than reference cells already at 0.5 h and all along the studied period. Differences between both groups were higher as later measurements were made but they did not reach statistically significant results because of the high variability.

NO production was detected in macrophage culture medium after 24 h of LPS-stimulation or in resting conditions (Figure 1B).

Macrophages obtained from rats that received 2.4 g/kg/day of cocoa showed NO levels similar to those from reference group, both in LPS-stimulation and in resting conditions. Nevertheless, NO secretion by macrophages isolated from animals with an intake of 4.8 g/kg/day of cocoa was lower than that quantified in the reference group in any culture condition ($P < 0.05$, Figure 1B).

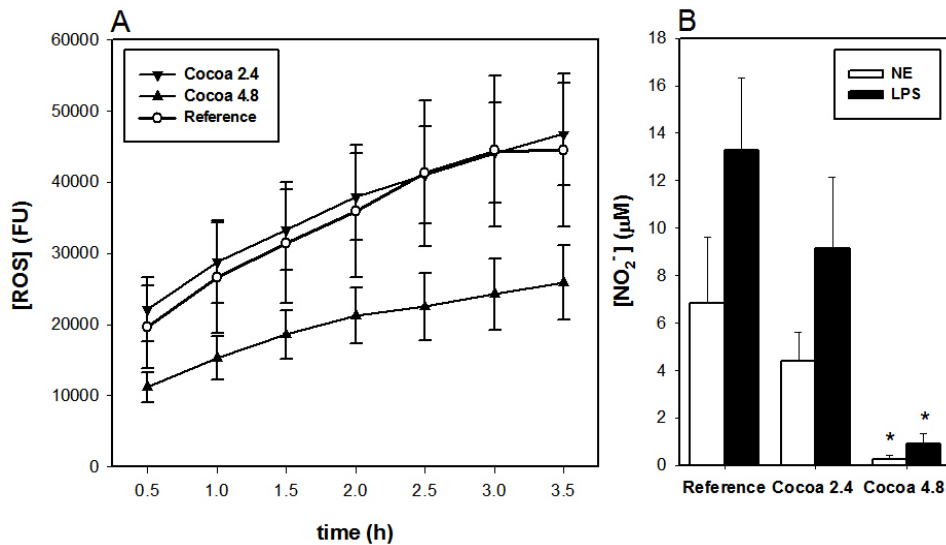


Figure 1. ROS and NO production by peritoneal macrophages. Time-course of ROS production from peritoneal macrophages (A) was determined by means of DCF assay. NO cell production, quantified as NO_2^- concentration (B), was measured by modified Griess assay in LPS-stimulated and resting macrophages. Values are summarized as mean \pm SEM ($n = 8-9$). * $P < 0.05$ compared with reference group.

3.3. TNF α and IL-6 Secretion from Peritoneal Macrophages

TNF α secretion was quantified in LPS-stimulated and resting macrophages. Macrophages from animals administered with 4.8 g/kg/day of cocoa produced lower TNF α levels than those of reference cells ($P < 0.05$, Figure 2A). The reduction of TNF α levels was about 75% and 82% in both non-stimulated and LPS-stimulated conditions, respectively. Conversely, macrophages from animals that received 2.4 g/kg/day of cocoa did not modify the secretion of this cytokine.

In addition, 4.8 g/kg/day of cocoa intake diminished the IL-6 secretion by non-stimulated and LPS-stimulated macrophages ($P < 0.01$, Figure 2B). In this case, the IL-6 inhibition got up to 94% in non-stimulated macrophages and to 88% in LPS-stimulated ones with respect to reference cells. No significant differences in IL-6 levels were found in macrophage cultures from animals administered with 2.4 g/kg cocoa.

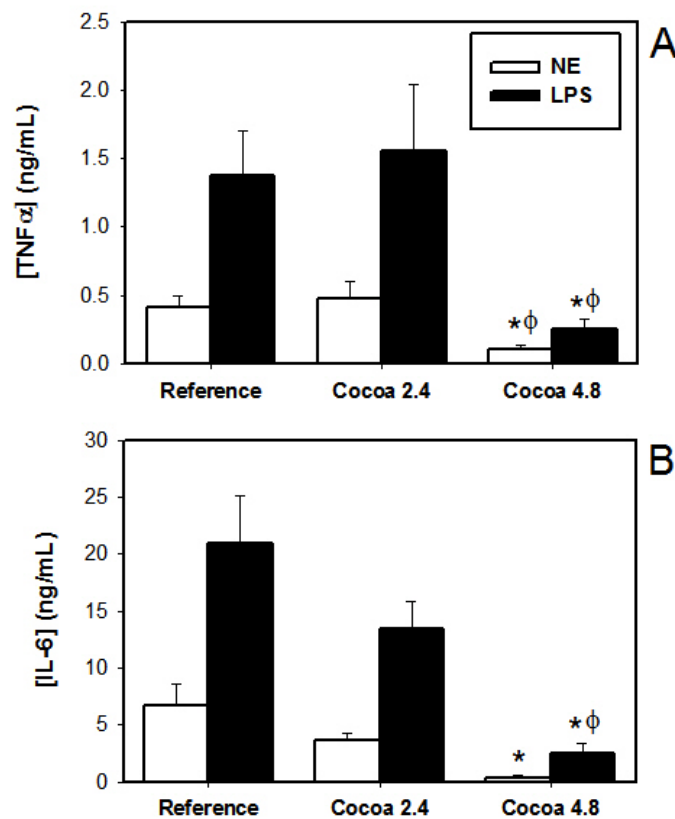


Figure 2. TNF α and IL-6 secretion from peritoneal macrophages. TNF α (A) and IL-6 (B) concentration (ng/mL) in cell culture supernatants was determined by means of ELISA assay. Values are summarized as mean \pm SEM (n = 8-9). * $P < 0.05$ compared with reference group. ϕ $P < 0.05$ compared with 2.4 g/kg cocoa group.

3.4. Paw Edema Induced by Carrageenin

The time-course of hind-paw volume increase after carrageenin injection is summarized in Figure 3A. Paw edema was detected in the reference group from 30 min after carrageenin injection. Thereafter, it rose reaching a maximum increase of ~80% with respect to time 0 at 5-6 h post-injection. Indomethacin showed its anti-inflammatory effect from 1 h post-induction ($P<0.05$) and during all the study ($P<0.01$). Animals from 2.4 g/kg cocoa group displayed a lower paw volume increase than reference group during the first hour ($P<0.05$); thereafter, however, their paw edema fit the reference pattern. Animals that had taken 4.8 g/kg/day of cocoa showed a significant paw edema improvement which was already detected 2 h after carrageenin injection ($P<0.05$), and remained until the end of the study ($P<0.05$). At this time, the inflammation developed in the 4.8 g/kg cocoa group was the 68% of that of the reference group.

AUC from paw edema time-course was calculated between 0 and 6 h post-induction (Figure 3B). AUC from 4.8 g/kg cocoa animals was 30% lower than that in reference group ($P<0.001$), whereas, indomethacin inhibition was of about 44% ($P<0.001$).

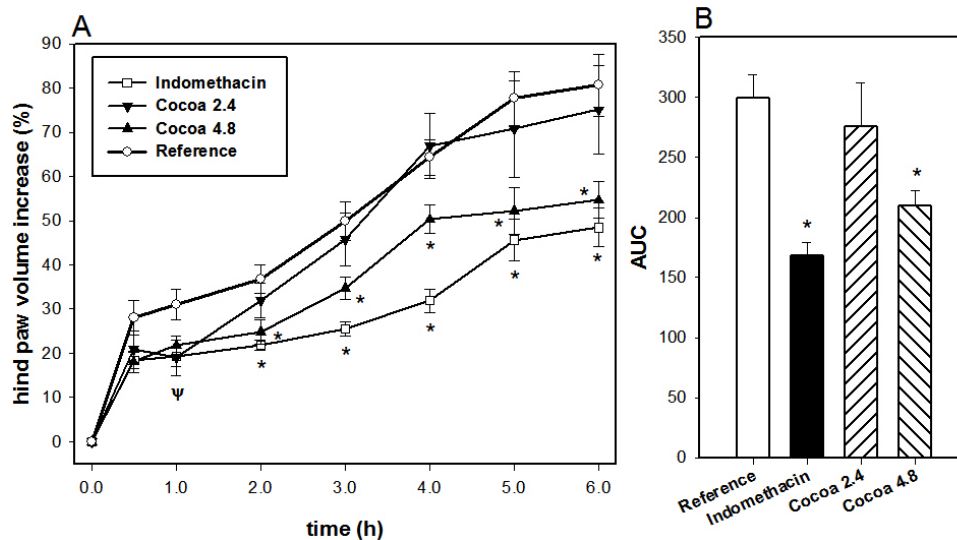


Figure 3. Time-course of carrageenin-induced paw edema. Percentage of hind-paw volume increase respect to time 0 (A) along 6 h from carrageenin-injection. Area under the curve (B) determined between time 0 and 6 h post-induction. Values are summarized as mean \pm SEM ($n = 8-10$). * $P<0.05$ compared with reference group. ψ $P<0.05$ all treated groups compared with reference group.

3.5. Acute Paw Edema Induced by Inflammatory Mediators

Time-course of acute inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and PGE_2 are showed in Figure 4. Paw edema induced by histamine (Figure 4A) or bradykinin (Figure 4C) was maximum at 0.5 h after injection, rising up to 40%. Paw edema induced by serotonin (Figure 4B) reached increase of 55% at 2 h of induction and hind-paw volumes increased until 30% for animals injected with PGE_2 solution (Figure 4D).

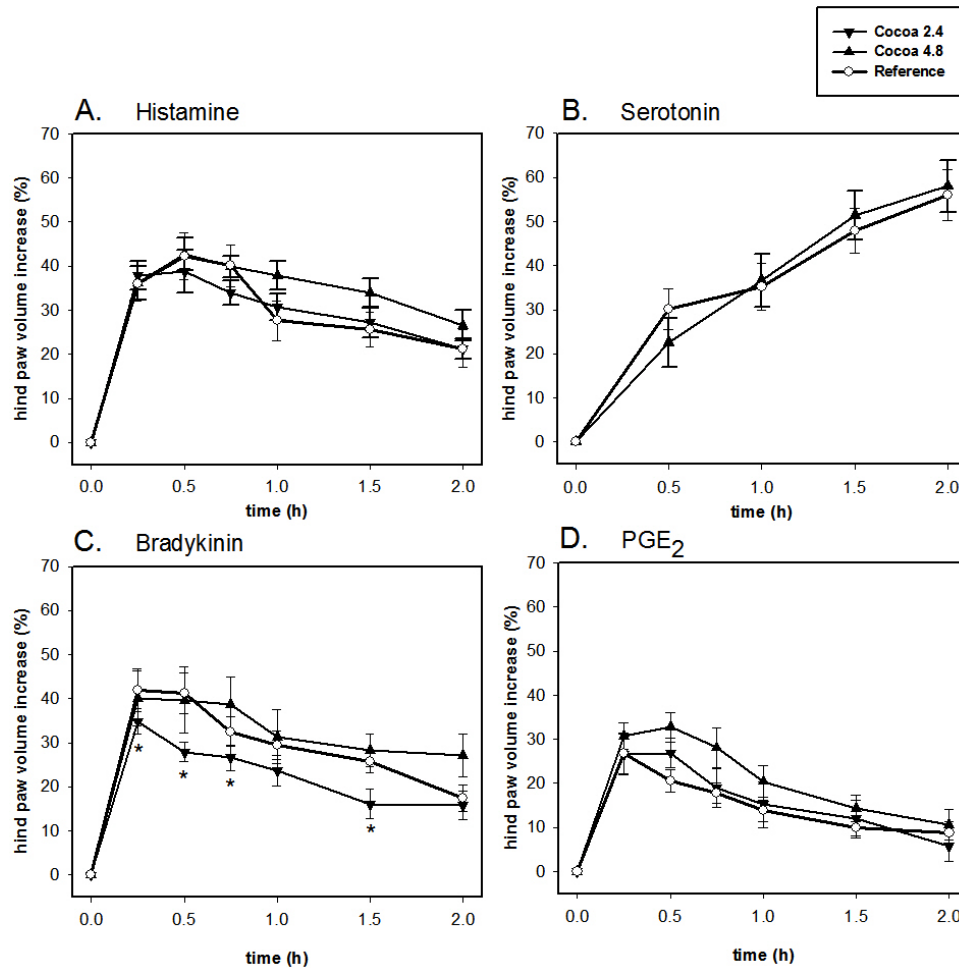


Figure 4. Time-course of paw edema in acute inflammatory models. Time-course of histamine- (A), serotonin- (B), bradykinin- (C), and PGE₂-induced acute inflammation (D) in the studied groups. Values are summarized as mean \pm SEM (n = 8-10). * P < 0.05 compared with reference group.

Cocoa-enriched diet did not protect from the development of histamine-, serotonin- and PGE₂-induced paw edema. Nevertheless, a significant reduction of paw volume increase was detected in 2.4 g/kg cocoa group in the bradykinin model. These animals showed lower inflammation at 15 min post-injection (P < 0.05) and during all studied period (P < 0.01). Daily intake of 2.4 g/kg cocoa reduced up to 28% the AUC of hind paw volume evolution (P < 0.05, data not shown). Indomethacin did not show anti-inflammatory effects in these models of acute inflammation (data not shown).

DISCUSSION

This study shows the *in vivo* anti-inflammatory power of a high cocoa intake for a week. Although several studies demonstrate the regulatory effect of cocoa flavonoids *in vitro* on

cells under inflammatory stimulus (Mao et al., 2000; Ono et al., 2003; Ramiro et al., 2005), there are few evidences of the effect of cocoa on inflammatory response in physiological conditions. Here we show two *in vivo* evidences that allow suggesting the inflammation inhibition by a cocoa diet.

The first part of this study shows that a high cocoa intake for a week reduces the inflammatory potential of macrophages. During an inflammatory response, macrophages are crucial cells participating in the secretion of mediators that eventually induce vasodilatation, vascular permeability increase and leukocyte migration (Medzhitov, 2008). Moreover, macrophages produce a battery of reactive oxygen, nitrogen and halogen species which are proposed to cause damage to surrounding tissues (Son et al., 2008). In the present study, macrophages from animals that had taken a high dose of cocoa produced lower levels of reactive nitrogen species and also had a tendency to synthesize lower reactive oxygen species. These results agree with *in vitro* studies showing that cells from different origins treated with cocoa fractions or flavonoids alone decrease the production of ROS in a dose-dependent manner (Sanbongi et al., 1997, Erlejmán et al., 2006; Granado-Serrano et al., 2007; Ramiro-Puig et al., 2009a). Moreover, cocoa fractions are reported to reduce the levels of NO when produced in inflammatory conditions (Ono et al., 2003; Lyu et al., 2005; Ramiro et al., 2005). These results seem to be contradictory with the effects of cocoa flavonoids in vascular tissue where they are reported to promote NO bioactivity and then to cause vasodilatation and decrease blood pressure (Sies et al., 2005; Taubert et al., 2007). These opposite effects seem to be related to the enzyme isoform involved in NO synthesis: eNOS in the endothelial region, or iNOS after an aggressive stimulus (Karim et al., 2000; Ono et al., 2003). Therefore, cocoa compounds would have contrary effects depending on these enzyme isoforms.

In a similar way, macrophages isolated from animals that had taken a high dose of cocoa for a week showed a lower ability to secrete two essential cytokines in the inflammatory process, TNF α and IL-6. These results agree with those previously obtained after adding a cocoa extract on a macrophage cell line (Ramiro et al., 2005), although there are controversial results when cocoa flavonoid fractions were used on blood mononuclear cells (Mao et al., 2000; Kenny et al., 2007). In any case, an important difference between these *in vitro* studies and those showed here consists in the compounds that achieve cells. In a more physiological approach, the present study suggests that metabolites derived from cocoa absorbed fractions have anti-inflammatory properties. How macrophages down-regulate their inflammatory response in the presence of cocoa metabolites remains to be established. However, some *in vitro* studies show that flavonoids such as epicatechin, catechin, dimeric procyanidins and quercetin can modify the NF- κ B pathway (Mackenzie et al., 2004; Comalada et al., 2005) involved in the production of inflammatory products. Therefore, it can be suggested that the cocoa absorbed fraction, flavonoids or even other compounds, can also interact with this transduction pathway.

After demonstrating the effect of cocoa in reducing some inflammatory mediators *ex vivo*, the second part of this study was focused on ascertaining whether a cocoa enriched diet was able to directly modulate a local inflammation *in vivo*. Specifically, we examined the effect of cocoa on the local inflammatory response induced by carrageenin in the rat hind paw (Winter et al., 1962). This model is widely applied for the screening of anti-inflammatory drugs which provokes a progressive local edema during 4–6 h, that remains even up to 24 h. Carrageenin-induced edema is accompanied with prostanooids and pro-inflammatory cytokines

increase in paw tissues, mainly consisting in an early increase of TNF α followed by elevations in IL-1 β and IL-6 (Guay et al., 2004; Rocha et al., 2006; Loram et al., 2007). As shown here, rats that received cocoa for a week developed a lower carrageenin-induced paw edema than reference animals. This regulatory effect was seen at the first hour of induction by both cocoa doses (2.4 and 4.8 g/kg/day) and, in those animals with the high cocoa dose, remained until the end of the study. These results confirm preliminary studies using a higher dose (Ramos-Romero et al., 2008). Although the cocoa compounds responsible for this effect remain to be established, flavonoids are good candidates because two s.c. or i.v. injections of catechin and epicatechin produced a significant reduction of paw edema in the carrageenin model (Matsuoka et al., 1995). Moreover, quercetin, also present in small quantities in cocoa, inhibited the carrageenin-induced paw edema when administered i.p. to mice (Rotelli et al., 2003), and also diminished the carrageenin-induced air pouch when administered locally to rats (Morikawa et al., 2003). In addition, other isolated flavonoids (Ferrándiz et al., 1991) or plant extracts (Autore et al., 2001; Chakradhar et al., 2005; Ghule et al., 2006) have shown an inhibitory effect on carrageenin-induced edema.

The anti-inflammatory effect of cocoa on carrageenin-induced edema may be due to its action on different events during the inflammatory response. In the carrageenin model, it has been described that histamine and serotonin released from local mast cells are responsible for the inflammation in the first phase, followed by kinins and therefore by the local production of prostaglandins (Morris, 2003). To analyze which mechanism/s could be influenced by cocoa, we have tested the effect of cocoa intake on acute inflammatory models induced by several single mediators. Cocoa intake had no protective effect in edema induced by histamine or serotonin. These results allow us to suggest that cocoa compounds did not counteract the actions of vasoactive amine. This fact could be explained by the vasodilator effect of cocoa (Hermann et al., 2006) that would add to the vasoactive inflammatory mediators. In contrast, other flavonoid-enriched plant extracts or isolated flavonoids have shown anti-inflammatory effect in histamine- and serotonin-induced acute inflammation. In these cases, however, there are different routes of administration and a short period between administration and inflammation induction (Sala et al., 2003; Gupta et al., 2005; Zhou et al., 2006; Paulino et al., 2006). On the other hand, cocoa intake could modulate the release of these inflammatory mediators because the down-regulatory role of some flavonoids on mast cell activation and histamine release has been recently described (Park et al., 2008; Shimoda et al., 2008).

In the present study, cocoa intake also produced no inhibition on PGE₂-induced inflammation. Despite these results, it has been described that some flavonoids may inhibit cyclooxygenase pathways and PGE₂ synthesis (de Pascual-Teresa et al., 2004; Delporte et al., 2005). Therefore, although cocoa could not counteract PGE₂ effects when it was injected, it remains to know if it could regulate its synthesis.

Interestingly, rats receiving the lowest dose of cocoa (2.4 g/kg/day) developed a significant reduction of paw edema induced by bradykinin. This effect may be partially attributed to the fact that flavonoids are able to bind bradykinin (Richard et al., 2006) and then antagonize its effects (Yun-Choi et al., 1993). Moreover, it has been suggested that bradykinin stimulate TNF α release from macrophages (Loram et al., 2007), a process that can be down-modulated by cocoa intake as shown here. On the other hand, bradykinin acts on endothelial cells causing vasodilatation, and on non-myelinated afferent neurons, mediating

pain (Marceau et al., 2004). These actions would not be affected by a cocoa diet and then would explain the mild effect of cocoa on the bradykinin model. In addition, the beneficial properties of cocoa on this model were not observed at the highest dose. This lack of effect could be explained by the vasodilator consequences of cocoa intake, which at high concentration would predominate over the antagonistic action of flavonoids on bradykinin.

Therefore, from the experimental models induced by single inflammatory mediators, it could be suggested that the anti-inflammatory effect of 2.4 g/kg/day cocoa was due at least partially by regulating bradykinin actions. This effect could explain the inhibition observed with this dose during the first hour in the carrageenin model. Later, the same dose would not be able to counteract the macrophage activation phase, which agrees with results from peritoneal macrophages. On the contrary, higher doses of cocoa inhibit carrageenin-induced edema longer, which could be the result of the down-regulation of mediators produced by macrophages as reactive oxygen and nitrogen species and cytokines.

In summary, a high intake of cocoa could produce anti-inflammatory effects *in vivo*, as shown *in vitro*. Although it remains to be ascertained the precise mechanism of action of cocoa and its effectiveness in other inflammatory processes, cocoa seems a good candidate to be considered as a functional food.

ACKNOWLEDGEMENTS

S.R. is the recipient of fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2006-13640). The present study was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (AGL2005-002823) and from SGR 2005-0083 of the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Autore, G., Rastrelli, L., Lauro, M.R., Marzocco, S., Sorrentino, R., Sorrentino, U., Pinto, A., and Aquino, R. (2001). Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. *Life Sci.*, *70*, 523-534.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, U. N., and Hadi, S. M. (2003). Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med. Sci. Monit.*, *9*, 325-330.
- Baba, S., Natsume, M., Yasuda, A., Nakamura, Y., Tamura, T., Osakabe, N., Kanegae, M., and Kondo K. (2007). Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J. Nutr.*, *137*, 1436-1441.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Muto, Y., Takizawa, T., and Terao, J. (2001). Absorption and urinary excretion of (-)-epicatechin after administration of different levels of cocoa powder or (-)-epicatechin in rats. *J. Agric. Food Chem.*, *49*, 6050-6056.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Yasuda, A., Takizawa, T., Nakamura, T., and Terao, J. (2000). Cocoa powder enhances the level of antioxidative activity in rat plasma. *Br. J. Nutr.*, *84*, 673-680.
- Buijsse, B., Feskens, E. J. M., Kok, F. J., and Kromhout, D. (2006). Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality. *Arch. Intern. Med.*, *166*, 411-417.

- Chakradhar, V., Babu, Y. H., Ganapaty, S., Prasad, Y. R., Rao, N. K. (2005) Anti-inflammatory activity of a flavonol glycoside from *Tephrosia spinosa*. *Nat. Prod. Sci.*, *11*, 63-66.
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., and Zarzuelo, A. (2005). In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Eur. J. Immunol.*, *35*, 584-592.
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., and Williamson, G. (2008). Cocoa and health: a decade of research. *Br. J. Nutr.*, *99*, 1-11.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top Med. Chem.*, *1*, 569-590.
- Counet, C., and Collin, S. (2003). Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 6816-6822.
- Crews, W. D. Jr., Harrison, D. W., and Wright, J. W. (2008). A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of the effects of dark chocolate and cocoa on variables associated with neuropsychological functioning and cardiovascular health: clinical findings from a sample of healthy, cognitively intact older adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, *87*, 872-880.
- Datla KP, Zbarsky V, Rai D, Parkar, S., Osakabe, N., Aruoma, O. I., and Dexter, D. T. (2007). Short-term supplementation with plant extracts rich in flavonoids protect nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Am. Coll. Nutr.*, *26*, 341-349.
- de Pascual-Teresa, S., Johnston, K. L., DuPont, M. S., O'Leary, K. A., Needs, P. W., Morgan, L. M., Clifford, M. N., Bao, Y., and Williamson, G. (2004). Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes ex vivo but not in vivo. *J. Nutr.*, *134*, 552-557.
- Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Negrete, R., Vidal, P., Silva, X., López-Pérez J. L., Feliciano, A. S., and Muñoz, O. (2005). Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *J. Ethnopharmacol.*, *99*, 119-124.
- di Giuseppe, R., di Castelnuovo, A., Centritto, F., Zito, F., de Curtis, A., Costanzo, S., Vohnout, B., Sieri, S., Krogh, V., Donati, M. B., de Gaetano, G., and Iacoviello, L. (2008). Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in a healthy Italian population. *J. Nutr.*, *138*, 1939-1945.
- Erlejman, A. G., Fraga, C. G., and Oteiza, P. I. (2006). Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radic. Biol. Med.*, *41*, 1247-1256.
- Ferrándiz, M. L. and Alcaraz, M. J. (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*, *32*, 283-288.
- Ghule, B. V., Ghante, M. H., Saoji, A. N. and Yeole, P. G. (2006). Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects of *Lagenaria siceraria* (Mol.) fruit extracts. *Indian J. Exp. Biol.*, *44*, 905-909.
- Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., and Ramos, S. (2007). Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *J. Agric. Food Chem.*, *55*, 2020-2027.

- Grassi, D., Necozione, S., Lippi, C., Croce, G., Valeri, L., Pasqualetti, P., Desideri, G., Blumberg, J. B., and Ferri, C. (2005) Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension*, *46*, 398–405.
- Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., and Prior, R. L. (2006) Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.*, *54*, 4057-4061.
- Guay, J., Bateman, K., Gordon, R., Manzini, J., and Riendeau, D. (2004). Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E₂ (PGE₂) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE₂ synthase-1. *J. Biol. Chem.*, *279*, 24866-24872.
- Gupta, M., Mazumder, U. K., Kumar, R. S., Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Kakoti, B. B., and Selven, V. T. (2005). Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. *J. Ethnopharmacol.*, *98*, 267-273.
- Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H., and Yoshida, T. (2002). Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry*, *59*, 749-758.
- Hermann, F., Spieker, L. E., Ruschitzka, F., Sudano, I., Hermann, M., Binggeli, C., Lüscher, T. F., Riesen, W., Noll, G., and Corti, R. (2006). Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart*, *92*, 119-120.
- Hurst, W. J., Tarka, S. M. Jr., Powis, T. G., Valdez, F. Jr. and Hester, T. R. (2002). Cacao usage by the earliest Maya civilization. *Nature*, *418*, 289-290.
- Karim, M., McCormick, K., and Kappagoda, C. T. (2000). Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J. Nutr.*, *130*, S2105–S2108.
- Kenny, T. P., Keen, C. L., Schmitz, H. H., and Gershwin, M. E. (2007). Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, *232*, 293-300.
- Lamuela-Raventos R. M., Andres-Lacueva, C., Permanyer, J., and Izquierdo-Pulido, M. (2001). More antioxidants in cocoa. *J. Nutr.*, *131*, 834-835.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J. and Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 7292-7295.
- Loram, L. C., Fuller, A., Fick, L. G., Cartmell, T., Poole, S., and Mitchell, D. (2007). Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J. Pain*, *8*, 127-136.
- Lyu, S., Rhim, J., and Park, W. (2005) Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Arch. Pharm. Res.*, *28*, 1293-1301.
- Mackenzie, G. G., Carrasquedo, F., Delfino, J. M., Keen, C. L., Fraga, C. G., and Oteiza, P. I. (2004) Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-κB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.*, *18*, 167-169.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, *79*, 727-747.

- Mao, T., Van De Water, J., Keen, C. L., Schmitz, H. H., and Gershwin, M. E. (2000). Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J. Nutr.*, *130*, S2093–S2099.
- Marceau, F., and Regoli, D. (2004). Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.*, *3*, 845-852.
- Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S. M., and Jialal, I. (2002). Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J. Nutr.*, *132*, 3663–3667.
- Matsuoka, Y., Hasegawa, H., Okuda, S., Muraki, T., Uruno, T., and Kubota, K. (1995). Ameliorative effects of tea catechins on active oxygen-related nerve cell injuries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *274*, 602-608.
- McShea, A., Ramiro-Puig, E., Munro, S. B., Casadesus, G., Castell, M., and Smith, M. A. (2008). Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing. *Nutr. Rev.*, *66*, 630-641.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*, 428-435.
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., and Morikawa, S. (2003). Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.*, *74*, 709-721.
- Morris, C. J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Method. Mol. Biol.*, *225*, 115-121.
- Ono, K., Takahashi, T., Kamei, M., Mato, T., Hashizume, S., Kamiya, S., and Tsutsumi, H. (2003). Effects of an aqueous extract of cocoa on nitric oxide production of macrophages activated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Nutrition*, *19*, 681-685.
- Park, H. H., Lee, S., Son, H. Y., Park, S. B., Kim, M. S., Choi, E. J., Singh, T. S., Ha, J. H., Lee, M. G., Kim, J. E., Hyun, M. C., Kwon, T. K., Kim, Y. H., and Kim, S. H. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.*, *31*, 1303-1311.
- Paulino, N., Teixeira, C., Martins, R., Scremin, A., Dirsch, V. M., Vollmar, A. M., Abreu, S. R., de Castro, S. L., and Marcucci, M. C. (2006). Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Planta Med.*, *72*, 899-906.
- Ramiro, E., Franch, A., Castellote, C., Perez-Cano, F., Permanyer, J., Izquierdo-Pulido, M., and Castell, M. (2005). Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J. Agric. Food Chem.*, *53*, 8506-8511.
- Ramiro-Puig, E., Casadesús, G., Lee, H. G., Zhu, X., McShea, A., Perry, G., Pérez-Cano, F. J., Smith, M. A., and Castell, M. (2009a) Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on *in vitro* oxidative stress. *Eur. J. Nutr.*, *48*, 54-61.
- Ramiro-Puig, E., and Castell, M. (2009b) Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br. J. Nutr.*, *101*, 931-40.
- Ramos-Romero, S., Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A. and Castell, M. (2008). Anti-inflammatory effects of cocoa in rat carrageenin-induced paw oedema. *Proc. Nutr. Soc.*, *67*, E65.
- Richard, T., Lefeuve, D., Descendit, A., Quideau, S., and Monti, J. P. (2006). Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. *Biochim. Biophys. Acta*, *1760*, 951-958.

- Rocha, A. C., Fernandes, E. S., Quintao, N. L., Campos, M. M., and Calixto, J. B. (2006). Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. *Br. J. Pharmacol.*, *5*, 688-695.
- Rotelli, A. E., Guardia, T., Juarez, A. O., de la Rocha, N. E., and Pelzer, L. E. (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol. Res.*, *48*, 601-606.
- Sala, A., Recio, M. C., Schinella, G. R., Máñez, S., Giner, R. M., Cerdá-Nicolás, M., and Rosí, J. L. (2003). Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur. J. Pharmacol.* *461*, 53-61.
- Sanbongi, C., Suzuki, N., and Sakane, T. (1997). Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell Immunol.*, *177*, 129-136.
- Sanchez-Rabameda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andres-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., and Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/ electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.*, *38*, 35-42.
- Schramm, D. D., Wang, J. F., Holt, R. R., Ensunsa, J. L., Gonsalves, J. L., Lazarus, S. A., Schmitz, H. H., German, J. B., and Keen, C. L. (2001) Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr.*, *73*, 36-40.
- Shimoda, K., Kobayashi, T., Akagi, M., Hamada, H., and Hamada H. (2008) Synthesis of Oligosaccharides of Genistein and Quercetin as Potential Anti-inflammatory Agents. *Chem. Let.*, *37*, 876-877.
- Sies, H., Schewe, T., Heiss, C., and Kelm, M. (2005). Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am. J. Clin. Nutr.*, *81*, S304-12.
- Singleton, V. L., Orthofer R., and Lamuela-Raventós, R. M (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.*, *299*, 152-178.
- Son, J., Pang, B., McFaline, J. L., Taghizadeh, K., and Dedon, P. C. (2008). Surveying the damage: the challenges of developing nucleic acid biomarkers of inflammation. *Mol. Biosyst.*, *4*, 902-908.
- Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., Jung, N., and Schomig, E. (2007) Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA.*, *298*, 49-60.
- Vinson, J. A., Proch, J., and Zubik, L. (1999). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J. Agric. Food Chem.*, *47*, 4821-4824.
- Vinson, J. A., Proch, J., Bose, P., Muchler, S., Taffera, P., Shuta, D., Samman, N., and Agbor, G. A. (2006). Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *J. Agric. Food Chem.*, *54*, 8071-8076.
- Winter, C. A., Risley, E. A., and Nuss, G. W. (1962). Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, *111*, 544-547.
- Yilmaz, Y., and Toledo, R. T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.*, *52*, 255-260.

-
- Yun-Choi H. S., Chung, H. S., and Kim, Y. J. (1993) Evaluation of some flavonoids as potential bradykinin antagonist. *Arch. Pharm. Res.*, *16*, 283-288.
- Zhou, H., Wong, Y. F., Cai, X., Liu, Z. Q., Jiang, Z. H., Bian, Z. X., Xu, H. X., and Liu, L. (2006). Suppressive effects of JCICM-6, the extract of an anti-arthritic herbal formula, on the experimental inflammatory and nociceptive models in rodents. *Biol. Pharm. Bull.*, *29*, 253-260.

Artículo 2

'EFFECT OF COCOA-ENRICHED DIETS ON LYMPHOCYTES INVOLVED IN ADJUVANT ARTHRITIS IN RATS'

(Efecto de dietas enriquecidas con cacao sobre linfocitos
implicados en la artritis adyuvante en rata)

Sara Ramos-Romero, Francisco José Pérez-Cano,
Cristina Castellote, Margarida Castell, Àngels Franch.

British Journal of Nutrition; 2011

(doi: 10.1017/S0007114511003035; en prensa)

Índice de Impacto (SCI 2009): 3,446

Categoría: 11/66 en *Nutrition and Dietetics*.

Los resultados del presente artículo han sido presentados en formato póster en el congreso siguiente:

- XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca, España. 21-24 de Mayo, 2008.
Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Suàrez-Germà C, Castell M, Franch A, Pérez-Cano FJ. 'Influencia de una dieta rica en flavonoides sobre las poblaciones linfocíticas durante un proceso artrítico experimental'.
Publicado en *Inmunología* 2008; 27(supl. 1): 58.

Resumen

Objetivo: Establecer el efecto de dos dietas enriquecidas con cacao sobre la artritis adyuvante en rata, considerando factores clínicos, bioquímicos, humorales y celulares.

Material y Métodos: Ratas Wistar hembras recibieron dietas enriquecidas con cacao *Natural Forastero* (5 y 10% de cacao) desde 2 semanas antes de la inducción de la artritis adyuvante hasta el final del estudio, a las 4 semanas de la inducción. La artritis adyuvante se indujo mediante una inyección intradérmica de una suspensión de *Mycobacterium butyricum* inactivado. El volumen de las extremidades posteriores inflamadas se cuantificó utilizando un pletismómetro de agua. Además, se determinó la proporción de diversas poblaciones linfocíticas en sangre y ganglios linfáticos inguinales por marcaje con técnicas de inmunofluorescencia y posterior análisis mediante citometría de flujo. Se cuantificó la concentración de anticuerpos séricos dirigidos contra *Mycobacterium butyricum*, así como la producción de IL-2 e IFN γ en sobrenadantes de esplenocitos estimulados específicamente y no estimulados, mediante técnicas de ELISA. La liberación de prostaglandina E₂ en esas mismas células se determinó por un inmunoensayo competitivo.

Resultados: A pesar de que las dietas enriquecidas con cacao no disminuyeron significativamente el edema articular producido por la artritis adyuvante en las extremidades posteriores, se observó cierta tendencia a su reducción al final del estudio. Por otro lado, ambas dietas enriquecidas con cacao disminuyeron la concentración sérica de anticuerpos dirigidos contra *Mycobacterium butyricum* y la proporción de linfocitos Th, tanto en sangre como en ganglios linfáticos inguinales. Además, la ingesta de cacao evitó alteraciones inducidas por el proceso artrítico, como son la disminución en la proporción de linfocitos T reguladores en sangre y el desequilibrio de las subpoblaciones NK CD8+ y NK CD8- en ganglios linfáticos inguinales.

Conclusiones: La ingesta de dietas enriquecidas con cacao, si bien no logra reducir la inflamación articular desarrollada en la artritis adyuvante, es capaz de modificar las proporciones de linfocitos Th y reducir la respuesta humoral asociada a esta patología inflamatoria.

Effect of cocoa-enriched diets on lymphocytes involved in adjuvant arthritis in rats

Sara Ramos-Romero¹, Francisco J. Pérez-Cano^{1,2}, Cristina Castellote^{1,2,3}, Margarida Castell^{1,2*} and Àngels Franch^{1,2,3}

¹Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n, Edifici B, 3^a planta, 08028 Barcelona, Spain

²Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Barcelona, Spain

³CIBER Epidemiología y Salud Pública, Barcelona, Spain

(Received 29 October 2010 – Revised 4 May 2011 – Accepted 4 May 2011)

Abstract

Cocoa and its flavonoids have potential anti-inflammatory properties *in vitro* and in acute inflammation models *in vivo*. The aim of the present study was to ascertain the effects of two cocoa-enriched diets on adjuvant arthritis (AA) in rats, considering not only clinical and biochemical inflammatory indices, but also antibody response and lymphocyte composition. Female Wistar rats were fed with a 5 or 10% cocoa-enriched diet beginning 2 weeks before arthritis induction and until the end of the study. AA was induced by an intradermal injection of heat-killed *Mycobacterium butyricum* suspension. The hind-paw swelling (plethysmometry), serum anti-mycobacterial antibody concentration (ELISA), blood and inguinal lymph node lymphocyte subset percentage (flow cytometry), and IL-2, interferon γ and PGE₂ released from splenocytes (ELISA) were assessed. Although the cocoa diets had no significant effect on hind-paw swelling, a tendency to reduce it was observed at the end of the study. Cocoa-enriched diets were able to decrease the serum anti-mycobacterial antibody concentration and the splenocyte PGE₂ production, as well as the proportion of T-helper (T_h) lymphocytes in blood and regional lymph nodes, which probably includes cells responsible for the arthritic process. The cocoa diets prevented a decrease in the proportion of regulatory T-cells in blood and a disequilibrium between inguinal lymph node natural killer (NK) CD8⁺ and NK CD8⁻ subsets. In conclusion, the cocoa-enriched diets during AA were not able to significantly decrease joint inflammation but modified T_h-cell proportions and prevented specific antibody synthesis.

Key words: Cocoa flavonoids: Adjuvant arthritis: T-helper lymphocytes: Anti-mycobacterial antibodies

In ancient civilisations, cocoa (*Theobroma cacao* seed product) used to be consumed for its beneficial effects on health^(1–3), but it changed from being consumed for medicinal purposes to being eaten as a confectionery in modern society. Nowadays, there is a resurgence of interest in the health properties of cocoa and its derivatives. Much scientific evidence has suggested that the beneficial effects of cocoa are associated with its flavonoids⁽⁴⁾. Cocoa mainly contains flavan-3-ols such as (–)-epicatechin and (+)-catechin (0.20–3.50 mg/g), and their polymers called proanthocyanidins (2.16–100 mg/g)^(5,6), which, unlike other products such as tea, apples, grapes or red wine, can have up to ten linked units of flavanol monomers⁽⁷⁾. Large proanthocyanidins are less efficiently absorbed in the small intestine than shorter

flavanols, and as a result they reach to the colon, where they are transformed by intestinal microbiota and absorbed through the intestinal barrier⁽⁸⁾. In consequence, the beneficial effect of these phytochemicals could be mainly attributed to metabolites derived from the microbial catabolism of proanthocyanidins^(9,10). Large proanthocyanidins in the colon may have an important local function neutralising oxidants and carcinogenic compounds all along the gut⁽¹¹⁾. On the other hand, in addition to flavanols, quercetin and its derivatives, such as quercitrin, isoquercitrin, rutin, naringenin, luteolin and apigenin, are also present in cocoa in smaller quantities⁽¹²⁾.

Despite some *in vitro* studies, the influence of cocoa on the immune system is still relatively unknown. Previously,

Abbreviations: AA, adjuvant arthritis; C5-AA, arthritic animals fed a 5% cocoa-enriched diet; C10-AA, arthritic animals fed a 10% cocoa-enriched diet; FBS, fetal bovine serum; IFN- γ , interferon γ ; ILN, inguinal lymph node; mAb, monoclonal antibodies; Mb, *Mycobacterium butyricum*; NK, natural killer; NKT, natural killer T; REF, healthy animals fed a standard diet; REF-AA, arthritic animals fed a standard diet; RPMI-FBS, Roswell Park Memorial Institute-1640 media containing 10% fetal bovine serum; T_{act}, activated T-helper; T_c, T-cytotoxic; TCR, T-cell receptor; T_h, T-helper; T_{reg}, regulatory T-helper.

* **Corresponding author:** M. Castell, fax +34 93 403 59 01, email margaridacastell@ub.edu

we reported that a cocoa-enriched diet modifies lymphocyte composition and function in several lymphoid tissues in rats^(13,14). Specifically, a 10% cocoa diet given to young rats over 3 weeks increases the proportion of B-cells in the spleen⁽¹³⁾, mesenteric lymph nodes and also in Peyer's patches⁽¹⁴⁾, whereas it down-regulates serum IgG, IgM and IgA production⁽¹³⁾. Moreover, specific antibody concentration against ovalbumin significantly decreased in immunised rats fed cocoa⁽¹⁵⁾. On the other hand, a cocoa-enriched diet reduces CD4⁺ T-helper (T_h) lymphocyte proportion in the spleen and mesenteric lymph nodes but its IL-2 secretion, a cytokine with an autocrine effect producing T_h proliferation, is not modified⁽¹³⁾.

Rheumatoid arthritis is an inflammatory autoimmune disease mainly mediated by T_h cells⁽¹⁶⁾. Adjuvant arthritis (AA) is an experimental model in rats of human rheumatoid arthritis that has been widely used for the screening of anti-inflammatory drugs^(17,18). The pathogenesis of the adjuvant arthritic process seems to be mainly related to CD4⁺ T-cells, because administration of monoclonal antibodies (mAb) against CD4 can prevent AA development⁽¹⁹⁾ and also ameliorate established AA⁽²⁰⁾.

Inflammation is a complex biological response by vascular tissues to harmful stimuli to remove the injurious agent, as well as to initiate the tissue repair process⁽²¹⁾. Studies performed *in vitro* have shown the anti-inflammatory properties of isolated flavonoids. In this sense, epicatechin and isoquercitrin decrease TNF- α and monocyte chemoattractant protein-1 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages⁽²²⁾. Furthermore, quercetin inhibits cyclo-oxygenase pathways and PGE₂ synthesis in the Chang liver cell line⁽²³⁾ and in human lymphocytes⁽²⁴⁾. In addition, some studies have reasserted the anti-inflammatory capacity of isolated flavonoids *in vivo*. Subcutaneous or intravenous injections of catechin and epicatechin produce a significant reduction of a local acute inflammation induced in rats⁽²⁵⁾.

The effect of cocoa on the inflammatory response is more complex than that of flavonoids because it contains a mix of diverse compounds. There are studies about the *in vitro* effect of cocoa on pro-inflammatory cytokine and chemokine release, generating controversial results. While some cocoa flavonoid fractions increase the production of pro-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells^(26–29), a complete cocoa extract decreases the TNF- α , monocyte chemoattractant protein-1 and nitric oxide production by macrophages⁽²²⁾. In addition, peritoneal macrophages obtained from rats fed with cocoa for at least 1 week produce lower amounts of TNF- α , IL-6, NO and reactive oxygen species^(13,30–32). Moreover, in previous studies^(30,31), a cocoa suspension administered by the oral route for a week decreased the local hind-paw swelling induced by carrageenin and bradykinin in rats and reduced TNF- α concentration in inflammatory exudates. How cocoa metabolites down-regulate the inflammatory response remains to be established. Some *in vitro* studies have shown that flavonoids such as epicatechin, catechin, dimeric procyanidins and quercetin can modify the NF- κ B pathway^(33,34) involved in the synthesis of inflammatory products.

Because cocoa inhibits the release of some inflammatory mediators *in vitro*, reduces acute local inflammation in rodent models and decreases the T_h-cell proportion in several lymphoid tissues *in vivo*, the aim of the present study was to determine the effects of two cocoa-enriched diets on AA. Specifically, we have taken into consideration not only clinical and biochemical inflammatory indices, but also antibody response and lymphocyte composition in two different compartments.

Materials and methods

Animals

A total of forty-five 9-week-old female Wistar rats were obtained from Harlan (Barcelona, Spain). Rats were housed three to four per cage in controlled temperature (20 \pm 2°C) and humidity (55%) conditions in a 12h light–12h dark cycle, with free access to food and water. Handling was done in the same time range to avoid the influence of biological rhythms. Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona and approved by the Catalan Government.

Induction and assessment of adjuvant arthritis

To induce the arthritis process, rats were injected intradermally into the base of the tail with a suspension of 0.5 mg heat-killed *Mycobacterium butyricum* (Mb; Difco, Detroit, MI, USA) in 0.1 ml of liquid vaseline. AA was clinically assessed by means of hind-paw volume with a water plethysmometer (LI 7500; Leticia, Barcelona, Spain). Left and right hind-paw volumes were measured just before AA induction (on day 0), daily during the second week post-induction, and every other day until the end of the study. All determinations were performed in a blinded manner. Articular inflammation was expressed as a percentage of increase in both hind-paw volumes with respect to their value on day 0. On day 14, animals were classified as arthritic if the increase in hind-paw volumes was higher than the volume increase media of healthy animals fed a standard diet (REF) plus two times its standard deviation.

Experimental design

The standard diet corresponded to the American Institute of Nutrition-93M formulation, which provides the nutrients required for optimal rat maintenance and was used as the reference diet (Table 1). Partially defatted *Natural Forastero* cocoa (Nutrexp, Barcelona, Spain) was used to manufacture cocoa chows. This cocoa powder contained 22% proteins, 16% carbohydrates, 11% lipids and 25.5% fibre, and 21.2 mg of total phenols/g according to the Folin–Ciocalteu method. Cocoa diets (5 and 10%) were prepared partially removing maize starch, soyabean oil, cellulose and casein from American Institute of Nutrition-93M standard starch and adding 50 or

Table 1. Composition of the experimental diets (g/kg)*

Components	Standard chow (AIN-93M, g/kg)	5% Cocoa- enriched chow (g/kg)	10% Cocoa- enriched chow (g/kg)
Casein	140	129	118
L-Cys	1.8	1.8	1.8
Maize starch	465.69	457.69	449.69
Maltodextrin	155	155	155
Sucrose	100	100	100
Soyabean oil	40	34.5	29
Cellulose	50	37.25	24.5
Mineral mix (TD94046)	35	35	35
Vitamin mix (TD94047)	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
tert-Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008
Natural cocoa powder	–	50	100
Total energy (kJ/kg diet)	15 069.6	15 069.6	15 069.6

AIN, American Institute of Nutrition.

* The cocoa powder used contained 22% proteins, 16% carbohydrates, 11% lipids and 25.5% fibre, and 21.2 mg of total phenols/g according to the Folin–Ciocalteu method.

100 g cocoa/kg of chow, respectively (Table 1). In consequence, the resulting chow had the same proportion of carbohydrates, lipids, proteins and total energy as the standard diet. Following the conversion of animal doses into human equivalent doses described by Reagan-Shaw *et al.*⁽³⁵⁾, the 5% cocoa-enriched diet was equivalent to 0.454 g cocoa/kg human per d (27.25 g cocoa for a 60 kg individual) and the 10% cocoa-enriched diet was equivalent to 0.908 g cocoa/kg human per d (54.5 g cocoa for a 60 kg individual).

Animals were randomly distributed into four different experimental groups: REF (*n* 12); arthritic animals fed a standard diet (REF-AA; *n* 11); arthritic animals fed a 5% cocoa-enriched diet (C5-AA; *n* 11); arthritic animals fed a 10% cocoa-enriched diet (C10-AA; *n* 11). The REF and REF-AA groups were fed with the standard diet, the C5-AA group was fed with the 5% cocoa-enriched diet and the C10-AA group with the 10% of cocoa-enriched diet. The diets began 14 d before arthritis induction and lasted until the end of the study, a total of 6 weeks (Fig. 1).

At weeks 2 and 3 post-induction, the animals were anaesthetised by isoflurane inhalation in order to collect 100 µl of blood by tail vein puncture for serum anti-Mb antibody determination (Fig. 1). On day 28 post-induction, the animals were anaesthetised with ketamine (90 mg/kg; Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg; Bayer HealthCare, Kiel, Germany) intraperitoneally and killed by total exsanguination

by cardiac puncture. Blood and lymphoid tissues such as spleen, representative of the systemic immune tissues, and inguinal lymph nodes (ILN), that drain the knee joint synovia, one of the most affected tissues in AA, were obtained. An aliquot of each blood sample was used to automatically count the leucocytes by using a Coulter Counter JT haemocytometer (Hialeah, FL, USA) calibrated for rat blood. The differential white blood count was obtained by manual enumeration of May–Grünwald–Giemsa-stained blood cell smears.

Cell isolation from peripheral blood, lymph nodes and spleen

On the day of killing, blood was immediately treated with 10 g/l NH₄Cl solution to lyse erythrocytes. After washing once with PBS containing 2% fetal bovine serum (FBS; PAA, Pasing, Austria) and 0.1% NaN₃, peripheral blood cells were ready for immunofluorescence staining.

ILN and spleen were broken up by passing the tissues through a steel mesh (Collector™; Bellco, Vertieb, Austria) with Roswell Park Memorial Institute-1640 media containing 10% FBS (RPMI-FBS). Cells were then centrifuged (540 g, 10 min, 4°C) and resuspended in PBS. Then, lymphocytes from ILN were ready for immunofluorescence staining. The spleen cells underwent an erythrocyte lysis by adding distilled water for 5 s and restoring tonicity by adding PBS ten times. Then, cells were washed and resuspended with RPMI-FBS containing 100 000 U/l penicillin and 0.1 g/l streptomycin 2 mM-L-glutamine (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), and 0.05 mM-2-mercaptoethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to be cultured. Number and viability were determined by acridine orange and ethidium bromide (Sigma) staining followed by fluorescence light microscopical analysis.

Immunofluorescence staining and flow cytometry analysis

Lymphocyte phenotype was determined just after cell isolation by double or triple staining, using fluorochrome-conjugated mAb followed by flow cytometry analysis. Mouse anti-rat mAb conjugated to fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, peridinin chlorophyll protein or allophycocyanin used here included the following: anti-T-cell receptor (TCR) αβ (R73), anti-TCRγδ (V65), anti-NKR-P1A (10/78), anti-CD4 (OX-35), anti-CD25 (IL-2Rα chain, OX-39), anti-CD8α (OX-8), anti-

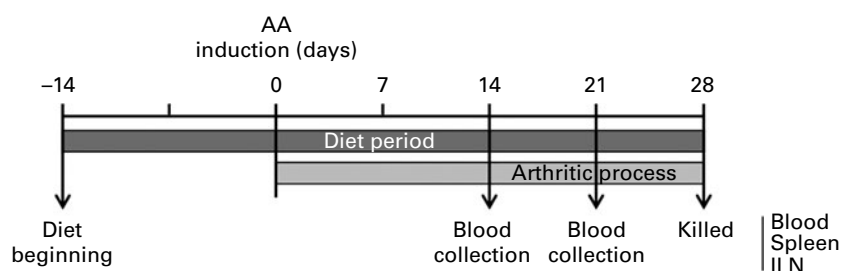


Fig. 1. Diagram of the experimental design beginning 14 d before adjuvant arthritis (AA) induction until day 28 post-induction. ILN, inguinal lymph node.

CD45RA (OX-33), anti-CD81 (Eat2) (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) and anti-Foxp3 (FJK-16a; eBioscience, Frankfurt, Germany). Extracellular staining was performed in 5×10^5 cells by saturating concentrations of fluorochrome-mAb in PBS containing 1% FBS and 0.1% NaN₃ (30 min, 4°C, in the dark). A negative control staining using an isotype-matched mAb was included for each sample. For intracellular staining, cells previously labelled with anti-CD4-phycoerythrin and anti-CD25-fluorescein isothiocyanate mAb were treated with a Foxp3 fixation/permeabilisation kit (eBioscience). Then, intracellular staining with anti-Foxp3-APC mAb was carried out in the same conditions as extracellular staining. All stained cells were fixed with 0.5% *p*-formaldehyde and stored at 4°C in the dark. Analysis was performed using a Cytomics FC500-MPL cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

Lymphocyte subsets were defined in the cytometer as follows: T $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ ⁺ NKR-P1A⁻), T $\gamma\delta$ (CD8⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺), B (CD45RA⁺), natural killer (NK; NKR-P1A⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁻), natural killer T (NKT; NKR-P1A⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺), T_h (CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺), T-cytotoxic (T_c; TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8 α ⁺ NKR-P1A⁻), T_h2 (CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD81⁺), activated T_h (T_{act}; CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻) and regulatory T_h (T_{reg}; CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺). Results are expressed as a percentage of positive cells in the lymphocyte population, selected previously according to the forward and side scatter characteristics of a cellular suspension that includes positive cells stained with anti-TCR, anti-NKR-P1A and anti-CD45RA. In some cases, results are presented as a percentage of positive cells in a specific lymphocyte subset (T, T_h or NK cells).

Anti-Mycobacterium butyricum antibodies in serum

Anti-Mb antibody levels in sera were determined by using an indirect ELISA technique, as described previously⁽³⁶⁾. Briefly, polystyrene microELISA plates (Nunc Maxisorp, Wiesbaden, Germany) were incubated with a soluble protein fraction of Mb in PBS (3 µg/ml). After sample incubation, peroxidase-conjugated goat anti-rat Ig antibodies (BD Biosciences) were used. Since standards were not available, several dilutions of pooled sera from REF-AA animals were added to each plate. This pool was arbitrarily assigned 64 000 U/l anti-Mb antibodies.

Spleen cell culture and cytokines and PGE₂ secretion

Splenocytes were cultured at 3×10^6 cells/ml in twenty-four-well plates. Cells were stimulated with Mb (10 µg/ml) for 24, 48 or 72 h or remained without a stimulus. IL-2 concentration was quantified in the 24 h supernatant using a rat ELISA set (BD Biosciences). Interferon γ (IFN- γ) concentration was determined in the 72 h supernatant with a Biosource ELISA set (Nivelles, Belgium). PGE₂ concentration was determined in the 48 h supernatant by a competitive immunoassay kit from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturers' recommendations. The time points to perform these analyses were established in a preliminary

study by determining the maximal concentrations of these analytes in our culture conditions.

Statistics

The software package SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Levene's and Kolmogorov–Smirnov's tests were applied to assay variance equality and normal distribution of the studied groups, respectively. The one-way ANOVA followed by Scheffé's *post hoc* significance test was applied when the assumptions of normality and equal variance were met. In the opposite case, non-parametric tests (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U*) were used to assay significance. Significant differences were accepted when $P < 0.05$.

Results

Effect of the cocoa diet on body weight and articular inflammation

At the beginning of the study, body weight was 165.2 (SEM 1.1) g for all the studied groups. After 6 weeks of the diet, body weight was 231.8 (SEM 3.6) g for the REF group, 200.2 (SEM 5.4) g for the REF-AA group, 198.9 (SEM 2.4) g for the C5-AA group and 192.9 (SEM 4.0) g for the C10-AA group. Therefore, regardless of the diet, at day 28 post-induction, all AA animals presented similar body weight, which was lower than that of healthy animals ($P < 0.05$).

On day 14 post-induction, arthritis incidence was over 92% for the reference arthritic group (REF-AA), similar to that found in both cocoa-fed groups (C5-AA and C10-AA). The time course of hind-paw volume increase after arthritis induction is summarised in Fig. 2(a). Paw volume reached a maximum increase of 130% in the REF-AA group on day 21 post-induction. Animals from the C5-AA group displayed a lower paw volume increase than the reference group from day 16 to 28 post-induction, but differences were not statistically significant. On the last day of the study, the C5-AA volume increase was reduced by 32% of that of the REF-AA group (Fig. 2(b)). Animals from the C10-AA group showed a paw oedema pattern similar to the REF-AA group, but on the last day of the study, the values were 28% lower than those of the REF-AA (Fig. 2(b)).

Effect of the cocoa diet on peripheral blood lymphocyte subsets in adjuvant arthritis rats

AA induced leucocytosis due to a neutrophil increase while the lymphocyte counts remained in the blood (Table 2). Alterations induced by AA were not modified by the cocoa diet.

Percentages of blood T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$, B, and NK lymphocytes did not change significantly in the REF-AA group (Fig. 3(a)). In the case of arthritic rats, all groups showed lower blood NKT cell percentages than the reference healthy animals (REF). Moreover, the blood T $\alpha\beta$ cell percentage in animals

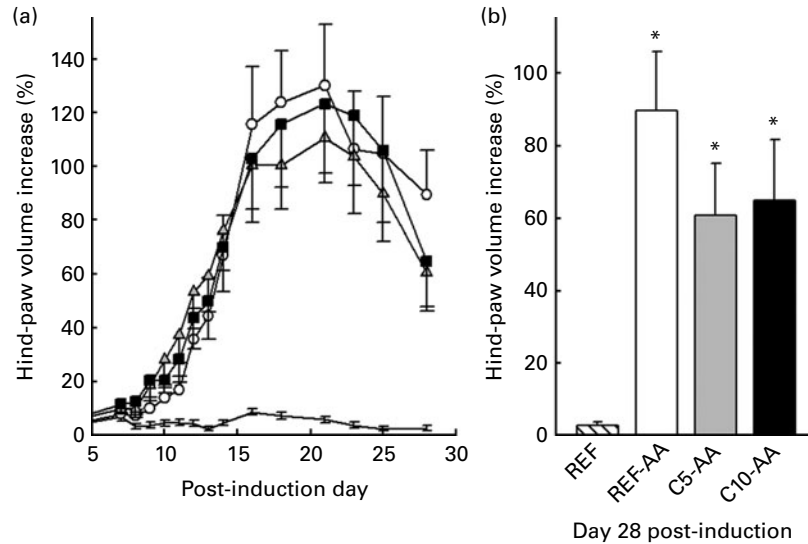


Fig. 2. Effect of cocoa diets on the clinical evolution of adjuvant arthritis (AA) evaluated by hind-paw volume increase, measured by a water plethysmometer. (a) Time course of AA (expressed as a percentage of increase in both hind-paw volumes with respect to their value on day 0): —, healthy animals fed a standard diet (REF); —○—, arthritic animals fed a standard diet (REF-AA); —△—, arthritic animals fed a 5% cocoa-enriched diet (C5-AA); —■—, arthritic animals fed a 10% cocoa-enriched diet (C10-AA). (b) Percentage of hind-paw volume increase on the last day of the study. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 11–12). * Mean values were significantly different from those of the REF group ($P < 0.05$; ANOVA followed by Scheffé's test).

fed a 10% cocoa-enriched diet decreased with respect to the REF-AA group ($P < 0.05$).

With regard to T-cell subsets (Fig. 3(b)), AA increased the T_H -cell proportion ($P < 0.05$) and decreased the T_C -cell percentage ($P < 0.05$), resulting in a higher $T_H:T_C$ ratio in REF-AA animals compared with the REF group. Animals fed a 10% cocoa-enriched diet avoided this $T_H:T_C$ imbalance caused by the arthritic process ($P < 0.05$ *v.* REF-AA). The $T_H:T_C$ ratio in rats from the 5% cocoa diet group remained similar to that of REF animals, although values were not statistically different from the REF-AA group.

The proportion of T_H2 cells was assessed by means of the presence of CD81 in T_H cells. As shown in Fig. 3(c), the arthritic process did not affect the proportion of these cells, but both cocoa diets tended to reduce the T_H2 proportion. Moreover, the AA process reduced the T_{reg} ($CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$) cell proportion with respect to the REF group ($P < 0.05$; Fig. 3(c)) and, interestingly, the 10% cocoa-enriched diet avoided this alteration. T_{act} cell proportion, determined as $CD4^+ CD25^+ Foxp3^-$ lymphocytes, was not affected by AA or the cocoa diets. NK cell subsets determined by CD8 phenotype (Fig. 3(d)) were not modified either by the AA process or cocoa intake.

Effect of the cocoa diet on inguinal lymph node lymphocyte subsets in adjuvant arthritis rats

The study of the main lymphocyte populations in ILN (Fig. 4(a)) revealed almost no changes induced by the arthritic process, as seen in the REF-AA group. There was only an increase in the low percentage of NKT cells ($P < 0.05$), which was also found to a lesser degree in the C5-AA and C10-AA groups. The cocoa diets decreased the B-cell

population in AA rats in comparison with the REF group ($P < 0.05$; Fig. 4(a)), and there was a concomitant increase in $T\alpha\beta$ cells in the C5-AA group.

Although the arthritic process did not modify the proportion of T_H and T_C cells, both cocoa diets produced a decrease in the T_H -cell proportion in ILN ($P < 0.05$; Fig. 4(b)).

On the other hand, neither arthritis nor the cocoa diets changed the T_H2 cell profile in this tissue (Fig. 4(c)). Proportion of regional T_{reg} cell was not affected by the arthritic process or by the cocoa diets (Fig. 4(c)). In contrast, the proportion of T_{act} lymphocytes in arthritic animals increased significantly in ILN ($P < 0.05$).

With respect to the NK cell population (Fig. 4(d)), the arthritic process increased more than twofold the $CD8^+:CD8^-$ ratio in NK cells ($P < 0.05$). The cocoa diets avoided this marked disequilibrium in ILN ($P < 0.05$, C10-AA *v.* REF-AA).

Table 2. Effect of adjuvant arthritis and cocoa diets on blood leucocyte, lymphocyte and neutrophil counts

(Mean values with their standard errors)

Experimental groups	Blood leucocyte counts ($\times 10^9/l$)		Blood lymphocyte counts ($\times 10^9/l$)		Blood neutrophil counts ($\times 10^9/l$)	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
REF (n 12)	2.81	0.63	2.24	0.63	0.46	0.08
REF-AA (n 11)	5.81*	0.95	2.69	0.48	2.76*	0.50
C5-AA (n 11)	5.88*	0.87	2.65	0.51	2.87**	0.48
C10-AA (n 11)	5.06	1.00	2.11	0.56	2.72*	0.50

REF, healthy animals fed a standard diet; REF-AA, arthritic animals fed a standard diet; C5-AA, arthritic animals fed a 5% cocoa-enriched diet; C10-AA, arthritic animals fed a 10% cocoa-enriched diet.

Mean values were significantly different from those of the REF group (one-way ANOVA followed by Scheffé's test); * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

Effect of the cocoa diet on anti-*Mycobacterium butyricum* antibodies in adjuvant arthritis rats

Arthritis induction, by means of heat-killed Mb, involved the synthesis of antibodies directed against mycobacteria (Fig. 5), which are absent in non-induced animals (data not shown). The serum concentration of these antibodies increased during the arthritis time course. The intake of both cocoa diets (5 and 10%) reduced serum anti-Mb antibody synthesis, an effect that was already detected at 2 weeks after induction ($P < 0.05$). This inhibition was dose-dependent and continued until the end of the study.

Effect of the cocoa diet on ex vivo cytokine and PGE₂ secretion by splenocytes

Splenocytes obtained on day 28 post-induction from animals of all the induced groups produced IL-2 and IFN- γ after the Mb challenge (Fig. 6(a) and (b)). IL-2 secretion was higher in splenocytes from the C5-AA and C10-AA groups than those from the REF-AA group ($P < 0.05$; Fig. 6(a)). However, cocoa did not affect IFN- γ secretion, which was similar in all three AA groups (Fig. 6(b)).

PGE₂ was secreted by splenocytes (Fig. 6(c)) from healthy and arthritic animals either without stimulus or after Mb addition. In non-stimulated conditions, PGE₂ released by cells obtained from the C10-AA group was significantly lower than that from the REF and REF-AA groups ($P < 0.05$). However, no significant changes were observed in Mb-stimulated cells.

Discussion

In previous studies, cocoa has shown anti-inflammatory properties both *in vitro* and *in vivo* (22,31). We have previously demonstrated that cocoa-enriched diets in young and adult animals modulate the synthesis of total and specific antibodies (13,15) and also decrease the proportion of T_h cells in several lymphoid compartments (14) in healthy conditions. On the other hand, some studies have reported the protective effect of flavonoids on arthritis models (37–39), and specifically on adjuvant-carrageenin-induced arthritis in rats (40,41). All these results prompted us to study the influence of long-term cocoa diets with two different dosages in a T-cell-mediated systemic inflammation model, as in AA (19), a well-established severe polyarthritis chronic model that lasts at least 3 months (42).

The present study shows that a cocoa-enriched diet was able to decrease the synthesis of antibodies against the pathology inducer during the progression of AA. The cocoa diet was also able to decrease the proportion of T_h lymphocytes in blood and regional lymphoid tissues, which probably include cells responsible for the arthritic process. Moreover, the cocoa diet showed a tendency to modulate hind-paw swelling. The clinical evolution of AA in animals fed a 5% cocoa-enriched diet had a tendency to reduce the severity of the process, but unfortunately, a significant diminution of the arthritic process was not achieved through the cocoa diets. These results are in contrast with those of Pelzer and co-workers (40,41), which showed flavonoid anti-inflammatory actions in a similar

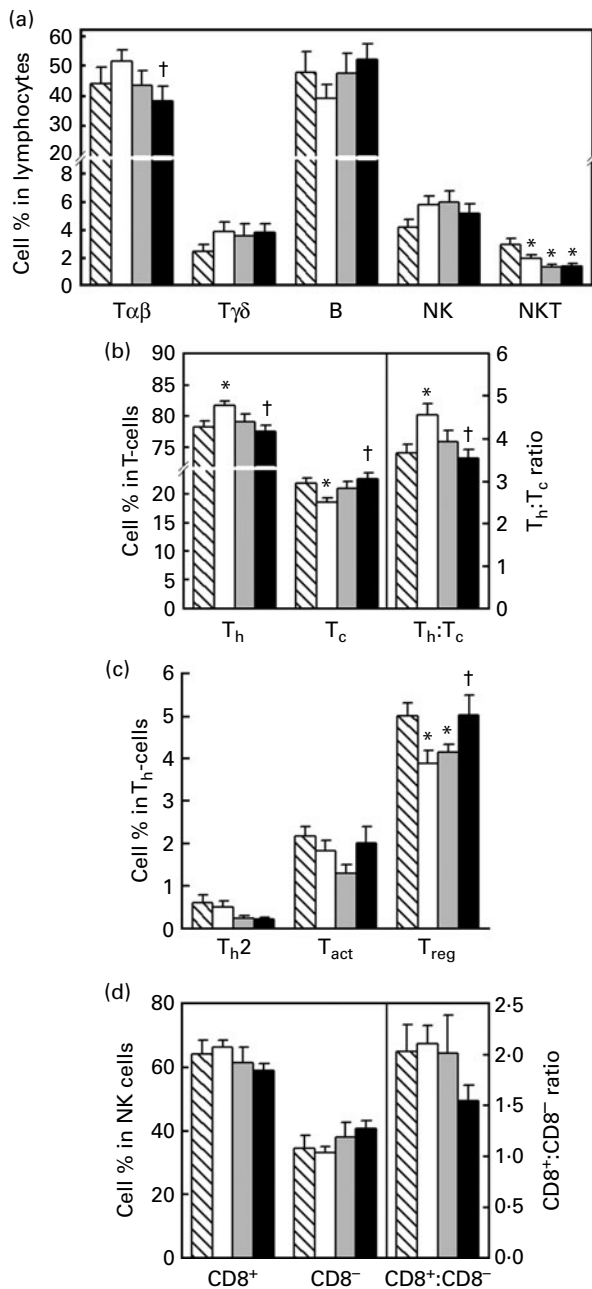


Fig. 3. Lymphocyte subset composition in rat blood, determined by double or triple staining, using fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies followed by flow cytometry analysis. (a) T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$, B, natural killer (NK) and natural killer T (NKT) lymphocyte percentages. (b) T-helper (T_h) and T-cytotoxic (T_c) cell percentages in the T-cell population and T_h:T_c ratio. (c) T_h2, activated T_h (T_{act}) and regulatory T_h (T_{reg}) percentages in the T_h subset. (d) CD8⁺ and CD8⁻ cell percentages in NK lymphocytes. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars ($n = 9-12$, with the exception of B-cells $n = 5-9$). *Mean values were significantly different from those of healthy animals fed a standard diet (REF, ▨) ($P < 0.05$). †Mean values were significantly different from those of arthritic animals fed a standard diet (REF-AA, □) ($P < 0.05$; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests). C5-AA, arthritic animals fed a 5% cocoa-enriched diet (▤); C10-AA, arthritic animals fed a 10% cocoa-enriched diet (▥).

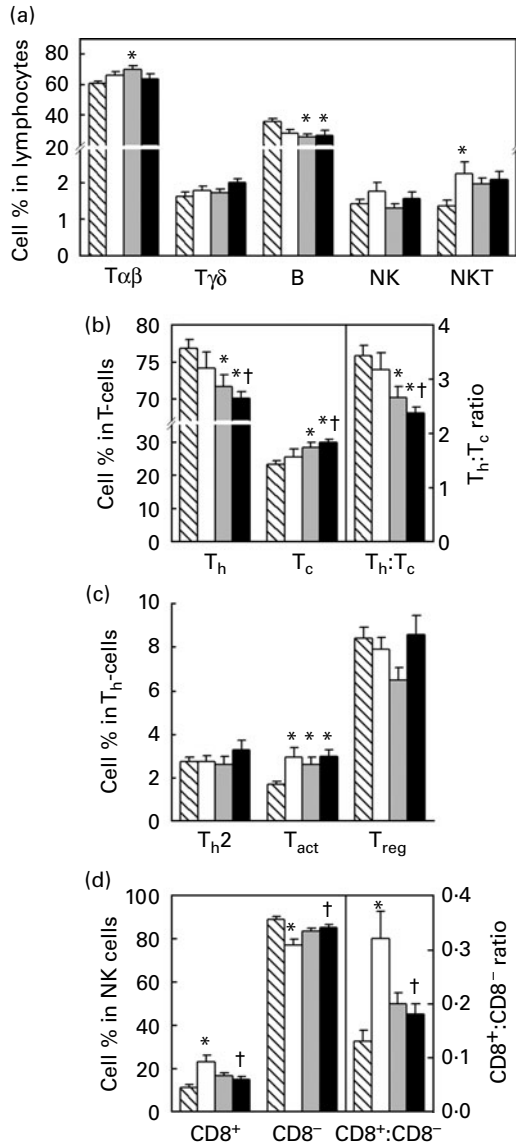


Fig. 4. Lymphocyte subset composition in rat inguinal lymph nodes, determined by double or triple staining, using fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies followed by flow cytometry analysis. (a) T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$, B, natural killer (NK) and natural killer T (NKT) lymphocyte percentages. (b) T-helper (T_h) and T-cytotoxic (T_c) cell percentages in the T-cell population. (c) T_{h2}, activated T_h (T_{act}) and regulatory T_h (T_{reg}) percentages in the T_h subset. (d) CD8⁺ and CD8⁻ cell percentages in NK lymphocytes. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 9–12). *Mean values were significantly different from those of healthy animals fed a standard diet (REF, ▨) (P < 0.05). †Mean values were significantly different from those of arthritic animals fed a standard diet (REF-AA, □) (P < 0.05; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests). C5-AA, arthritic animals fed a 5% cocoa-enriched diet (▤); C10-AA, arthritic animals fed a 10% cocoa-enriched diet (■).

model. However, these studies were performed by using single flavonoids (quercetin, rutin, hesperidin and morin) administered intraperitoneally, and the AA model was induced through a rather different procedure. In addition, some of these flavonoids, such as hesperidin, morin and rutin, are not even present in cocoa, and there are controversial results about the anti-inflammatory capacity of hesperidin⁽⁴³⁾. Our results do not agree with another study that used quercetin

administered orally in a rat AA model⁽⁴⁴⁾. Nevertheless, the quercetin dosage used in that study was very high (150 mg/rat), while the quercetin concentration in a cocoa extract is just over 57 $\mu\text{g/g}$ ⁽⁴⁵⁾. The lack of a clear effect in the present study could then be explained by the low proportion of quercetin in cocoa flavonoids⁽⁴⁵⁾ and the daily intake of cocoa that was about 600 mg/100 g of rat⁽¹⁵⁾. In fact, the main and best-absorbed flavonoid in cocoa is epicatechin⁽⁴⁾, a flavonoid with ascribed anti-inflammatory activities *in vitro*^(22,33).

Previous studies^(13,14) performed on young healthy rats showed that a 10% cocoa-enriched diet produced a decrease in T_h proportion in the spleen and lymph nodes. Here, we have also showed that a cocoa diet reduces the T_h proportion in the blood and ILN in AA rats. In consequence, it could be suggested that cocoa intake could entail reduction in the number of T_h cells involved in the arthritic process⁽²⁰⁾. However, this effect may not be enough to abolish the activity of pathogenic cells. This suggestion is in line with the concentration of IFN- γ , a pro-inflammatory cytokine, released from the splenocyte supernatants, which were similar in the three arthritic groups. IFN- γ is a cytokine mainly produced by T_{act} cells that enhances the inflammatory process through macrophage activation⁽⁴⁶⁾.

The effect of a cocoa diet on T_{reg} cells is also of interest because these cells regulate immune responses⁽⁴⁷⁾, and there is some evidence that patients with rheumatoid arthritis have defective T_{reg} cell function⁽⁴⁸⁾. It has been recently reported that the transference of activated T_{reg} cells to mice with

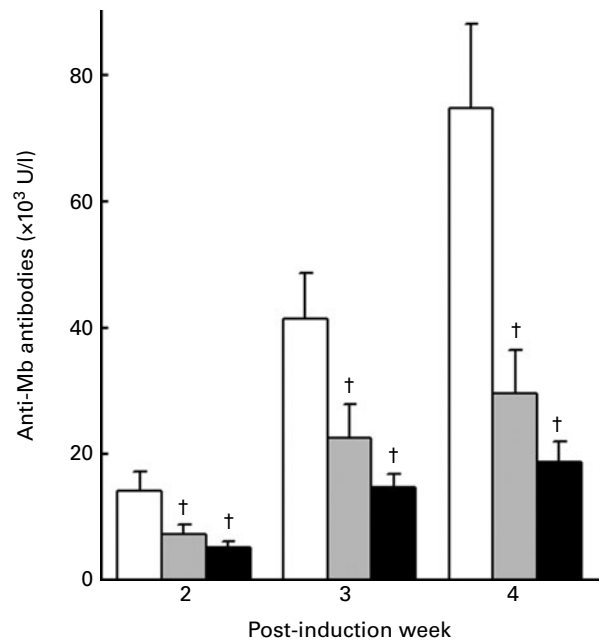


Fig. 5. Anti-*Mycobacterium butyricum* (Mb) antibody concentration in serum during arthritis time course. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 11–12). †Mean values were significantly different from those of arthritic animals fed a standard diet (REF-AA, □) (P < 0.05; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests). C5-AA, arthritic animals fed a 5% cocoa-enriched diet (▤); C10-AA, arthritic animals fed a 10% cocoa-enriched diet (■).

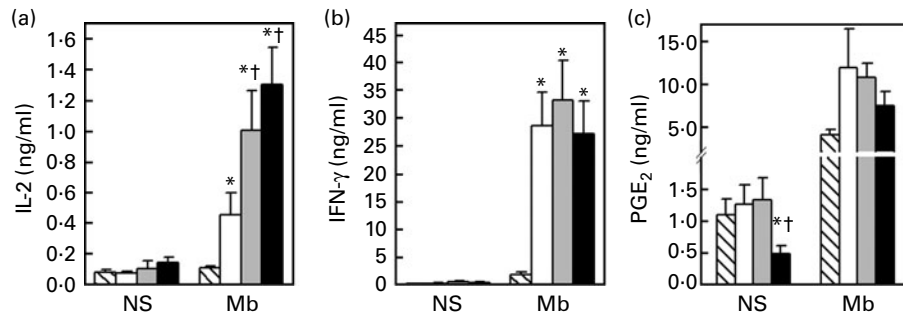


Fig. 6. Inflammatory mediator concentrations in spleen cell supernatants. (a) IL-2 concentration in the 24 h spleen supernatant. (b) Interferon γ (IFN- γ) concentration in the 72 h spleen supernatant. (c) PGE₂ concentration in the 48 h spleen supernatant. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 10–12). * Mean values were significantly different from those of healthy animals fed a standard diet (REF, \square) ($P < 0.05$). † Mean values were significantly different from those of arthritic animals fed a standard diet (REF-AA, \square) ($P < 0.05$; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests). NS, non-stimulated; Mb, *Mycobacterium butyricum* stimulated; C5-AA, arthritic animals fed a 5% cocoa-enriched diet (\square); C10-AA, arthritic animals fed a 10% cocoa-enriched diet (\blacksquare).

collagen-induced arthritis significantly prevented the disease development⁽⁴⁹⁾ and also slowed the arthritic progression⁽⁵⁰⁾. In the present study, AA reduced the proportion of the T_{reg} population in blood, but not in ILN. Interestingly, preventive consumption of a 10% cocoa-enriched diet avoided the T_{reg} decrease, keeping it in the healthy proportion. The increase in the T_{reg} subset proportion in the C10-AA group could be due to an increase in IL-2 synthesis, because it has been reported that IL-2 favours T_{reg} production⁽⁵¹⁾. In the present study, an IL-2 increase was observed in splenocytes from cocoa-fed rats. In any case, the enhancement of T_{reg} induced in 10% cocoa-fed animals was not reflected by a decrease in T_{act} lymphocytes, and these changes were only present in blood and not in ILN.

Another result that deserves attention is the effect of the cocoa diet on NK and NKT cells. NKT cells are immunoregulatory T lymphocytes that can promote cell-mediated immunity against tumours and infectious organisms but can also suppress the cell-mediated immunity associated with allograft rejection and autoimmune disease⁽⁵²⁾. In the present study, AA increased the NKT cell percentage in ILN, and decreased that in blood. With respect to NK cells, previous studies have determined that CD8⁺ NK cells are more cytolytic than CD8⁻ NK cells and this molecule helps NK cells to survive after target cell lysis⁽⁵³⁾. In the present study, the NK CD8⁺:CD8⁻ ratio was increased in ILN from AA animals, suggesting an activation of cytolytic function in these cells by the inflammatory process. A cocoa diet prevented this disequilibrium in regional lymph nodes but this effect was not significantly reflected in articular swelling. Nevertheless, it would be interesting to understand the role of NKT and NK cells in the AA model.

Although AA is ascribed to the cellular response⁽⁵⁴⁾, antibodies against the mycobacteria were developed⁽⁵⁵⁾. Cocoa-enriched diets were able to decrease the levels of anti-Mb antibodies in a similar way as observed in another approach⁽¹⁵⁾. The role of anti-Mb antibodies in the development of hind-paw swelling is negligible but a role in the late phase of arthritis has been suggested⁽⁵⁵⁾. From the present results, it is clear that the reduction of the antibody proportion through cocoa intake was not enough to regulate the arthritic process during the first weeks (when articular inflammation

increased), but it could explain the modulation of arthritic swelling at the 4th week. It is possible that cocoa accelerated the recuperation of this pathology by decreasing the anti-Mb antibody levels. In any case, the down-regulatory effects of antibodies due to cocoa intake could be more significant in autoimmune arthritis, both in experimental models (collagen-induced arthritis) and in human disease.

With respect to PGE₂ release, an increase in its concentration has been reported in the urine of AA rats⁽⁵⁶⁾, just as in human rheumatoid arthritis synovial⁽⁵⁷⁾. Here, we show that a cocoa diet reduced splenocyte PGE₂ production in the C10-AA group. As macrophage is the main source of PGE₂ during inflammation⁽⁵⁸⁾, the PGE₂ reduction found here correlates with previous results, showing that peritoneal macrophages from animals fed cocoa produced lower amounts of other pro-inflammatory mediators such as IL-6, TNF- α and NO *ex vivo*^(31,32).

From the results obtained in the present study, it can be concluded that cocoa intake reduces the T_h-cell proportion and modulates some alterations induced by the arthritic process, such as a decrease in the blood T_{reg} cell percentage and a disequilibrium in inguinal NK cells. Moreover, a cocoa diet reduces the anti-Mb antibody concentration in sera and diminishes spleen PGE₂ production. These changes are not enough to significantly decrease chronic articular swelling, although a tendency to its modulation is observed at the end of the study. Finally, we can conclude that a cocoa diet channels the organism to develop an 'anti-inflammatory environment'. Other studies need to be performed in order to establish the effect of cocoa in autoimmune arthritic models and its potential as an accompaniment of anti-inflammatory drugs.

Acknowledgements

The present study was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (AGL2005-002823), the Ministerio de Sanidad y Consumo (CIBER 06/02/0079) and by the Generalitat de Catalunya, Spain (SGR 2005-0083). S. R.-R. is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (BES-2006-13640). The authors declare they have no competing interests. S. R.-R. carried out the study, performed

the statistical analysis and drafted the manuscript. F. J. P.-C. and C. C. collaborated during the *in vivo* part and in the discussion of the results. M. C. and A. F. designed, supervised and coordinated the study. All the authors read and approved the final manuscript. The authors would like to thank the 'Serveis Científic-Tècnics' of the University of Barcelona, especially Dr J. Comas, for expert assistance in flow cytometry.

References

- Hurst WJ, Tarka SM Jr, Powis TG, *et al.* (2002) Cacao usage by the earliest Maya civilization. *Nature* **418**, 289–290.
- Pucciarelli DL & Grivetti LE (2008) The medicinal use of chocolate in early North America. *Mol Nutr Food Res* **52**, 1215–1227.
- Keen CL (2001) Chocolate: food as medicine/medicine as food. *J Am Coll Nutr* **20**, 436S–439S.
- Rusconi M & Conti A (2010) *Theobroma cacao* L., the food of the gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res* **61**, 5–13.
- Gu L, House SE, Wu X, *et al.* (2006) Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J Agric Food Chem* **54**, 4057–4061.
- Tomas-Barberan FA, Cienfuegos-Jovellanos E, Marín A, *et al.* (2007) A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric Food Chem* **55**, 3926–3935.
- Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, *et al.* (2000) Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2581–2587.
- Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, *et al.* (2010) Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct* **1**, 233–253.
- Aura AM (2008) Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev* **7**, 407–429.
- Selma MV, Espín JC & Tomás-Barberán FA (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem* **57**, 6485–6501.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, *et al.* (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727–747.
- Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Casals I, *et al.* (2003) Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Mass Spectrom* **38**, 35–42.
- Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, *et al.* (2007) Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin Exp Immunol* **149**, 535–542.
- Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, *et al.* (2008) Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem* **19**, 555–565.
- Pérez-Berezo T, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, *et al.* (2009) Influence of a cocoa-enriched diet on specific immune response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol Nutr Food Res* **53**, 389–397.
- Chen G (2010) Immunotherapy of rheumatoid arthritis targeting inflammatory cytokines and autoreactive T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **58**, 27–36.
- Waksman BH (2002) Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand J Immunol* **56**, 12–34.
- Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, *et al.* (2001) Arthritis induced in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* **184**, 184–202.
- Pelegrí C, Morante MP, Castellote C, *et al.* (1995) Administration of a nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (W3/25) prevents adjuvant arthritis, even upon rechallenge: parallel administration of a depleting anti-CD8 monoclonal antibody (OX8) does not modify the effect of W3/25. *Cell Immunol* **165**, 177–182.
- Pelegrí C, Morante MP, Castellote C, *et al.* (1996) Treatment with an anti-CD4 monoclonal antibody strongly ameliorates established rat adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol* **103**, 273–278.
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435.
- Ramiro E, Franch A, Castellote C, *et al.* (2005) Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J Agric Food Chem* **53**, 8506–8511.
- García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, *et al.* (2007) The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* **557**, 221–229.
- de Pascual-Teresa S, Johnston KL, DuPont MS, *et al.* (2004) Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*. *J Nutr* **134**, 552–557.
- Matsuoka Y, Hasegawa H, Okuda S, *et al.* (1995) Ameliorative effects of tea catechins on active oxygen-related nerve cell injuries. *J Pharmacol Exp Ther* **274**, 602–608.
- Mao TK, van de Water J, Keen CL, *et al.* (2002) Modulation of TNF-alpha secretion in peripheral blood mononuclear cells by cocoa flavanols and procyanidins. *Dev Immunol* **9**, 135–141.
- Kenny TP, Keen CL, Schmitz HH, *et al.* (2007) Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**, 293–300.
- Wisman KN, Perkins AA, Jeffers MD, *et al.* (2008) Accurate assessment of the bioactivities of redox-active polyphenolics in cell culture. *J Agric Food Chem* **56**, 7831–7837.
- Jenny M, Santer E, Klein A, *et al.* (2009) Cacao extracts suppress tryptophan degradation of mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *J Ethnopharmacol* **122**, 261–267.
- Ramos-Romero S, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, *et al.* (2008) Anti-inflammatory effects of cocoa in rat carrageenin-induced paw oedema. *Proc Nutr Soc* **67**, E65.
- Castell M, Franch A, Ramos-Romero S, *et al.* (2009) Effect of a diet rich in cocoa flavonoids on experimental acute inflammation. In *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*, 1st ed., pp. 213–229 [RB Keller, editor]. Hauppauge: Nova Science Publishers, Inc.
- Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Pérez-Berezo T, *et al.* (2010) A seven-day high cocoa diet decreases oxidant and inflammatory properties of peritoneal macrophages in rats. *Proc Nutr Soc* **69**, E253.
- Mackenzie GG, Carrasquedo F, Delfino JM, *et al.* (2004) Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J* **18**, 167–169.
- Comalada M, Camuesco D, Sierra S, *et al.* (2005) *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway. *Eur J Immunol* **35**, 584–592.

35. Reagan-Shaw S, Nihal M & Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* **22**, 659–661.
36. Franch A, Cassany S, Castellote C, *et al.* (1992) Adjuvant arthritis pretreatment with type II collagen and *Mycobacterium butyricum*. *Immunobiology* **186**, 351–361.
37. Li R, Cai L, Xie XF, *et al.* (2010) Hesperidin suppresses adjuvant arthritis in rats by inhibiting synoviocyte activity. *Phytother Res* **24**, S71–S76.
38. Kawaguchi K, Maruyama H, Kometani T, *et al.* (2006) Suppression of collagen-induced arthritis by oral administration of the citrus flavonoid hesperidin. *Planta Med* **72**, 477–479.
39. Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, *et al.* (1999) Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 4524–4529.
40. Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, *et al.* (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* **56**, 683–687.
41. Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, *et al.* (2003) Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res* **48**, 601–606.
42. Franch A, Castellote C & Castell C (1994) Anti-type I collagen antibodies in advanced phases of adjuvant arthritis. *Path Res Pract* **190**, 155–158.
43. Rovenský J, Stančíková M, Rovenská E, *et al.* (2009) Treatment of rat adjuvant arthritis with flavonoid (Detralex), methotrexate, and their combination. *Ann N Y Acad Sci* **1173**, 798–804.
44. Mamani-Matsuda M, Kauss T, Al-Kharrat A, *et al.* (2006) Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochem Pharmacol* **72**, 1304–1310.
45. Ortega N, Romero MP, Macià A, *et al.* (2008) Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *J Agric Food Chem* **56**, 9621–9627.
46. Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, *et al.* (2010) Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon γ . *Cytokine* **50**, 1–14.
47. Belkaid Y & Rouse BT (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* **6**, 353–360.
48. Sarkar S & Fox DA (2007) Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **56**, 710–713.
49. Kelchtermans H, Geboes L, Mitera T, *et al.* (2009) Activated CD4 + CD25 + regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* **68**, 744–750.
50. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, *et al.* (2005) Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25 + regulatory T cells. *Arthritis Rheum* **52**, 2212–2221.
51. Malek TR, Yu A, Zhu L, *et al.* (2008) IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol* **28**, 635–639.
52. Godfrey DI, Stankovic S & Baxter AG (2010) Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* **11**, 197–206.
53. Addison EG, North J, Baksh I, *et al.* (2005) Ligation of CD8 α on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology* **116**, 354–361.
54. Van Eden W & Waksman BH (2003) Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 1788–1796.
55. Franch A, Castellote C & Castell M (1994) Effect of acetylsalicylic acid and dexamethasone on antibody production in adjuvant arthritis. *Rheumatol Int* **14**, 27–31.
56. Honda H, Fukawa K & Sawabe T (1980) Influence of adjuvant arthritis in main urinary metabolites of prostaglandin F and E in rats. *Prostaglandins* **19**, 259–269.
57. Goetzl EJ, An S & Smith WL (1995) Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J* **9**, 1051–1058.
58. Humes JL, Bonney RJ, Pelus L, *et al.* (1977) Macrophages synthesis and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* **269**, 149–151.

Artículo 3

‘ATTENUATION OF OXIDATIVE STRESS BY COCOA INTAKE IN ARTHRITIC RATS’

(Atenuación del estrés oxidativo por la ingesta de cacao en ratas artríticas)

Sara Ramos-Romero, Francisco José Pérez-Cano, Emma Ramiro-Puig,
Cristina Castellote, Àngels Franch, Margarida Castell.

Food Chemistry; 2011
(pendiente de aceptación)

Índice de Impacto (SCI 2009): 3,146

Categoría: 6/64 en *Chemistry Applied*, 6/118 en *Food Science and Technology*, 15/66
en *Nutrition and Dietetics*.

Los resultados del presente manuscrito han sido presentados en formato póster en el congreso siguiente:

- XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca, España. 21-24 de Mayo, 2008.
Ramos-Romero S, Ramiro-Puig E, Ramírez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. ‘Efecto de una dieta rica en antioxidantes sobre el estrés oxidativo de la artritis adjuvante’.
Publicado en *Inmunología* 2008; 27(supl. 1): 58.

Resumen

Objetivo: Determinar el efecto de la ingesta de cacao sobre el estrés oxidativo asociado a la artritis adyuvante en rata.

Material y Métodos: Ratas Wistar hembras recibieron dietas enriquecidas con cacao *Natural Forastero* (5 o 10% de cacao) desde las 2 semanas previas a la inducción de artritis adyuvante hasta el final del estudio, 4 semanas tras la inducción. Otro grupo de animales recibió la dieta estándar y una suspensión del flavonoide quercetina (p.o., 200 mg/kg) en días alternos durante el periodo de latencia de esta patología (10 días tras la inducción). La artritis adyuvante se indujo por inyección intradérmica de una suspensión de *Mycobacterium butyricum* inactivado y el seguimiento de la inflamación articular se llevó a cabo mediante la puntuación de las cuatro extremidades. A partir de macrófagos peritoneales aislados se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio del ensayo con diclorofluoresceína. En homogenizado de bazo se determinó la actividad de los enzimas superóxido dismutasa (total, citosólica y mitocondrial) y catalasa mediante ensayos comerciales.

Resultados: La administración de quercetina y el consumo de dietas enriquecidas con cacao no redujeron significativamente la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la dieta con 5% de cacao y la administración del flavonoide quercetina disminuyeron significativamente la producción de ROS por parte de macrófagos peritoneales. Además, la dieta enriquecida con un 5% de cacao normalizó la actividad mitocondrial de la superóxido dismutasa y de la catalasa en bazo. La dieta con un contenido del 10% de cacao no produjo ningún cambio significativo en las variables estudiadas.

Conclusiones: La ingesta de cacao, a pesar de no controlar el desarrollo de la inflamación articular en la artritis adyuvante, reduce el estrés oxidativo asociado a esta patología inflamatoria crónica.

1 **COCOA INTAKE ATTENUATES OXIDATIVE STRESS**
2 **ASSOCIATED TO RAT ADJUVANT ARTHRITIS**

3
4 **Authors:** Sara Ramos-Romero¹, Francisco J. Pérez-Cano^{1,2}, Emma Ramiro-Puig¹,
5 Àngels Franch^{1,2,3}, Margarida Castell^{1,2*}.

6
7 **Institutional Address:**

8 ¹ Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Spain

9 ² Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Barcelona, Spain

10 ³ CIBER Epidemiología y Salud Pública, Spain

11
12 ***Corresponding author:**

13 Margarida Castell, PhD

14 Department de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

15 Av Joan XXIII s/n, Edifici B, 3^a planta

16 08028, Barcelona, Spain

17 Phone: +34 93 402 45 05

18 Fax: +34 93 403 59 01

19 e-mail address: margaridacastell@ub.edu

20 **ABSTRACT**

21

22 Cocoa contains flavonoids with antioxidant properties. The aim of the present study was
23 to ascertain the effect of cocoa intake on oxidative stress associated to a model of
24 chronic inflammation as is adjuvant arthritis (AA). Female Wistar rats were fed with 5
25 or 10% cocoa-enriched diet or were given p.o. a quercetin suspension every other day
26 during 10 days. AA was induced by a heat-killed *Mycobacterium butyricum* suspension.
27 Reactive oxygen species (ROS) produced by peritoneal macrophages, and superoxide
28 dismutase (total, cytoplasmic and mitochondrial) and catalase activities were
29 determined in spleen homogenates. Clinically, joint swelling was not reduced by
30 antioxidants, however, the 5% cocoa diet and quercetin administration in arthritic rats
31 reduced ROS production. Moreover, the 5% cocoa diet normalized the activities of
32 superoxide dismutase and catalase. In conclusion, cocoa diet reduces the oxidative
33 stress associated to a chronic inflammatory pathology, although was not enough to
34 attenuate joint swelling.

35

36 **Keywords:** cocoa flavonoids, quercetin, oxidative stress, antioxidant enzymes, adjuvant
37 arthritis

38 1. Introduction

39

40 Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systemic, autoimmune and inflammatory
41 disease characterized by joint inflammation and synovial hyperplasia, involving
42 infiltration of activated T cells and macrophages. Macrophages by means of their pro-
43 inflammatory properties contribute considerably to inflammation and produce bone and
44 cartilage degradation in RA through the release of proteolytic enzymes, reactive oxygen
45 and nitrogen species (ROS and RNS) (Phillips, Dias, Kitas, & Griffiths, 2010). Among
46 ROS, the superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) increases the vascular permeability and promotes
47 neutrophil migration and can be converted in hydroxyl radical (HO^{\cdot}), becoming more
48 aggressive (Afonso, Champy, Mitrovic, Collin, & Lomri, 2007). The superoxide
49 dismutase (SOD) is an endogenous enzyme that catalyzes the $O_2^{\cdot -}$ dismutation into
50 H_2O_2 . Subsequently, the endogenous enzyme catalase transforms it to H_2O and O_2 . SOD
51 shows three isoforms: the cytoplasmic SOD1, the mitochondrial SOD2, and the
52 extracellular SOD3 (EC-SOD). SOD1 and SOD3 use copper and zinc as cofactors, and
53 manganese is the cofactor of SOD2 (Afonso et al., 2007).

54

55 Oxidative stress is important in the pathogenesis of RA since oxidation markers
56 and impaired antioxidant status are found in plasma and synovial fluid from RA patients
57 (Kamanli, Naziroğlu, Aydılek & Hacıevliyagil, 2004; Seven, Güzel, Aslan &
58 Hamuryudan, 2008; Filippin, Vercelino, Marroni & Xavier, 2008; Pattison & Winyard,
59 2008; Vasanthi, Nalini, & Rajasekhar, 2009). Moreover, several studies prompt the
60 beneficial effect of antioxidants in RA patients (Tiku, Gupta, & Deshmukh, 1999;
61 Nourmohammadi et al., 2010). Flavonoids are antioxidant compounds from
62 polyphenolic family found in vegetables. Cocoa (product of *Theobroma cacao*) is a
63 natural flavonoid source, mainly containing flavanols such as epicatechin and catechin,
64 and their polymers called procyanidins, and moreover smaller amount of other
65 flavonoids as quercetin (Pérez-Cano et al, 2009). The antioxidant effects of quercetin
66 and catechin have been extensively studied on a variety of inflammatory processes and
67 immune functions (Boots, Haenen, & Bast, 2008; Bischoff, 2008). Previous studies
68 performed show that cocoa and its flavonoids reduce the macrophage ability to release
69 inflammatory mediators including ROS and NO (Ramiro et al, 2005; Castell, Franch,

70 Ramos-Romero, Ramiro-Puig, Pérez-Cano & Castellote, 2009; Ramos-Romero,
71 Pérez-Cano, Pérez-Berezo, Castellote, Franch & Castell, 2011). Moreover, cocoa diet
72 increased the SOD and catalase activities in healthy rat thymus (Ramiro-Puig et al,
73 2007).

74

75 Due to the antioxidant properties demonstrated by cocoa diet, it could be
76 hypothesized that cocoa intake can modulate the oxidative stress provoked by an
77 inflammatory disease. The aim of the present study was to ascertain the effect of cocoa-
78 enriched diets in the oxidant and antioxidant in status rats with arthritic adjuvant.

79 **2. Material and methods**

80 *2.1. Animals and diets*

81 Nine-week-old female Wistar rats were obtained from Harlan (Barcelona,
82 Spain). Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the
83 care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal
84 Experimentation at the University of Barcelona and approved by the Catalanian
85 Government.

86 Animals were fed standard diet or diet containing 5% or 10% of partially
87 defatted *Natural Forastero* cocoa (Nutrexpá, Barcelona, Spain) containing 21.2 mg of
88 total phenols/g (Folin-Ciocalteu method). Diets began 14 days before the adjuvant
89 arthritis induction and lasted until the end of the study (six weeks later). Animals were
90 randomly distributed in 5 different experimental groups (11 rats/group): REF (healthy
91 reference animals), AA (arthritis reference animals), Q (arthritic animals treated p.o.
92 with 200 mg of quercetin /kg on days 0, 2, 4, 6, 8, and 10 after AA induction), C5
93 (arthritic animals fed 5% cocoa) and C10 (arthritic animals fed 10% cocoa).

94

95 *2.2. Induction and evaluation of adjuvant arthritis (AA)*

96 AA was induced in all the animals with exception of the REF group. AA was
97 induced by injecting intradermally a suspension of 0.5 mg of heat-killed *Mycobacterium*
98 *butyricum* (Difco, Detroit, MI, USA) in 0.1 ml of liquid vaseline into the base of the rat
99 tail. AA severity was scored by two independent observers, in a blinded manner,
100 according to: no signs of inflammation (0), redness or slight swelling in the paw
101 articulations (1), moderate swelling in the paw articulations (2), deep swelling in the
102 paw articulations (3), swelling and immobility (4). Arthritis score was calculated for
103 every animal as sum of the score of the four paws.

104

105 The clinical score and body weight were determined weekly in all the studied
106 groups. On day 28 post-induction, animals were anaesthetized i.m. with ketamine (90
107 mg/kg; Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg; Bayer HealthCare, Kiel,
108 Germany), and peritoneal macrophages and spleen were obtained. Spleen sections were
109 immediately frozen at -80 °C until analysis.

110

111 *2.3. Peritoneal macrophage isolation and ROS production (DCF assay)*

112 Peritoneal macrophages were obtained by injecting 40 mL of ice-cold sterile
113 PBS (pH 7.2) into peritoneal cavity. After 2 min of abdominal massages, cell
114 suspension was aspirated. Macrophages were plated and allowed to attach overnight,
115 then they were washed with warm RPMI medium without phenol red (Sigma-Aldrich)
116 containing 100 IU/mL streptomycin-penicillin. Macrophages were incubated with 20
117 $\mu\text{mol/L}$ of reduced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate probe ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$; Invitrogen,
118 Paisley, UK) for 30 min at 37 °C. Macrophage ROS oxidize H_2DCF to a fluorescent
119 compound (DCF). Fluorescence was measured at 30, 60 and 90 min by a fluorometer
120 (excitation 538 nm, emission 485 nm).

121

122 *2.4. Spleen superoxide dismutase*

123 A spleen piece was homogenized in cold 0.1 g/mL HEPES buffer (20 mM pH
124 7.2, containing 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid EGTA, 210 mM mannitol and 70
125 mM sucrose) and centrifuged (1,500 g, 5 min, 4 °C). The total SOD activity was
126 determined in the supernatant using Superoxide Dismutase Assay Kit II (Merck KGaA,
127 Darmstadt, Germany) following the manufacturer's instructions. To determine SOD
128 subtypes, homogenate supernatant was centrifuged at 10,000 g. The supernatant and the
129 pellet were used to evaluate the cytoplasmic and mitochondrial SOD activity,
130 respectively. In the mitochondrial SOD quantification, the pellet was resuspended with
131 HEPES buffer, and potassium cyanide (3 mM, Sigma-Aldrich) was added to the
132 samples to inhibit cytoplasmic SOD. One unit of SOD is defined as the amount of
133 enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. SOD activity was
134 expressed as units (U) of SOD per g of protein from spleen homogenates (quantified
135 following the Bradford method using the BioRad Protein Assay of Bio-Rad
136 Laboratories Inc., Hercules, CA).

137

138 *2.5. Spleen catalase activity*

139 A spleen fragment was homogenized 0.1 g/mL on ice cold phosphate buffer (50
140 mM K_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , and 1 mM EDTA, pH 7.0) and centrifuged (10,000 xg,
141 15 min, 4 °C). The catalase activity was determined in the supernatant by using a
142 Catalase Assay Kit (Merck) following the manufacturer's instructions. The detection
143 method was based on the reaction of the enzyme with methanol in the presence of an
144 optimal concentration of H_2O_2 and the formaldehyde produced was measured
145 spectrophotometrically with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole as the

146 chromogen. Catalase activity was expressed as nmol of formaldehyde per min per g of
147 protein from spleen homogenates.

148

149 *2.6. Statistics*

150 The software package PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used
151 for statistical analysis. Levene's and Kolmogorov-Smirnov's tests were applied to assay
152 variance equality and normal distribution of the studied groups, respectively. The one-
153 way analysis of variance (ANOVA) followed by the Scheffé's post hoc significance test
154 was applied when the assumptions of normality and equal variance were met. In the
155 opposite case, non parametric tests (Kruskal-Wallis and U Mann-Whitney) were used to
156 assay significance. Significant differences were accepted when $P < 0.05$.

157 **3. Results and discussion**

158 Rheumatoid arthritis, as well as experimental models of arthritis, has been
159 associated to oxidative stress (Kamanli et al, 2004; Seven et al., 2008; Vasanthi et al.,
160 2009). In consequence, foods with antioxidant properties could help in the treatment of
161 RA decreasing this harmful status (Efthimiou & Kukar, 2010). The results obtained here
162 show the effects of cocoa-enriched diets and quercetin treatment on some markers of the
163 oxidative stress in adjuvant arthritis after 4 weeks of induction.

164

165 Clinics of adjuvant arthritis was measured weekly by means of arthritis score
166 and body weight increase. As it can be seen in Table 1, maximum scores in AA group
167 were achieved after 3 weeks of induction. At the end of the study there was a certain
168 reduction in articular inflammation. Neither cocoa diets (groups C5 and C10) or
169 quercetin treatment (group Q) were able to prevent joint swelling, and even it appeared
170 earlier. However, after maximum scores on day 21 after induction, the groups Q, C5
171 and C10 underwent a faster recuperation than AA rats. These results correlate with the
172 body weight increase: during the first two weeks, body weight decreased in all groups
173 receiving AA induction, thereafter body weight rose and this recovering was faster in
174 C5 and C10 groups than in AA and Q groups (Table 1).

175

176 Peritoneal macrophages, obtained after 4 weeks of AA induction allow
177 estimating the potential oxidative in adjuvant arthritis (Fig. 1). Macrophages from AA
178 animals synthesized higher amounts of ROS than those from REF group ($P<0.001$).
179 Macrophages from the C5 and Q groups, but not from C10 group, produced lower ROS
180 than AA rats ($P<0.05$). These results indicate the attenuation of the oxidative stress by
181 certain doses of cocoa flavonoids. In a similar way, it has been reported the increased
182 ROS synthesis in adjuvant arthritis rats and their modulation by antioxidant compounds
183 (Jung, Nam, Choi, Lee & Park, 2005; Jawed, Shah, Jamall & Simjee, 2010; Arulmozhi,
184 Mazumder, Sathiyarayanan & Ashok, 2011). Moreover, the attenuation of ROS by
185 cocoa diet is in line with results derived from macrophages obtained of both cocoa-fed
186 healthy rats (Castell et al., 2009) and rats with collagen-induced arthritis fed cocoa
187 (Ramos-Romero et al., 2011). Similarly, administration of quercetin is able to decrease
188 ROS concentration in a model of kidney inflammation (Liu, Ma, & Sun 2010). The
189 inhibition of ROS synthesis by flavonoids has been associated to their free-radical
190 quenching activity (Avila, Bertolotti, Criado, Pappano, Debattista & García, 2001). On

191 the other hand, it must be taken into account that the richest cocoa diet did not produce
192 antioxidant effects that may be due to the fact that flavonoids can become pro-oxidants
193 when are in high concentration (Nijveldt, van Nood, van Hoorn, Boelens, van Norren &
194 van Leeuwen, 2001).

195 To protect tissues from oxidative injuries, body possesses enzymatic antioxidant
196 enzyme systems such as superoxide dismutases and catalase enzymes. It has been
197 reported that AA decrease serum or synovial SOD and catalase activities together with
198 other endogenous antioxidant systems (Jung et al., 2005; Tastekin et al., 2007; Jaweg et
199 al, 2010; Arulmozhi et al 2011; Kripa, Chamundeeswari, Thanka & Uma Maheswara
200 Reddy, 2011). Here we found that after 4 weeks from induction, AA produced a
201 decrease in catalase activity in spleen ($P < 0.05$; Fig. 3) and, paradoxically, an increase
202 in total and mitochondrial splenic SOD ($P < 0.05$; Fig. 2). The decreased catalase
203 activity could reflect the consumption of catalase in neutralizing the H_2O_2 . On the other
204 hand, increased splenic SOD activities could reflect the response of the body to
205 increased ROS concentrations. A similar increase in SOD activity is found in plasma
206 from RA patients (Bhowmick, Chakraborti, Gudi, Kuttu Moideen & Shetty, 2008) and
207 synovial membrane of mice with collagen-induced arthritis (Kasama et al, 1988).

208
209 Interestingly, the changes in the enzymatic antioxidant systems produced by AA
210 were significantly and totally prevented in the group C5 that was fed with a diet
211 containing 5% cocoa ($P < 0.05$; Fig. 2 and 3). SOD and catalase activities in groups C10
212 and Q were not significantly different from AA rats although there was a certain
213 protective effect (Fig. 2 and 3). The protective effect of 5% cocoa diet on antioxidant
214 systems in AA agrees with the effect of other flavonoids or compounds of botanical
215 origin on this experimental inflammatory model (Ramprasath, Shanthi &
216 Sachdanandam, 2005; Narendhirakannan, Subramanian & Kandaswamy, 2005;
217 Arulmozhi et al, 2011; Kripa et al, 2011), although these studies find clinical
218 improvement of AA.

219
220 From the results obtained in the present study, it can be concluded that cocoa
221 intake reduces the oxidative stress provoked by adjuvant arthritis. The antioxidant cocoa
222 effect is high dependent on the doses employed. Anyway, further studies must to deeper

223 the role of cocoa, source of antioxidant flavonoids, as a coadjuvant in the treatment of
224 chronic inflammatory diseases.

225

226 **Acknowledgements**

227 The present study was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain
228 (AGL2005-002823), and by the Generalitat de Catalunya, Spain (SGR 2005-0083). S.R.
229 is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain
230 (BES-2006-13640).

231

232 **References**

- 233 Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen
234 species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4),
235 324-329.
- 236 Arulmozhi, S., Mazumder, P. M., Sathiyarayanan, L., & Ashok, P. (2011). Anti-
237 arthritic and antioxidant activity of leaves of *Alstonia scholaris* Linn. R.Br. *Journal*
238 *of Integrative Medicine*, in press.
- 239 Ávila, V., Bertolotti, S. G., Criado, S., Pappano, N., Debattista, N., & García, N. A.
240 (2001). Antioxidant properties of natural flavonoids: quenching and generation of
241 singlet molecular oxygen. *International Journal of Food Science & Technology* 36,
242 25–33.
- 243 Bhowmick, K., Chakraborti, G., Gudi, N.S., Kutty Moideen, A. V., & Shetty. H. V.
244 (2008) Free radical and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Indian Journal of*
245 *Rheumatology* 3: 8–12
- 246 Bischoff, S. C. (2008). Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease.
247 *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11(6), 733-740.
- 248 Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from
249 antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2-3), 325-
250 337.
- 251 Castell, M., Franch, A., Ramos-Romero, S., Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., &
252 Castellote, C. (2009). Effect of a diet rich in cocoa flavonoids on experimental acute
253 inflammation. In Keller, R. B. (Ed.), *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects*
254 *and Dietary Sources* (pp. 213-229). Hauppauge: Nova Science Publishers Inc.
- 255 Efthimiou, P. & Kukar, M. (2010) Complementary and alternative medicine use in
256 rheumatoid arthritis: proposed mechanism of action and efficacy of commonly used
257 modalities *Rheumatology International*, 30, 571-586.
- 258 Filippin, L.I., Vercelino, R., Marroni, N.P. & Xavier, R.M. (2008) Redox signalling and
259 the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental*
260 *Immunology*, 152, 415-422.
- 261 Jawed, H., Shah S. U. A., Jamall, S., & Simjee, S. U. (2010) N-(2-hydroxy phenyl)
262 acetamide inhibits inflammation-related cytokines and ROS in adjuvant-induced
263 arthritic (AIA) rats. *International Immunopharmacology*, 10, 900-905.
- 264 Jung, H. J., Nam, J. H., Choi, J., Lee, K. T., Park, H. J. (2005) Antiinflammatory effects
265 of chiisanoside and chiisanogenin obtained from the leaves of *Acanthopanax*

266 *chiisanensis* in the carrageenan- and Freund's complete adjuvant-induced rats.
 267 *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 359-367

268 Kamanli, A., Naziroğlu, M., Aydilek, N. & Hacievliyagil, C. (2004) Plasma lipid
 269 peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. *Cell*
 270 *Biochemistry and Function*, 22(1), 53-57.

271 Kasama, T., Kobayashi, K., Sekine, F., Negishi, M., Ide, H., Takahashi, T., & Niwa, Y.
 272 (1988) Follow-up study of lipid peroxides, superoxide dismutase and glutathione
 273 peroxidase in the synovial membrane, serum and liver of young and old mice with
 274 collagen-induced arthritis. *Life Science* 43, 1887-1896.

275 Kripa, K. G., Chamundeeswari, D., Thanka, J., & Uma Maheswara Reddy, C. (2011)
 276 Modulation of inflammatory markers by the ethanolic extract of *Leucas aspera* in
 277 adjuvant arthritis. *Journal of Ethnopharmacology* 134, 1024-1027.

278 Liu, C. M., Ma, J. Q. & Sun, Y. Z. (2010). Quercetin protects the rat kidney against
 279 oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead.
 280 *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(3), 264-271.

281 Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E., Boelens P. G., van Norren K., & van
 282 Leeuwen P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and
 283 potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418-425.

284 Narendhirakannan, R. T., Subramanian, S., & Kandaswamy, M. (2005). Free radical
 285 scavenging activity of *Cleome gynandra* L. leaves on adjuvant induced arthritis in
 286 rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 276, 71-80.

287 Nourmohammadi, I., Athari-Nikazm, S., Vafa, M.R., Bidari, A., Jazayeri, S.,
 288 Hoshyarrad, A., Hoseini, F., & Fasihi-Radmandi, M. (2010). Effects of antioxidant
 289 supplementations on oxidative stress in rheumatoid arthritis patients. *Journal of*
 290 *Biological Sciences*, 10, 63-66.

291 Pattison, D.J. & Winyard, P.G. (2008) Dietary antioxidants in inflammatory arthritis: do
 292 they have any role in etiology or therapy? *Nature Clinical Practice Rheumatology*, .
 293 4 (11), 590-596

294 Perez-Cano, F.J., Pérez-Berezo, T., Ramos-Romero, S., Ramiro-Puig, E., Castellote, C.,
 295 Franch, A. & Castell, M. (2009) Is There an Anti-Inflammatory Potential Beyond
 296 the Antioxidant Power of Cocoa? In M. R. Bishop (Eds.), *Chocolate, Fast Foods*
 297 *and Sweeteners: Consumption and Health* (chapter 4 pp. 1-20) Hauppauge: Nova
 298 Science Publishers Inc.

- 299 Ramiro, E., Franch, À., Castellote, C., Pérez-Cano, F., Permanyer, J., Izquierdo-Pulido,
300 M., Castell, M. (2005). Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate
301 inflammatory mediators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22),
302 8506-8511.
- 303 Ramprasath, V. R., Shanthi, P., & Sachdanandam, P. (2005). Semecarpus anacardium
304 Linn. nut milk extract, an indigenous drug preparation, modulates reactive
305 oxygen/nitrogen species levels and antioxidative system in adjuvant arthritic rats.
306 *Molecular and Cellular Biochemistry* 276, 97-104.
- 307 Ramos-Romero, S., Pérez-Cano, F.J., Pérez-Berezo, T., Castellote, C., Franch, A., &
308 Castell, C. (2011). Effect of a cocoa flavonoid-enriched diet on experimental
309 autoimmune arthritis. *British Journal of Nutrition*, in press.
- 310 Seven, A., Güzel, S., Aslan, M. & Hamuryudan, V. (2008) Lipid, protein, DNA
311 oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*,
312 41(7-8), 538-543.
- 313 Tastekin, N., Aydogdu, N., Dokmeci, D., Usta, U., Birtane, M., Erbas, H., & Ture, M.
314 (2007). Protective effects of l-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant
315 arthritis. *Pharmacological Research* 56, 303–310.
- 316 Tiku, M. L., Gupta, S. & Deshmukh, D. R. (1999) Aggrecan degradation in
317 chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants.
318 *Free Radical Research*, 30(5), 395-405.
- 319 Vasanthi, P., Nalini, G., & Rajasekhar, G. (2009). Status of oxidative stress in
320 rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 12(1), 29-33.

321 **Figure legends**

322 **Fig. 1.** Time-course of ROS production by peritoneal macrophages, expressed in
323 fluorescence units (FU) and determined by DCF assay. Values are expressed as mean \pm
324 SEM ($n=8$). * $P < 0.05$ vs Reference group, $\Phi P < 0.05$ vs CIA group (Kruskal-Wallis
325 and U Mann-Whitney tests).

326

327 **Fig. 2.** Activity of SOD subtypes in spleen homogenates. (A) Total, (B) cytosolic, and
328 mitochondrial SOD activities (C) are expressed as units (U)/g of protein. Each bar
329 represents the mean \pm S.E.M., $n=11$. * $P < 0.05$ compared with the reference group. Φ
330 $P < 0.05$ compared with the arthritis reference group (Kruskal-Wallis and U-Mann-
331 Whitney tests).

332

333 **Fig. 3.** Catalase activity in spleen homogenates expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ of protein.
334 Each bar represents the mean \pm S.E.M., $n=11$. * $P < 0.05$ compared with the Reference
335 group. $\Phi P < 0.05$ compared with the arthritis reference group (ANOVA followed by
336 Scheffé's test).

337 **Table 1.** Effect of flavonoid intake in body weight and AA severity. Values are
 338 summarized as mean \pm S.E.M. ($n = 11$). Clinical score was established according to: no
 339 signs of inflammation (0), redness or slight swelling in the paw articulations (1),
 340 moderate swelling in the paw articulations (2), deep swelling in the paw articulations
 341 (3), swelling and immobility (4). Results are showed as the sum of the four paws score.
 342

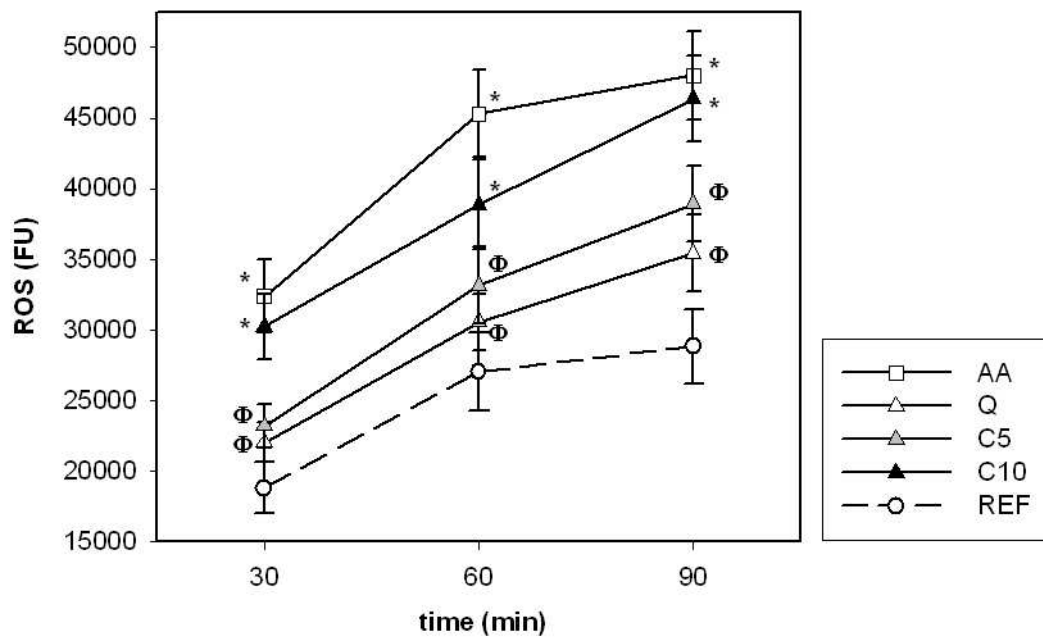
		post-induction day			
		7	14	21	28
Body Weight Increase (%)	REF	7.3 \pm 0.5	11.6 \pm 0.9	15.1 \pm 1.0	17.5 \pm 1.2
	AA	-0.7 \pm 1.0 *	-1.1 \pm 1.6 *	-1.6 \pm 2.2 *	1.6 \pm 2.1 *
	Q	-3.1 \pm 1.1 *	-4.2 \pm 0.9 *	-1.6 \pm 1.4 *	2.0 \pm 1.5 *
	C5	-2.3 \pm 1.7 *	-3.3 \pm 1.8 *	0.1 \pm 1.7 *	5.0 \pm 1.5 *
	C10	-2.2 \pm 1.2 *	-1.4 \pm 1.8 *	0.2 \pm 2.4 *	4.9 \pm 2.7 *
Clinical Score	REF	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
	AA	0.1 \pm 0.1	4.4 \pm 0.7	6.6 \pm 1.1	5.1 \pm 1.0
	Q	1.0 \pm 0.3 Φ	5.0 \pm 0.8	6.8 \pm 1.3	4.1 \pm 0.8
	C5	0.8 \pm 0.3 Φ	4.9 \pm 0.7	5.9 \pm 0.9	3.9 \pm 0.7
	C10	1.0 \pm 0.5	5.2 \pm 0.9	5.6 \pm 0.9	4.4 \pm 1.0

343

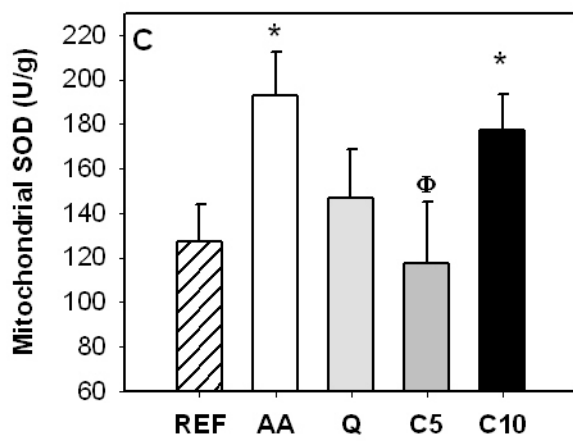
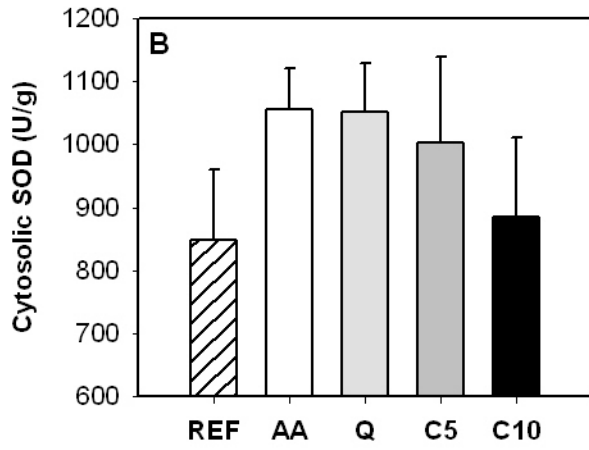
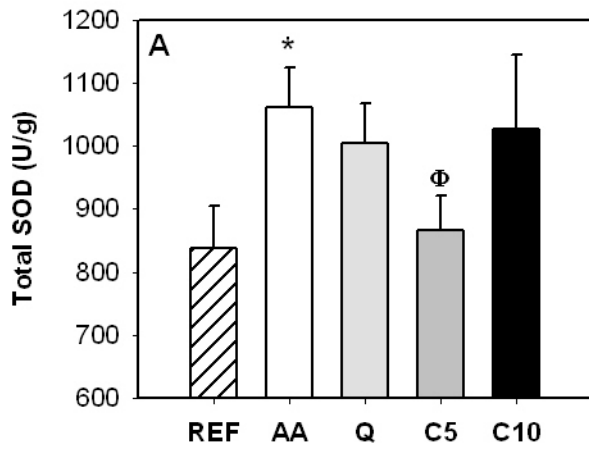
344 Data were analysed by one-way ANOVA followed by Scheffé's test.

345 * $P < 0.001$ vs REF group; $\Phi P < 0.05$ vs AA group

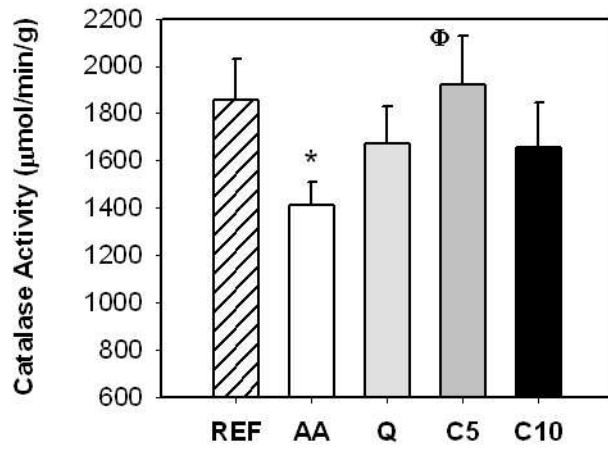
346 Figure 1



347



350 Figure 3



351

Artículo 4

‘EFFECT OF A COCOA FLAVONOID-ENRICHED DIET ON EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ARTHRITIS’

(Efecto de una dieta enriquecida con flavonoides de cacao
sobre artritis autoinmune experimental)

Sara Ramos-Romero, Francisco José Perez-Cano, Teresa Pérez-Berezo,
Cristina Castellote, Àngels Franch, Margarida Castell.

British Journal of Nutrition; 2011

(doi: 10.1017/S000711451100328X; en prensa)

Índice de Impacto (SCI 2009): 3,446

Categoría: 11/66 en *Nutrition and Dietetics*.

Los resultados del presente artículo han sido presentado en formato póster en el congreso siguiente:

- 5th European Workshop on Immune-Mediated Inflammatory Diseases. Sitges, España. 1-3 Diciembre, 2010.

Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Castellote C, Franch A, Castell M. ‘Modulation of oxidative stress and TNF α secretion by peritoneal macrophages of arthritic rats fed with a flavonoid-enriched diet’.

Publicado en *J Transl Med* 2010; 8: P24.

Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Castell M, Franch A. Cocoa diet diminishes the anti-collagen humoral response in collagen-induced arthritis in rats.

Publicado en *J Transl Med* 2010, 8: P25.

Resumen

Objetivo: Determinar el efecto de una dieta enriquecida con cacao sobre la artritis inducida por colágeno en rata.

Material y Métodos: Ratas LOU hembras recibieron inicialmente una dieta enriquecida con un 10% de cacao, durante las 2 semanas previas a la inducción de la artritis y durante el periodo de latencia de la patología (2 semanas tras la inducción). Posteriormente, tras 2 semanas post-inducción y hasta el final del estudio, los animales recibieron una dieta que contenía un 5% de cacao. La artritis autoinmune se indujo mediante una inyección intradérmica de una emulsión de colágeno bovino tipo II en adyuvante incompleto de Freund. Durante todo el periodo de estudio se determinó el volumen de las extremidades posteriores por pletismometría. Semanalmente, se extrajeron muestras sanguíneas para determinar la concentración sérica de anticuerpos totales específicos y de los isotipos IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c contra colágeno tipo II por técnicas de ELISA. Al final del estudio, se cuantificó el número de células secretoras de IgM e IgG contra colágeno tipo II en ganglios linfáticos inguinales mediante ELISPOT. También se determinó la concentración sérica de citocinas con la técnica de marcaje por inmunofluorescencia mediante *beads* (ensayo *multiplex*) seguido de su análisis por citometría de flujo. Asimismo, se evaluó la proporción de diversas poblaciones linfocíticas en ganglios linfáticos inguinales por marcaje con técnicas de inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo. En macrófagos peritoneales se cuantificó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio del ensayo con diclorofluoresceína, la producción de TNF- α por ELISA y la liberación de óxido nítrico (NO) mediante la técnica de Griess.

Resultados: A pesar de que los animales alimentados con la dieta enriquecida con cacao mostraron un edema en las extremidades posteriores comparable al presentado por los animales artríticos que recibieron la dieta estándar, el consumo de cacao disminuyó la concentración sérica de anticuerpos anti-colágeno tipo II de isotipo IgG2a, IgG2b e IgG2c, así como el cociente relativo entre Th y Tc en ganglios linfáticos inguinales. Por otro lado, la ingesta de cacao redujo la producción de ROS, TNF- α y NO en macrófagos peritoneales procedentes de animales artríticos.

Conclusiones: El consumo de una dieta enriquecida con cacao no logra inhibir la inflamación articular inducida con colágeno tipo II en ratas LOU. Sin embargo, en este modelo de artritis autoinmune, la ingesta de esta dieta es capaz de modular la respuesta en anticuerpos específicos, la proporción de linfocitos Th, así como la síntesis de mediadores proinflamatorios por parte de macrófagos.

Effect of a cocoa flavonoid-enriched diet on experimental autoimmune arthritis

Sara Ramos-Romero¹, Francisco J. Pérez-Cano^{1,2}, Teresa Pérez-Berezo¹, Cristina Castellote^{1,2,3}, Angels Franch^{1,2,3} and Margarida Castell^{1,2*}

¹Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n, Edifici B, 3^a planta, 08028 Barcelona, Spain

²Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³CIBER Epidemiologia y Salud Pública, Barcelona, Spain

(Received 6 January 2011 – Revised 20 April 2011 – Accepted 17 May 2011)

Abstract

Previously we established that a cocoa-enriched diet in young rats reduces the specific antibody production and the helper T cell (Th) lymphocyte proportion in lymphoid tissues. The aim of the present study was to ascertain the modulatory ability of a cocoa flavonoid-enriched diet on collagen-induced arthritis (CIA), which is mediated by anti-collagen autoantibody response and Th lymphocyte activation. Female LOU rats were fed with a cocoa-enriched diet, beginning 2 weeks before CIA induction. The hind-paw swelling and serum cytokine and anti-collagen antibody concentrations were determined. Anti-collagen antibody-secreting cell counts and lymphocyte subset proportions were established in inguinal lymph nodes (ILN). Reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) and TNF α were determined by peritoneal macrophages. Although arthritis cocoa-fed rats showed a similar hind-paw swelling time course, as the arthritis animals fed a standard diet, the cocoa intake was able to decrease specific IgG2a, IgG2b and IgG2c titres. Moreover, cocoa intake in CIA rats reduced ROS production, TNF α and NO release from peritoneal macrophages, and decreased the Th:cytotoxic T cell ratio in ILN. In conclusion, a cocoa flavonoid-enriched diet in LOU rats with CIA produced no effect on hind-paw swelling but was able to modulate the specific antibody response and also the Th lymphocyte proportions, as well as the synthesis of pro-inflammatory mediators from peritoneal macrophages. Therefore, a cocoa-enriched diet could be a good adjuvant therapy in disorders with oxidative stress or autoimmune pathogenesis.

Key words: Collagen-induced arthritis: Specific antibody: Oxidative stress: Cocoa flavonoid: Lymphocyte subset

Rheumatoid arthritis (RA) is a symmetric, polyarticular, systemic and autoimmune inflammatory disease that affects approximately 1% of the adult population around the world. Multiple factors, including genetic, immune and environmental ones, lead to the progression of this autoimmune disease⁽¹⁾. Among the several environmental factors that contribute to the risk of this disease are smoking, pollution and infections. In contrast, *n*-3 fatty acids, vitamins D and K, and antioxidants included in the diet are protective compounds against RA⁽²⁾.

The cells bearing RA-predisposing human leucocyte antigen class II molecules present arthritogenic peptides to T helper (Th) cells, which become activated cells. These lymphocytes stimulate the production of pro-inflammatory cytokines, especially TNF α , IL-1 and IL-6, by monocytes, macrophages and fibroblasts. The synthesis of these cytokines is up-regulated by environmental factors such as smoking and pollution.

Activated Th lymphocytes in RA also stimulate B cells to produce autoantibodies. Among these autoantibodies are rheumatoid factor and those that recognise post-translationally citrullinated peptides⁽³⁾. Although their prevalence is unknown, anti-collagen type II (CII) antibodies have also been identified in serum from RA patients.⁽³⁾

Animal models of RA are useful tools for investigating the underlying mechanism of the disease and for the screening of new therapeutic approaches. Type II collagen-induced arthritis (CIA) shares immunological and pathological characteristics with human RA⁽⁴⁾. Genetically susceptible murine strains such as DBA/1, B10.Q and B10.RIII mice or DA and LOU rats are commonly chosen for this RA animal model^(4,5). CIA requires T- and B-cell response to autologous CII⁽⁶⁾. Th1 cells have been identified in lymphoid tissues following the induction with CII in mice, whereas Th1 cytokines

Abbreviations: CIA, collagen-induced arthritis; CII, collagen type II; FBS, fetal bovine serum; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; IFN γ , interferon- γ ; ILN, inguinal lymph nodes; LPS, lipopolysaccharide; mAb, monoclonal antibodies; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NO, nitric oxide; RA, rheumatoid arthritis; ROS, reactive oxygen species; SC, secreting cells; Tc, cytotoxic T cell; Th, helper T cell; Treg, regulatory Th.

*Corresponding author: M. Castell, fax +34 93 403 59 01 email margaridacastell@ub.edu

are largely secreted⁽⁷⁾. In addition, B cells from CIA animals produce a strong specific immune response against triple helical epitopes of CII⁽⁸⁾. Anti-CII autoantibodies appear to be the primary mechanism of immunopathogenesis in this experimental model. These autoantibodies bind to the joint cartilage, activate the complement cascade and mediate the inflammatory attack to the joints in the CIA model^(4,5). Thus, the synergy of humoral and cellular immune response to CII is pivotal for the pathogenesis of this model in susceptible animal strains.

The identification of common dietary substances capable of preventing or modulating the RA may have important human health implications. Flavonoids are polyphenols found in fruits, vegetables, tea, wine and cocoa and have ascribed anti-inflammatory properties. These properties are attributed to their antioxidant power as well as their interaction with enzymes implicated in signalling cascades and in the expression of pro-inflammatory genes⁽⁹⁾. Flavonoids also modulate pro-inflammatory cytokine production, arachidonic acid metabolism, NADPH oxidase activity and PPAR⁽⁹⁾. One source with a relatively high flavonoid content is cocoa, the product of *Theobroma cacao* beans⁽¹⁰⁾. *In vitro* studies have shown the anti-inflammatory properties of cocoa flavonoids in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages^(11,12). In addition, cocoa intake in rats decreases the local hind-paw swelling induced by carrageenin or bradykinin and also reduces TNF α concentration in inflammatory exudates^(13,14). In addition, an extended cocoa-enriched diet diminishes the specific antibody production in immunised rats⁽¹⁵⁾, and also reduces the Th lymphocyte proportion in the spleen and lymph nodes in young rats⁽¹⁶⁾. Owing to the fact that CIA pathogenesis requires Th cells and a specific antibody response, we can hypothesise that a cocoa-enriched diet could modulate this autoimmune model.

The aim of the present study was to assess whether a cocoa-enriched diet could reduce the anti-CII autoantibody response and also down-regulate Th activation in rat CIA, therefore modulating inflammatory response.

Materials and methods

Animals

Female LOU/CNimr0laHsd rats, aged 7–9 weeks, were obtained from Harlan (Barcelona, Spain). The rats were housed 3–4 per cage in controlled conditions of temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity (55%) and 12:12 light/dark cycle conditions, with food and water *ad libitum*. The design and the number of animals per group were obeyed as per the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona and the Catalan government.

Experimental design

Animals were randomly distributed into four different experimental groups (ten rats per group) called REF, Cocoa, CIA

and CIA-Cocoa. The REF and CIA groups were fed with a standard diet formulated following the American Institute of Nutrition (AIN) indications that provides the nutrients required for optimal rat maintenance (called AIN-93M diet)⁽¹⁷⁾. The Cocoa and CIA-Cocoa groups were fed with a diet containing cocoa, which was prepared by adding cocoa to a modified AIN-93M starch in which maize starch, soyabean oil, cellulose and casein had been partially removed. The resulting cocoa diet had the same proportion of carbohydrates, lipids, proteins and total energy as the standard diet. Cocoa was provided by Nutrexp (Barcelona, Spain) and contained 22% proteins, 16% carbohydrates, 11% lipids and 25.5% fibre, and 10.62 mg of total phenols per g (Folin-Ciocalteu). Animals were fed with a 10% cocoa diet for 14 d before CIA induction and during the latency period (14 d after induction), and thereafter with a 5% cocoa diet until the end of the study.

Induction and assessment of collagen-induced arthritis

The induction of CIA in rats was based on the method described by Brahn *et al.*⁽¹⁸⁾. Type II bovine collagen (MD Biosciences, Zurich, Switzerland) was dissolved in cold 0.05 M acetic acid (2 mg/ml) and emulsified with an equal volume of incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The CIA and CIA-Cocoa rats were injected intradermally into the lower back with 0.2 ml of this collagen emulsion. Arthritis was clinically assessed, in a blinded manner, by means of hind-paw volume measure with a water plethysmometer (7140; Ugo Basile, Comerio, Italy). Left and right hind-paw volumes were measured on day 0 (before CIA induction), on day 7 (post-induction) and afterwards every other day until day 27 (post-induction). Articular swelling was expressed as the addition of right and left hind-paw volume increase percentages with respect to their volume on day 0.

Sample collection and processing

During the present study, blood samples were collected from the saphenous vein to determine anti-CII antibody concentration in sera. On day 27 after induction, peritoneal macrophages and inguinal lymph nodes (ILN) were obtained.

Peritoneal macrophages from CIA animals were collected by injecting 40 ml ice-cold sterile PBS (pH 7.2) into the peritoneal cavity. After abdominal massages, cell suspension was aspirated, centrifuged and resuspended in cold DMEM + GlutaMAX media (Invitrogen, Paisley, UK) containing 10% fetal bovine serum (FBS; PAA, Pasching, Austria), and 100 IU/ml streptomycin–penicillin (Sigma; DMEM + G-FBS).

ILN were broken up by passing through a nylon cell strainer (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) with RPMI 1640 media (PAA) containing 10% FBS. Cells were then centrifuged and resuspended in PBS.

The number and viability of peritoneal macrophages and ILN lymphocytes were determined by acridine orange and ethidium bromide (Sigma) staining followed by fluorescence light microscopical analysis.

162 *Quantification of serum anti-collagen type II antibodies*
163 *by ELISA*

164 The concentration of serum total, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b and
165 IgG2c anti-CII antibodies was determined by ELISA. Polystyrene
166 microELISA plates (Nunc Maxisorp, Wiesbaden, Germany)
167 were incubated with CII solution (1.25 µg/ml CII in PBS, 4°C,
168 overnight), obtained by stirring CII overnight at 4°C in 0.1 M
169 acetic acid, and a 24 h dialysis against PBS. After CII coating,
170 serum samples were incubated (3 h, room temperature).
171 To measure total anti-CII antibody concentration, we used a
172 peroxidase-conjugated goat anti-rat Ig (BD Biosciences) as
173 detection antibody. For specific isotypes, biotin-conjugated
174 anti-rat IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG2c monoclonal
175 antibodies (mAb; BD Biosciences) were applied, followed by
176 extravidin-peroxidase (Sigma) incubation. Lastly, an *o*-phenylene-
177 diamine (Sigma) solution with H₂O₂ (0.04%) was added.
178 Absorbance was measured at 492 nm after stopping reaction
179 (3 M H₂SO₄). Since standards were not available, several
180 dilutions of pooled sera from the CIA animals were added to
181 each plate. Taking into account the required dilution of
182 samples, this pool was arbitrarily assigned as 40 000 U/ml
183 total; 32 000 U/ml IgG2a; 2000 U/ml IgG1 and IgG2b; 500 U/ml
184 IgG2c; and 250 U/ml IgM anti-CII antibodies.

185 *Quantification of anti-collagen type II antibody-secreting*
186 *cells by ELISPOT*

187 Anti-CII IgM- and IgG-secreting cells (SC) from ILN were enumer-
188 ated by the ELISPOT technique, as described by Pérez-Berezo
189 *et al.*⁽¹⁵⁾, with some modifications. A 96-well hydrophobic PVDF
190 plate (Multiscreen, catalogue no. MAIPS4510; Millipore,
191 Eschborn, Germany) was pre-wet with 35% ethanol, washed
192 with PBS and coated with CII solution (20 µg/ml, overnight at
193 4°C). ILN lymphocytes (20–10–5–2.5 × 10⁴ cells per well)
194 were incubated for 24 h. Biotin-conjugated goat anti-rat IgM
195 or IgG antibodies were added followed by extravidin-peroxidase
196 conjugate. Spots were visualised by the addition of 3-amino-
197 9-ethylcarbazole plus H₂O₂, counted automatically by the
198 computer-assisted ELISPOT image analysis (ELISPOT Reader
199 System; AID, Strassberg, Germany) and expressed as number of
200 anti-CII antibody-SC per 10⁶ cells.

201 *Inguinal lymph nodes lymphocyte subsets by*
202 *immunofluorescence staining and flow cytometry*

203 ILN cell phenotype was determined by simple, double or
204 triple staining, followed by flow cytometry analysis. Mouse
205 anti-rat mAb conjugated to fluorescein isothiocyanate, phy-
206 coerythrin, peridinin chlorophyll protein or allophycocyanin
207 used here included anti-αβ TCR (R73), anti-γδ TCR (V65),
208 anti-CD4 (OX-35), anti-CD25 (IL-2Rα chain, OX-39), anti-
209 CD8α (OX-8), anti-CD45RA (OX-33, CD45 isoform only on
210 rat B cells; BD Biosciences), and anti-Foxp3 (FJK-16a;
211 eBioscience, Frankfurt, Germany).

212 Extracellular staining was performed in 5 × 10⁵ cells by
213 saturating concentrations of fluorochrome-conjugated mAb
214 in PBS containing 1% FBS and 0.1% NaN₃ (30 min, 4°C, in

215 darkness). A negative control staining using an isotype- 215
216 matched mAb was included for each sample. For intracellular 216
217 staining, 5 × 10⁵ cells previously labelled with anti-CD4- 217
218 phycoerythrin and anti-CD25-fluorescein isothiocyanate mAb 218
219 were treated with a Foxp3 Fixation/Permeabilisation Kit 219
220 (eBioscience). Then, intracellular staining with anti-Foxp3- 220
221 allophycocyanin mAb was carried out. Analysis was performed 221
222 using a Cytomics FC500-MPL cytometer (Beckman Coulter, 222
223 Miami, FL, USA). Lymphocyte subsets were defined in the 223
224 cytometer as Tαβ (TCRαβ +), Tγδ (CD8 + TCRγδ +), B 224
225 (CD45RA +), Th (CD4 + TCRαβ +), cytotoxic T cell (Tc; 225
226 TCRαβ + CD8α +), activated Th (CD4 + CD25 + Foxp3-) 226
227 and regulatory Th (Treg; CD4 + CD25 + Foxp3 +). Results 227
228 are expressed as a percentage of positive cells in the lympho- 228
229 cyte population, previously selected according to the forward 229
230 and side scatter characteristics. In some cases, results are 230
231 shown as a percentage of positive cells in a specific lymphocyte 231
232 subset (Th and Tc in T cells; activated Th and Treg in Th cells).

233 *Determination of serum cytokine concentration by*
234 *flow cytometry*

235 IL-1α, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), TNFα, inter- 235
236 feron-γ (IFNγ) and granulocyte macrophage colony-stimulating 236
237 factor (GM-CSF) were quantified in the sera at day 27 after induc- 237
238 tion. For this purpose, a rat cytokine multiplex kit (Bender 238
239 MedSystems GmbH, Vienna, Austria) was used following the 239
240 manufacturer's instructions. Analysis was performed using a 240
241 Cytomics FC500-MPL cytometer (Beckman Coulter) and the Flow- 241
242 Cytomix Pro2.2.1 program from Bender MedSystems GmbH.

243 *Reactive oxygen species production from peritoneal*
244 *macrophages by dichlorofluorescein assay*

245 Peritoneal macrophages (2.5 × 10⁴ cells per 100 µl in DMEM + G- 245
246 FBS) were plated in 96-well black plates (Corning Incorporated 246
247 Life Sciences, Lowell, MA, USA) and allowed to attach overnight. 247
248 Macrophages were washed once with warm DMEM medium 248
249 without phenol red (Sigma) and incubated with 20 µmol/l of 249
250 reduced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate probe (H₂DCF-DA; 250
251 Invitrogen) for 30 min at 37°C. Fluorescence, directly proportional 251
252 to reactive oxygen species (ROS) production, was measured every 252
253 30 min by fluorometry (excitation 538 nm, emission 485 nm) up to 253
254 2 h. For each animal, the background from corresponding cells 254
255 without H₂DCF-DA was subtracted.

256 *Quantification of TNFα and nitric oxide from peritoneal*
257 *macrophages*

258 Peritoneal macrophages (1.2 × 10⁶ cells per 1 ml in 258
259 DMEM + G-FBS) were plated in 12-well flat-bottom plates 259
260 and cultured overnight to allow macrophage adhesion. After 260
261 washing with warm sterile PBS, macrophages were stimulated 261
262 by an addition of 1 µg/ml LPS from *Escherichia coli* (O55:B5; 262
263 Sigma) or were kept non-stimulated. After 24 h, supernatants 263
264 were collected and stored at -80°C.

265 The concentration of TNFα in supernatants was determined 265
266 using a rat ELISA set (BD Biosciences) following the manufacturer's 266

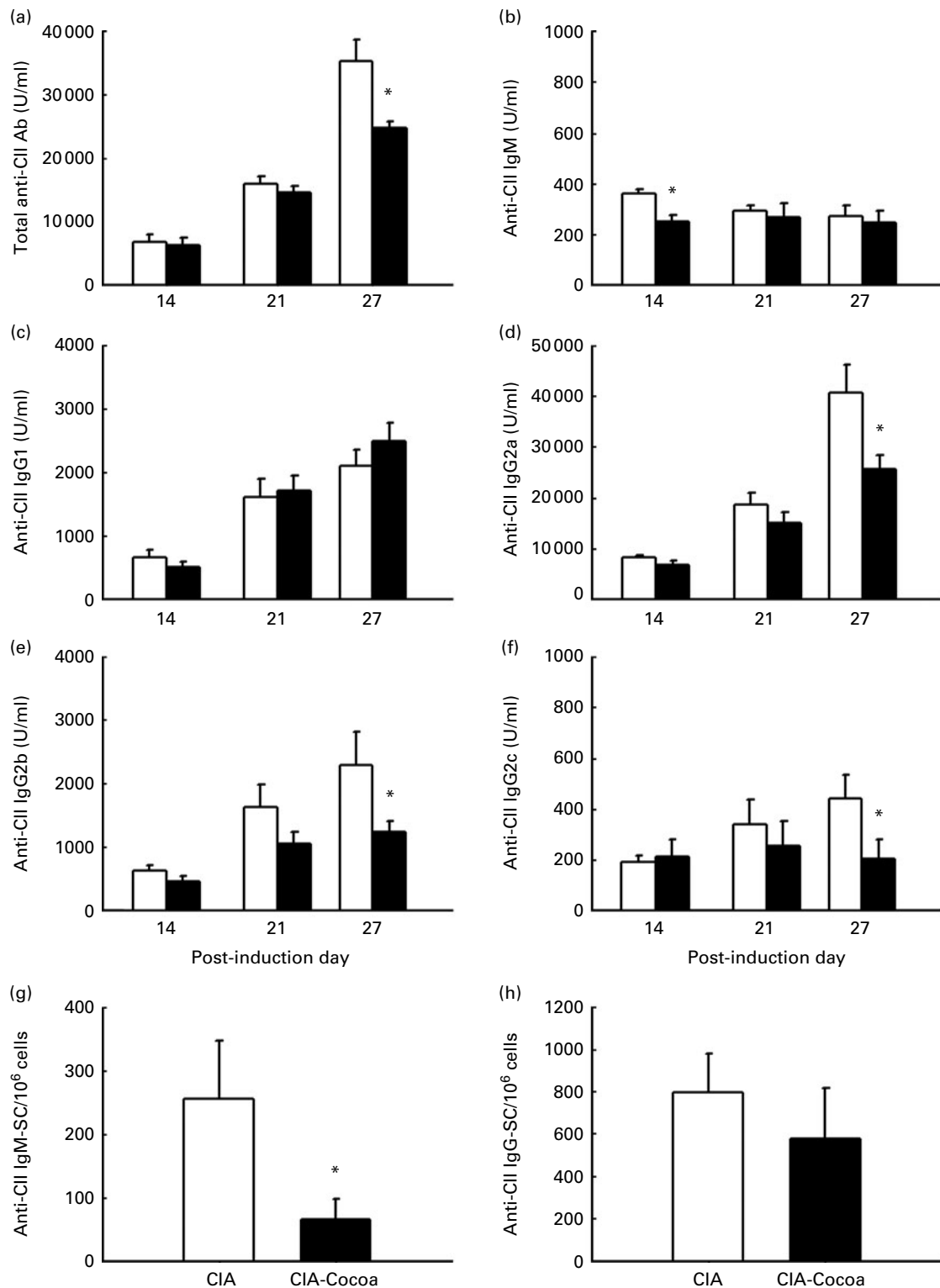


Fig. 1. Serum anti-collagen type II antibody concentration and anti-collagen type II antibody-secreting cell counts in inguinal lymph nodes (ILN). Serum anti-collagen type II (CII); (a) total antibodies, (b) IgM, (c) IgG1, (d) IgG2a, (e) IgG2b and (f) IgG2c concentrations during the study. Anti-CII (g) IgM-, and (h) IgG-SC from ILN at day 27 post-arthritis induction. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars ($n = 7-10$). * Mean values were significantly different from those of collagen-induced arthritis (CIA; □) group ($P < 0.05$; ANOVA). ■, CIA-Cocoa.

267 instructions. The stable end product of nitric oxide (NO), nitrogen
268 dioxide, was quantified by a modification of the Griess reaction.

269 Statistics

270 The software package SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)
271 was used for statistical analysis. Conventional one-way
272 ANOVA was performed, taking the experimental group as
273 the independent variable. When diet had a significant effect
274 on the dependent variable, the Bonferroni correction for mul-
275 tiple comparisons was applied. Significant differences were
276 accepted when $P < 0.05$.

277 Results

278 Effect of cocoa diet on serum anti-collagen type II 279 antibodies in collagen-induced arthritis rats

280 CIA involved the synthesis of antibodies directed against
281 CII, which increased progressively during the study period
282 (Fig. 1). Anti-CII antibodies mainly belonged to the IgG2a iso-
283 type. The cocoa diet reduced anti-CII antibody concentration
284 at day 27 after induction (Fig. 1(a); $P < 0.01$). A deeper study
285 of anti-CII antibodies revealed that the effect of the cocoa
286 diet was different according to the antibody isotype. Anti-CII
287 IgM antibodies were reduced by the cocoa diet only in
288 the early phase (Fig. 1(b); $P < 0.05$ on day 14). Anti-CII
289 IgG2a, IgG2b and IgG2c antibody titres were also diminished
290 by the cocoa diet, mainly in the late arthritic phase
291 (Fig. 1(d)–(f); $P < 0.05$ on day 27).

292 Anti-CII antibody-SC in ILN were quantified at day 27
293 after induction (Fig. 1(g) and (h)). Although the anti-CII
294 IgG-SC number was not significantly modified by cocoa diet
295 in ILN, anti-CII IgMSC counts were significantly diminished
296 (Fig. 1(g); $P < 0.05$).

297 Effect of cocoa diet on inguinal lymph nodes lymphocyte 298 subsets

299 The study of the main lymphocyte populations in ILN at day
300 27 after induction (Fig. 2(a)) did not show dramatic changes
301 but revealed that the two groups that were fed the cocoa
302 diet decreased the percentage of $T\alpha\beta$ cells ($P < 0.05$). Regarding
303 the T-cell subsets, CIA involved changes in the proportion
304 of Th and Tc cells, by reducing the Th cell proportion and
305 increasing the Tc percentage (Fig. 2(b); $P < 0.05$ when compar-
306 ing the CIA group against the REF group). The cocoa diet also
307 decreased the Th cell percentage and increased the Tc lym-
308 phocyte proportion in ILN ($P < 0.05$ when comparing Cocoa
309 group against the REF group). In CIA-Cocoa animals, changes
310 due to CIA and the cocoa diet were added and the Th:Tc ratio
311 was lower than that in the CIA group ($P < 0.05$ CIA-Cocoa
312 group against both REF and CIA groups).

313 Four weeks after CIA induction, the proportion of Treg in
314 Th cells was significantly increased in both CIA and CIA-
315 Cocoa groups (Fig. 2(c); $P < 0.05$).

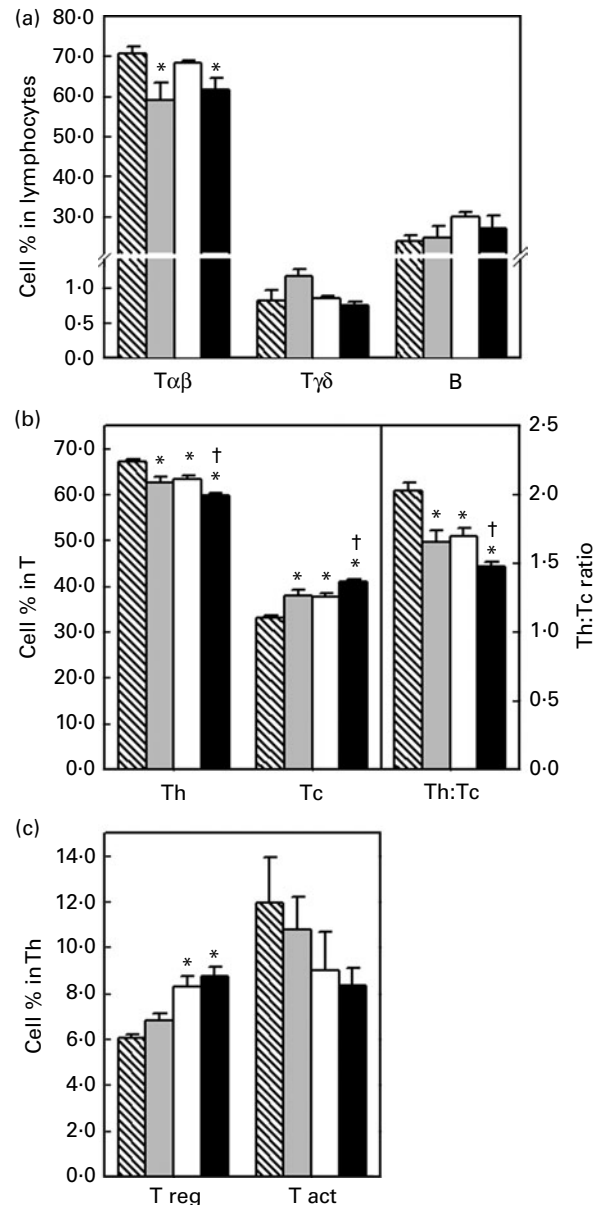


Fig. 2. Lymphocyte subset composition in rat inguinal lymph nodes. (a) $T\alpha\beta$, $T\gamma\delta$ and B-cell percentages with respect to lymphocytes. (b) Helper T cell (Th) and cytotoxic T cell (Tc) cell proportions in the T population, and Th:Tc ratio. (c) Regulatory Th (Treg) and activated Th (T act) cell percentages in the Th subset. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars ($n = 5-9$). * Mean values were significantly different from those of REF (hatched) group ($P < 0.05$; ANOVA followed by Bonferroni correction). † Mean values were significantly different from those of collagen-induced arthritis (CIA; white) group ($P < 0.05$; ANOVA followed by Bonferroni correction). □, Cocoa; ■, CIA-Cocoa.

Effect of cocoa diet on articular swelling

On day 12 after CIA induction, some animals started to show
articular swelling (Fig. 3). The number of arthritic animals and
the hind-paw volume increased progressively until day 19
after induction. Thereafter, hind-paw swelling tended to
decrease. The CIA and CIA-Cocoa groups showed the same
pattern of hind-paw inflammation.

316

317

318

319

320

321

322

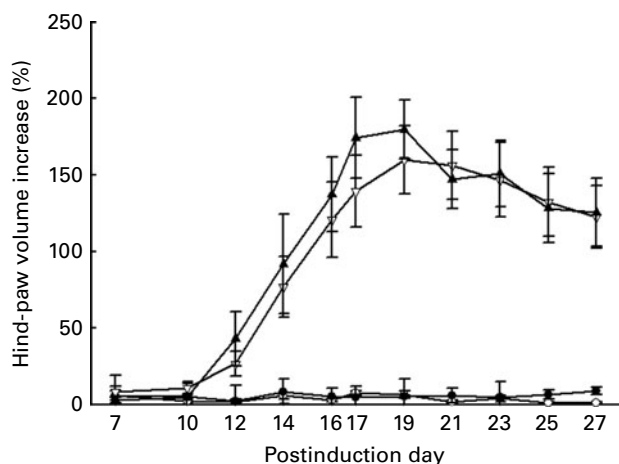


Fig. 3. Hind-paw volume increase over 4 weeks from arthritis induction (expressed as the addition of right and left hind-paw increase percentages with respect to day 0). Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 7–10; ANOVA followed by Bonferroni correction). —○—, REF; —●—, Cocoa; —▼—, collagen-induced arthritis (CIA); —▲—, CIA-Cocoa.

323 Effect of cocoa diet on serum cytokines

324 Serum IL-1 α , MCP-1, TNF α , IFN γ and GM-CSF concentrations
 325 were measured at day 27 after induction (Table 1). Among the
 326 cytokines considered, MCP-1 was the most abundant in the rat
 327 sera of the four experimental groups, and the cocoa diet in the
 328 healthy animals reduced its concentration (P <0.05). Four
 329 weeks after CIA induction, cytokine values were very low
 330 and no differences were found between the REF and CIA
 331 groups. The cocoa diet in the arthritic animals (CIA-Cocoa
 332 group) produced an increase in the serum concentrations of
 333 TNF α , IFN γ and GM-CSF compared to those of CIA and REF
 334 groups (P <0.05).

335 Effect of cocoa diet on inflammatory mediators by 336 peritoneal macrophages of collagen-induced arthritis rats

337 *Ex vivo* ROS production by peritoneal macrophages from the
 338 CIA and CIA-Cocoa groups was measured over 2 h
 339 (Fig. 4(a)). Macrophages isolated from the CIA animals syn-
 340 thesised higher amounts of ROS than those from the CIA-
 341 Cocoa group after just 30 min and this continued during the
 342 study period (P <0.05).

TNF α and NO production were quantified in macrophage 343
 supernatants were obtained 24 h after LPS stimulation and in 344
 resting conditions (Fig. 4(b) and (c)). TNF α secretion by 345
 CIA-Cocoa macrophages was lower than that in the CIA 346
 group (P <0.05 in LPS-stimulated cells; Fig. 1(b)). Similarly, 347
 NO production from LPS-stimulated macrophages in the 348
 CIA-Cocoa group was lower than that in the CIA macrophages 349
 (P <0.05 in LPS-stimulated cells; Fig. 4(c)) and was similar to 350
 that produced in resting conditions. Viability of macrophages 351
 after 24 h culture was similar in both the groups (data 352
 not shown). 353

354 Discussion

The present study shows that a cocoa-enriched diet during rat 355
 CIA was able to reduce the synthesis of specific antibodies 356
 against type II collagen, to decrease the Th lymphocyte pro- 357
 portion in ILN and to reduce the release of inflammatory 358
 mediators from peritoneal macrophages. However, these 359
 immunomodulatory effects were not enough to reduce the 360
 hind-paw swelling in arthritic animals during the study period. 361
 Anti-CII autoantibodies have been described as the corner- 362
 stone in CIA pathogenesis^(19,20), and some effective treatments 363
 of CIA in rats were accompanied by a reduction of this auto- 364
 immune response^(21–24). In the present study, we found a 365
 decrease in serum anti-CII antibody concentrations in cocoa- 366
 fed CIA animals, although this reduction did not lead to 367
 improvement in the hind-paw swelling during the study 368
 period. We should take into account the fact that the decrease 369
 in anti-CII antibody concentration was only observed at the 370
 end of the study, and it could be that this down-regulatory 371
 effect of cocoa would only be reflected on paw inflammation 372
 over a longer study. The cocoa diet reduced anti-CII antibody 373
 titres in CIA LOU rats to a lesser extent and more slowly than 374
 we expected. In previous studies, we observed that cocoa 375
 intake decreased serum IgG and IgM concentrations in healthy 376
 young Wistar rats⁽²⁵⁾, as well as the antigen-specific antibody 377
 titres after 4 weeks of immunisation in adult Wistar rats⁽¹⁵⁾. 378
 Moreover, cocoa intake reduced the serum antimycobacteria 379
 antibody concentration in adult Wistar rats after 2 weeks of 380
 immunisation⁽²⁶⁾. As LOU rats fed with cocoa did not show 381
 a decrease in anti-CII antibody response at 2 weeks of CIA 382
 induction, this could suggest that the rat strain is a determining 383
 factor for the immunomodulatory action of cocoa. On the 384

Table 1. Cytokine concentration in sera at day 27 post-arthritis induction (Mean values with their standard error)

	IL-1 α (pg/ml)		MCP-1 (pg/ml)		TNF α (pg/ml)		IFN γ (pg/ml)		GM-CSF (pg/ml)	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
REF (n 7)	6.41	2.03	93.81	5.9	1.92	0.23	1.44	0.06	8.87	0.88
Cocoa (n 6)	3.71	0.67	50.34*	9.64	1.76	0.43	1.26	0.15	7.66	1.34
CIA (n 6)	5.08	1.75	103.49	14.23	1.58	0.26	1.41	0.15	7.80	1.00
CIA-Cocoa (n 10)	11.33	5.20	104.02	14.71	3.23*†	0.48	1.87*†	0.12	14.60*†	1.88

MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; IFN γ ?, interferon- γ ; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; CIA, collagen-induced arthritis.

* Mean values were significantly different from that of REF group (P <0.05; one-way ANOVA followed by Bonferroni correction).

† Mean values were significantly different from that of CIA group (P <0.05; one-way ANOVA followed by Bonferroni correction).

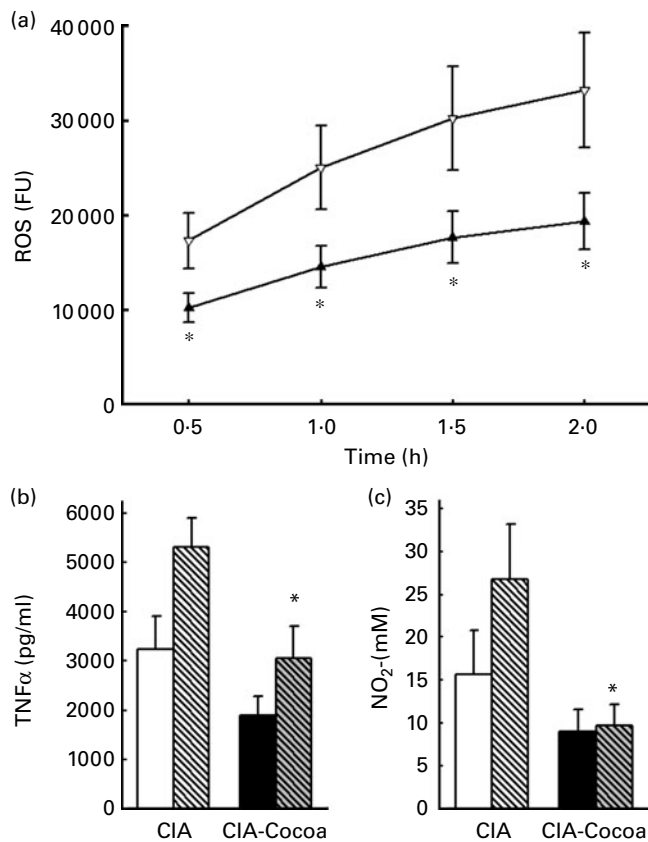


Fig. 4. Reactive oxygen species (ROS), TNF α and nitric oxide (NO) production by peritoneal macrophages of the collagen-induced arthritis (CIA; ∇) and CIA-Cocoa (\blacktriangle) groups. (a) Time course of ROS production expressed in fluorescence units (FU) determined by dichlorofluorescein assay. (b) TNF α concentration in cell culture supernatants determined by ELISA in lipopolysaccharide (LPS; \square)-stimulated and non-stimulated (NS; \square) macrophages. (c) NO cell production, quantified as nitrogen dioxide (NO₂⁻) concentration, measured by Griess assay in LPS-stimulated and resting conditions. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 7–10). *Mean values were significantly different from those of collagen-induced arthritis (CIA) group (P < 0.05; ANOVA).

385 other hand, it is interesting to consider the differential cocoa
 386 influence on anti-CII antibody isotypes. The present study
 387 found that in the CIA rats, anti-CII IgG2a were the most abun-
 388 dant in sera, which concurs with other studies^(27–29). Cocoa
 389 intake produced an early decrease in anti-CII IgM values
 390 and, at a later stage, a reduction in the specific anti-CII
 391 IgG2a antibodies, together with a decrease in anti-CII IgG2b
 392 and IgG2c concentrations, without affecting IgG1 specific anti-
 393 bodies. Some strategies modulating CIA in rats have reported a
 394 reduction in anti-CII IgG2a and IgG2b isotypes, whereas the
 395 anti-CII IgG1 remained or increased^(22–24). While IgG2b is
 396 clearly considered to be a Th1-related antibody, the role of
 397 IgG2a antibodies in rats is controversial. Some authors^(30,31)
 398 have demonstrated IgG2a properties as Th2-related anti-
 399 bodies, but other authors^(22,24) consider that, as in mice,
 400 IgG2a is a Th1-related antibody. In any case, the down-regu-
 401 lation of anti-CII IgG2a, IgG2b and IgG2c autoantibodies,
 402 together with the maintenance of IgG1 proportion, did not
 403 improve the hind-paw swelling at the end of the present
 404 study. It is still unknown whether this effect could be

subsequently beneficial. On the other hand, we enumerated 405
 the anti-CII antibody-SC in ILN, anti-CII IgG-SC being more 406
 abundant than anti-CII IgM. Cocoa intake only decreased 407
 the number of anti-CII IgM-SC in ILN, without modifying the 408
 number of anti-CII IgG-SC. These results did not reflect 409
 the changes in serum antibody concentrations and suggest 410
 that the most abundant antibody-SC would be located in 411
 other lymphoid tissues, such as the closer regional popliteal 412
 lymph nodes and/or the bone marrow. 413

Although cocoa did not effectively prevented CIA develop- 414
 ment, it should be pointed out that the inflammatory potential 415
 of the CII immunisation was reduced in cocoa-fed CIA animals 416
 because peritoneal macrophages showed less ability to secrete 417
 inflammatory mediators, including ROS. These results are in 418
 line with our previous studies performed *in vitro*⁽¹²⁾ and 419
 with the results of TNF α and NO secretion obtained from 420
 LPS-stimulated macrophages isolated from healthy animals 421
 fed cocoa^(13,14,32). The present study results demonstrate the 422
 antioxidant and anti-inflammatory potential of cocoa in a 423
 pathological status after being intestinally absorbed. It has 424
 been reported that antioxidants reduce the activation of 425
 NF- κ B, which is involved in the production of pro-inflammatory 426
 cytokines such as TNF α ⁽³³⁾. In addition, the development of 427
 RA has been related to oxidative status induced by smoking 428
 or pollution⁽²⁾, and therefore a diet enriched with antioxi- 429
 dants, such as cocoa flavonoids, could have a role in the pre- 430
 vention of, or acting as adjuvant therapy for, RA. The amount 431
 of cocoa intake needed for such beneficial effect in human 432
 subjects can be established following the conversion of 433
 animal doses into human equivalent doses described by 434
 Reagan-Shaw *et al.*⁽³⁴⁾. According to this conversion, the 435
 10% and 5% cocoa-enriched diets would be equivalent to 436
 0.908 and 0.454 g cocoa per kg human per d respectively 437
 (54.5 and 27.25 g cocoa for a 60 kg person, respectively). On 438
 the other hand, it must be considered that cocoa intake also 439
 provides other bioactive compounds such as fibre and methyl- 440
 xanthines like theobromine⁽³⁵⁾. It has been reported that high 441
 concentrations of methylxanthines can suppress inflammation 442
 by inhibiting phosphodiesterases⁽³⁶⁾, and fibre can change the 443
 intestinal microbiota, which may influence the intestinal and 444
 systemic immune cell function⁽³⁷⁾. 445

The present study also shows the effect of CIA and cocoa 446
 intake on the lymphocyte composition of ILN. We found 447
 that in comparison with healthy animals, ILN from CIA rats 448
 contained a reduced Th:Tc ratio and an increased Treg 449
 proportion at day 27 post-arthritis induction. These results do 450
 not match with the blood increase of the CD4⁺/CD8⁺ 451
 ratio in CIA rats reported by Wang *et al.*⁽³⁸⁾. In relation to 452
 the cocoa diet, the present study found a decrease in the 453
 Th:Tc ratio similar to previous studies^(16,25). Initially, we 454
 expected that the decrease in Th population induced by a 455
 cocoa diet could control this autoimmune disease. However, 456
 although Th cells have an important role in CIA pathogen- 457
 esis⁽⁶⁾, arthritic rats fed with standard diet also underwent a 458
 reduction in Th proportion at day 27 after induction. There- 459
 fore, when considering this feature in CIA animals, it seems 460
 logical that there were no beneficial effects to the relative 461
 reduction of Th cells induced by the cocoa diet. Nevertheless, 462

further functional studies should be performed to clarify the meaning and repercussions of such a relative decrease in Th. In addition, at 4 weeks after arthritis induction, we found an increase in the proportion of Treg subset in ILN from the CIA and CIA-Cocoa rats. It has been reported that Treg cells regulate the immune responses during the arthritic process because the transference of Treg cells to CIA mice prevents or slows the disease development^(39,40). Moreover, a reduced number or defective function of Treg cells have been involved in the pathogenesis of RA⁽⁴¹⁾. In the present study, a reduced number of Treg in ILN was not found, on the contrary, its proportion increased at 4 weeks of arthritis induction. This result, together with the relative decrease in hind-paw swelling at this time, suggests that the increase in Treg cells in CIA animals could reflect the onset of the recovery phase.

Other results that deserve special attention refer to serum cytokines. We found that the serum concentration of some pro-inflammatory cytokines in CIA rats, such as IL-1 α , MCP-1, TNF α , IFN γ and GM-CSF, was similar to that in healthy animals. These results are in line with other studies determining serum pro-inflammatory cytokines 1 month after induction in CIA rats^(42,43), although other studies showed an increase in such cytokines^(21,22). CIA rats fed with cocoa showed higher concentrations of TNF α , IFN γ and GM-CSF than those fed with standard diet even though they presented a similar hind-paw swelling. All these results showed that there was no correlation between the articular swelling and serum cytokine concentrations, at least in the rat CIA model and at the time of the present study. This lack of correlation could be due to the fact that, at day 27 after induction, the arthritis was not in the active phase of the inflammation. Conversely, it could be that cytokines secreted by cells closer to joint inflammation would be a better indicator of the inflammatory status. Moreover, as the cocoa diet increased some serum inflammatory cytokines, it remains to be clarified why the cocoa diet was able to reduce the inflammatory mediators released by peritoneal macrophages from CIA animals but cells elsewhere did not. The effect of the cocoa diet on the chemokine MCP-1, the most abundant of the five cytokines considered, was particularly notable. Cocoa intake decreased the concentration of MCP-1 in the sera from healthy animals and showed no differences between either group of CIA rats, in contrast to the other studied cytokines. The present study results in healthy rats concur with those reported previously *in vitro*⁽¹²⁾. MCP-1 is a chemokine released by macrophages that is involved in cell infiltration and the migration to the joint of monocytes, T and NK cells. Therefore, the decrease in MCP-1 concentration could reflect the influence of cocoa on macrophages.

Some other studies have tried to improve CIA through flavonoid intake. In the same way it has been shown here, CIA mice treated subcutaneous with the flavonoid genistein do not exhibit a reduction in hind-paw swelling, although there is a decrease of the serum anti-CII antibody concentration⁽⁴⁴⁾. On the other hand, other authors have reported the beneficial effect of isolated flavonoids or products containing flavonoids in CIA animals^(45–50). It should be pointed out, however, that

some of these studies in CIA rats and mice do not find hind-paw swelling improvement after 27 d of induction but later, between after a month of induction and up to 53 d^(46–48). Recently, Cho *et al.*⁽⁵¹⁾ demonstrated the attenuation of CIA in mice by grape seed proanthocyanidins, but they provided these antioxidants by intraperitoneal route and the improvement was evident later than 4 weeks after immunisation. All these results reassert the idea that a longer study could demonstrate clinically the beneficial effect of cocoa intake in the CIA rat model.

In conclusion, a cocoa diet in CIA rats involves a decrease in the main isotypes of specific anti-CII antibodies at 4 weeks of arthritis induction. Moreover, cocoa intake modulates the inflammatory response of macrophages, and decreases the Th:TC ratio in ILN. However, these effects were not enough to reduce hind-paw swelling at the end of the study. Further studies could focus on the effect of a cocoa diet over a longer period of CIA and ascertain lymphocyte and macrophage cell function closer to inflamed joints. Anyway, a cocoa-enriched diet could be a good adjuvant therapy in disorders with oxidative stress or autoimmune pathogenesis.

Acknowledgements

The present study was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (AGL2005-002823) and by the Generalitat de Catalunya, Spain (SGR 2005-0083). S. R.-R. is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (BES-2006-13640). T. P.-B. is the recipient of a fellowship from the University of Barcelona. The authors declare they have no competing interests. S. R.-R. carried out the study, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. F. J. P.-C., T. P.-B. and C. C. collaborated during the *in vivo* part and in the discussion of the results. M. C. and A. F. designed, supervised and coordinated the study. All the authors read and approved the final manuscript. The authors thank the ‘Serveis Científic-Tècnics’ of the University of Barcelona, especially Dr J. Comas, for expert assistance in flow cytometry, and Dr. Mónica Sauleda and Marta Bes (Banc de Sang, Hospital Vall d’Hebron, Barcelona) for the loan of the ELISPOT reader and their technical assistance. Moreover the authors thank E. Sanchez-Galan and D. Mis-Castell for their help in ELISA method.

References

- Firestein GS (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356–361.
- Tobón GJ, Youinou P & Saraux A (2010) The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* **35**, 10–14.
- Duskin A & Eisenberg RA (2010) The role of antibodies in inflammatory arthritis. *Immunol Rev* **233**, 112–125.
- Kannan K, Ortmann RA & Kimpel D (2005) Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* **12**, 167–181.
- Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, *et al.* (2001) Arthritis induced in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* **184**, 184–202.

- 576 6. Brand DD, Kang AH & Rosloniec EF (2003) Immunopatho-
577 genesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol*
578 **25**, 3–18.
- 579 7. Okamoto Y, Gotoh Y, Tokui H, *et al.* (2000) Characterization
580 of the cytokine network at a single cell level in mice with
581 collagen-induced arthritis using a dual color ELISPOT
582 assay. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 55–61.
- 583 8. Wernhoff P, Unger C, Bajtner E, *et al.* (2001) Identification of
584 conformation-dependent epitopes and V gene selection in
585 the B cell response to type II collagen in the DA rat. *Int*
586 *Immunol* **13**, 909–919.
- 587 9. Gomes A, Fernandes E, Lima JL, *et al.* (2008) Molecular
588 mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavo-
589 noids. *Curr Med Chem* **15**, 1586–1605.
- 590 10. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, *et al.* (2003) Cocoa has more phe-
591 nolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than
592 teas and red wine. *J Agric Food Chem* **51**, 7292–7295.
- 593 11. Ono K, Takahashi T, Kamei M, *et al.* (2003) Effects of an aqu-
594 eous extract of cocoa on nitric oxide production of macro-
595 phages activated by lipopolysaccharide and interferon-
596 gamma. *Nutrition* **19**, 681–685.
- 597 12. Ramiro E, Franch A, Castellote C, *et al.* (2005) Flavonoids
598 from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory
599 mediators. *J Agric Food Chem* **53**, 8506–8511.
- 600 13. Ramos-Romero S, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, *et al.* (2008)
601 Anti-inflammatory effects of cocoa in rat carrageenin-
602 induced paw oedema. *Proc Nutr Soc* **67**, E65.
- 603 14. Castell M, Franch A, Ramos-Romero S, *et al.* (2009) Effect of
604 a diet rich in cocoa flavonoids on experimental acute inflam-
605 mation. In *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and*
606 *Dietary Sources*, 1st ed., pp. 213–229 [RB Keller, editor].
607 Hauppauge: Nova Science Publishers, Inc.
- 608 15. Pérez-Berezo T, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, *et al.* (2009)
609 Influence of a cocoa-enriched diet on specific immune
610 response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol Nutr Food Res*
611 **53**, 389–397.
- 612 16. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, *et al.* (2008)
613 Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-
614 enriched diet. *J Nutr Biochem* **19**, 555–565.
- 615 17. Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified
616 diets for laboratory rodents: final report of the American
617 Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformu-
618 lation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939–1951.
- 619 18. Brahn E, Peacock DJ & Banquerigo ML (1991) Suppression
620 of collagen-induced arthritis by combination cyclosporin A
621 and methotrexate therapy. *Arthritis Rheum* **34**, 1282–1288.
- 622 19. Michaelsson E, Andersson M, Engstrom A, *et al.* (1992)
623 Identification of an immunodominant type-II collagen pep-
624 tide recognized by T cells in H-2(q) mice: self tolerance at
625 the level of determinant selection. *Eur J Immunol* **22**,
626 1819–1825.
- 627 20. Bajtner E, Nandakumar KS, Engström A, *et al.* (2005) Chronic
628 development of collagen-induced arthritis is associated with
629 arthritogenic antibodies against specific epitopes on type II
630 collagen. *Arthritis Res Ther* **7**, R1148–R1157.
- 631 21. Liu M, Wang X, Yin C, *et al.* (2007) Targeting TNF- α with a
632 tetraivalent mini-antibody TNF-TeAb. *Biochem J* **406**,
633 237–246.
- 634 22. Cortés M, Canellada A, Miranda S, *et al.* (2008) Placental
635 secreted factors: their role in the regulation of anti-CII anti-
636 bodies and amelioration of collagen induced arthritis in
637 rats. *Immunol Lett* **119**, 42–48.
- 638 23. Du F, Lü LJ, Fu Q, *et al.* (2008) T-614, a novel immunomod-
639 ulator, attenuates joint inflammation and articular damage in
640 collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* **10**, R136.
24. Zhao J, Li R, He J, *et al.* (2008) Mucosal administration of an 641
altered CII263-272 peptide inhibits collagen-induced arthritis 642
by suppression of Th1/Th17 cells and expansion of regulat- 643
ory T cells. *Rheumatol Int* **29**, 9–16. 644
25. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, *et al.* 645
(2007) Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa- 646
enriched diet. *Clin Exp Immunol* **149**, 535–542. 647
26. Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Suárez-Germà C, *et al.* 648
(2008) Influencia de una dieta rica en flavonoides sobre las 649
poblaciones linfocíticas durante un proceso artrítico exper- 650
imental. *Immunología* **27**, S58–S59. 651
27. Brand DD, Marion TN, Myers LK, *et al.* (1996) Autoanti- 652
bodies to murine type II collagen in collagen-induced arthrit- 653
is: a comparison of susceptible and nonsusceptible strains. 654
J Immunol **157**, 5178–5184. 655
28. Stasiuk LM, Abehsira-Amar O & Fournier C (1996) Collagen- 656
induced arthritis in DBA/1 mice: cytokine gene activation 657
following immunization with type II collagen. *Cell Immunol* 658
173, 269–275. 659
29. Ye XJ, Tang B, Ma Z, *et al.* (2004) The roles of interleukin-18 660
in collagen-induced arthritis in the BB rat. *Clin Exp Immunol* 661
136, 440–447. 662
30. Saoudi A, Bernard I, Hoedemaekers A, *et al.* (1999) Exper- 663
imental autoimmune myasthenia gravis may occur in the 664
context of a polarized Th1- or Th2-type immune response 665
in rats. *J Immunol* **162**, 7189–7197. 666
31. Bridle BW, Wilkie BN, Jevnikar AM, *et al.* (2009) Steering 667
orally induced deviation of xenogeneic immunity with 668
exogenous cytokines in rats fed porcine proteins. *Transpl* 669
Immunol **22**, 32–37. 670
32. Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Pérez-Berezo T, *et al.* 671
(2010) A seven-day high cocoa diet decreases oxidant and 672
inflammatory properties of peritoneal macrophages in rats. 673
Proc Nutr Soc **69**, E253. 674
33. Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, *et al.* (1990) Kappa 675
B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated 676
transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene 677
in primary macrophages. *J Exp Med* **171**, 35–47. 678
34. Reagan-Shaw S, Nihal M & Ahmad N (2008) Dose translation 679
from animal to human studies revisited. *FASEB J* **22**, 680
659–661. 681
35. Borchers AT, Keen CL, Hannum SM, *et al.* (2000) Cocoa and 682
chocolate: composition, bioavailability, and health impli- 683
cations. *J Med Food* **3**, 77–105. 684
36. Haskó G & Cronstein B (2011) Methylxanthines and inflam- 685
matory cells. *Handb Exp Pharmacol* **200**, 457–468. 686
37. Schley PD & Field CJ (2002) The immune-enhancing effects 687
of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr* **87**, S221–S230. 688
38. Wang F, Tan W, Guo D, *et al.* (2007) Reduction of CD4 689
positive T cells and improvement of pathological changes 690
of collagen-induced arthritis by FTY720. *Eur J Pharmacol* 691
573, 230–240. 692
39. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, *et al.* (2005) 693
Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive 694
transfer of CD25 + regulatory T cells. *Arthritis Rheum* **52**, 695
2212–2221. 696
40. Kelchtermans H, Geboes L, Mitera T, *et al.* (2009) Activated 697
CD4 + CD25 + regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis 698
and collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* **68**, 744–750. 699
41. Sarkar S & Fox DA (2007) Regulatory T cell defects in rheu- 700
matoid arthritis. *Arthritis Rheum* **56**, 710–713. 701
42. Stolina M, Bolon B, Dwyer D, *et al.* (2008) The evolving 702
systemic and local biomarker milieu at different stages 703
of disease progression in rat collagen-induced arthritis. 704
Biomarkers **13**, 692–712. 705

- 706 43. Charles-Schoeman C, Banquerigo ML, Hama S, *et al.* (2008)
 707 Treatment with an apolipoprotein A-1 mimetic peptide in
 708 combination with pravastatin inhibits collagen-induced
 709 arthritis. *Clin Immunol* **127**, 234–244.
- 710 44. Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, *et al.* (2003) Genis-
 711 tein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res* **52**,
 712 341–346.
- 713 45. Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, *et al.* (1999) Prevention
 714 of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic frac-
 715 tion from green tea. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **96**,
 716 4524–4529.
- 717 46. Kawaguchi K, Maruyama H, Kometani T, *et al.* (2006)
 718 Suppression of collagen-induced arthritis by oral adminis-
 719 tration of the citrus flavonoid hesperidin. *Planta Med* **72**,
 720 477–479.
- 721 47. Imada K, Lin N, Liu C, *et al.* (2008) Nobiletin, a citrus
 722 polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and
 production of aggrecanases-1 and -2 in collagen-induced
 arthritic mice. *Biochem Biophys Res Commun* **373**, 181–185.
48. Kometani T, Fukuda T, Kakuma T, *et al.* (2008) Effects of
 α -glucosylhesperidin, a bioactive food material, on collagen-
 induced arthritis in mice and rheumatoid arthritis in humans.
Immunopharmacol Immunotoxicol **30**, 117–134.
49. Miyake M, Ide K, Sasaki K, *et al.* (2008) Oral administration
 of highly oligomeric procyanidins of Jatoba reduces the
 severity of collagen-induced arthritis. *Biosci Biotechnol
 Biochem* **72**, 1781–1788.
50. Dang DTN, Eriste E, Liepinsh E, *et al.* (2009) A novel anti-
 inflammatory compound, artonkin-4'-O-glucoside, from the
 leaves of *Artocarpus tonkinensis* suppresses experimentally
 induced arthritis. *Scand J Immunol* **69**, 110–118.
51. Cho ML, Heo YJ, Park MK, *et al.* (2009) Grape seed
 proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-
 induced arthritis. *Immunol Lett* **124**, 102–110.

Discusión

La respuesta inflamatoria es una reacción fisiológica provocada por un estímulo nocivo para restituir la homeostasis del organismo. A pesar de ser una respuesta protectora, una reacción inflamatoria excesiva puede llegar a ser patológica. Por otro lado, el cacao es una fuente de compuestos polifenólicos, principalmente de tipo flavonoide, a los que se les atribuye una elevada capacidad antioxidante (revisado por Katz y col., 2011). Numerosos estudios *in vitro* han demostrado los efectos beneficiosos del cacao sobre el sistema inmunitario (revisado por Ramiro-Puig y Castell, 2009). Estudios previos, realizados en nuestro laboratorio en animales sanos, han puesto de manifiesto que el consumo de cacao potencia la capacidad antioxidante del timo (Ramiro-Puig y col., 2007b), reduce la producción de TNF- α por parte de macrófagos estimulados *ex vivo* (Ramiro-Puig y col., 2007a), disminuye la proporción de linfocitos Th en ganglios linfáticos y bazo, y reduce la concentración sérica de inmunoglobulinas (Ramiro-Puig y col., 2008). En base a estas premisas, la hipótesis de partida ha sido que la ingesta de cacao puede llegar a modular la respuesta inflamatoria *in vivo*. En este sentido, el presente trabajo ha permitido establecer los efectos de una dieta rica en cacao sobre la respuesta inflamatoria aguda y crónica a nivel preclínico, aspecto poco considerado hasta la fecha.

Inicialmente el estudio se centró en un modelo experimental de inflamación inducido por carragenina en rata, el cual se caracteriza por una respuesta inflamatoria local aguda y edema articular progresivo (**Artículo 1**). Tras la obtención de resultados que demostraban la eficacia clínica de la ingesta de cacao en este modelo experimental, los estudios se enfocaron en determinar el posible mecanismo de acción de los metabolitos del cacao sobre la respuesta inflamatoria aguda. Para ello, se emplearon otros modelos de inflamación local inducida exógenamente por algunos de los mediadores implicados en la respuesta inflamatoria aguda, como histamina, serotonina, bradicinina y prostaglandina E₂ (**Artículo 1**). Tras la evaluación de los efectos del cacao sobre la respuesta inflamatoria local aguda, se procedió al estudio de la influencia de la ingesta de cacao sobre la respuesta inflamatoria crónica y sistémica, para lo que se seleccionaron dos modelos experimentales inducidos en rata. En una primera fase, el estudio se centró en el posible efecto de la ingesta de cacao sobre la artritis adyuvante (**Artículo 2 y 3**) como modelo de respuesta inflamatoria sistémica crónica moderada-grave y, en una segunda fase, sobre la artritis inducida por colágeno (**Artículo 4**), como respuesta inflamatoria crónica con características de patología autoinmune. Para la realización de estos estudios se han utilizado mayoritariamente ratas de la cepa Wistar, a excepción del modelo de artritis inducida por colágeno, el cual se indujo en ratas consanguíneas de la cepa LOU/CNimr0laHsd que exhiben una mayor susceptibilidad a desarrollar este tipo de patología. En todos los estudios realizados se ha empleado cacao de tipo *Natural Forastero* con una concentración total de polifenoles comprendida entre 10,62 y 21,2 mg/g.

Un primer aspecto interesante a comentar del presente estudio es el referente a los resultados relativos a la influencia del cacao sobre la evolución clínica de la inflamación articular asociada a los diferentes modelos experimentales utilizados. Mientras que la ingesta correspondiente a un 6% de cacao (administración p.o. de 4,8 g cacao/kg rata/día a animales que consumen 80 g pienso/kg rata/día), de forma preventiva durante una semana, exhibió un claro efecto inhibitorio de la inflamación aguda inducida por carragenina (**Artículo 1**), el consumo durante 6 semanas de dietas enriquecidas con 5 y 10% de cacao no logró prevenir ni revertir la inflamación articular en ninguno de los dos modelos de artritis estudiados (**Artículos 2 y 4**). Esta diferencia podría estribar en el nivel de gravedad de la respuesta inflamatoria alcanzada en los modelos de artritis estudiados, en el protocolo de administración oral del cacao y en importancia relativa de la respuesta de los diferentes efectores y mediadores inflamatorios implicados en los distintos tipos de respuesta inflamatoria (aguda, crónica y crónica con características de patología autoinmune).

Los macrófagos son células cruciales durante la respuesta inflamatoria y entre sus diversas funciones destacan la presentación de antígenos, la fagocitosis y la inmunomodulación (Dale y col., 2008). Los macrófagos tienen una función fundamental en la respuesta inflamatoria aguda a nivel local. En este sentido, en el presente estudio se ha demostrado que el consumo de cacao disminuye la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α por parte de macrófagos, lo cual comporta una reducción del edema desarrollado en el modelo de inflamación aguda inducido por carragenina (**Artículo 1**). Sin embargo, a pesar de que los macrófagos procedentes de animales artríticos que consumen cacao también presentan una menor secreción de TNF- α (**Artículo 4**) y, por consiguiente, exhiben una respuesta proinflamatoria disminuida, en el suero de estos mismos animales se detectan concentraciones superiores de citocinas proinflamatorias. En base a estos resultados se podría especular que, con objeto de combatir la patología crónica, otras células, como linfocitos T, presentan una mayor actividad e incrementan su producción de citocinas proinflamatorias a nivel sistémico. Por otra parte, la presencia de concentraciones elevadas de TNF- α junto con una inhibición tardía (tras cuatro semanas de dieta enriquecida con cacao) de la síntesis de autoanticuerpos implicados en la artritis inducida por colágeno podría relacionarse con la ausencia de mejoría clínica en estos animales artríticos que consumieron la dieta rica en cacao (**Artículo 4**).

Los macrófagos son capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) que combaten al agente inflamatorio pero que, en exceso, pueden ser lesivos para los tejidos circundantes (Son y col., 2008). En el presente estudio, el consumo de una dieta con un 5% de cacao reduce la producción de NO liberado por macrófagos, estimulados con LPS, procedentes tanto de animales sanos (**Artículo 1**) como de animales artríticos (**Artículo 4**). A nivel de vías de señalización intracelular, la estimulación de macrófagos mediante LPS induce la translocación de NF- κ B desde el citoplasma hasta el núcleo, donde interactúa con elementos κ B en la zona 5' de la región que codifica para iNOS, desencadenando la transcripción de dicho enzima (Xie y col., 1994). La producción

de iNOS también se induce mediante citocinas como IFN γ , TNF- α e IL-1 (Gautam y col., 2007), citocinas proinflamatorias productos de la misma vía de señalización, NF- κ B (Kawai y Akira, 2010). En este estudio se ha podido comprobar que la dieta enriquecida con cacao durante 7 días o más conlleva una menor secreción de TNF- α por parte de macrófagos estimulados con LPS, procedentes tanto de animales sanos como artríticos (**Artículo 1 y 4**). Estudios previos han demostrado que flavonoides del cacao, como epicatequina, catequina, quercetina y procianidinas, podrían ser los responsables de inhibir la activación de NF- κ B en diferentes líneas celulares (Ramiro-Puig y col., 2009; revisado por Pérez-Cano y col., 2010), por lo que el efecto del cacao sobre la producción de NO y de citocinas proinflamatorias por macrófagos podría basarse en la inhibición de esta vía de señalización por parte de los flavonoides del cacao.

Por otra parte, los macrófagos procedentes de animales que han consumido cacao a una dosis adecuada (~5%) presentan también cierta tendencia a reducir la síntesis de ROS en condiciones fisiológicas (**Artículo 1**) y en condiciones patológicas (modelos experimentales de artritis) (**Artículo 3 y 4**). Así, la disminución de la producción de ROS en macrófagos procedentes de animales artríticos que consumieron 5% de cacao es similar a la de los macrófagos de animales que fueron tratados vía oral con el flavonoide quercetina (**Artículo 3**). La reducción de la producción de ROS por parte de macrófagos de animales artríticos alimentados con una dieta de cacao puede relacionarse con el efecto que ejerce esta tipo de dieta sobre la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (**Artículo 3**). Concretamente, el consumo de un 5% de cacao en la dieta normaliza la actividad de estos enzimas antioxidantes procedentes de animales artríticos llegando a ser comparable a la que presentan células procedentes de animales sanos. Sin embargo, ese efecto sobre la actividad antioxidante enzimática no se observa en animales tratados con quercetina, lo que puede indicar que es un efecto específico de otros flavonoides presentes en el cacao (como epicatequina y catequina) o de otras sustancias bioactivas presentes en este alimento como las metilxantinas (Azam y col., 2003). Dado que la respuesta inflamatoria está íntimamente ligada al estrés oxidativo (Reuter y col., 2010), el hecho que una dieta rica en cacao pueda ser beneficiosa sobre el equilibrio redox en estados patológicos puede tener una gran trascendencia.

Es necesario también destacar la importancia de la cantidad de cacao ingerida, ya que parece ser crucial para la obtención de efectos beneficiosos sobre la respuesta inflamatoria. Se ha observado que una ingesta correspondiente al 3% de cacao (2,4 g de cacao/kg de animal/día p.o. en animales que consumen 80 g pienso/kg rata/día) no modifica el estrés oxidativo, ni la evolución clínica en el modelo de inflamación aguda inducida por carragenina; sin embargo, disminuye significativamente la respuesta inflamatoria aguda inducida por bradicinina (**Artículo 1**). Este efecto podría atribuirse, al menos parcialmente, a que los flavonoides son capaces de unirse directamente a la bradicinina (Richard y col., 2006), antagonizando así su actividad. Curiosamente, no se observa el mismo efecto en animales que ingieren doble concentración de cacao (6%), lo que podría atribuirse a la

adición del efecto vasodilatador de la bradicinina y del cacao. Así, en el organismo, a partir de la ingesta de determinadas concentraciones de cacao podría predominar el efecto vasodilatador de ambos compuestos frente al efecto antagónico de los flavonoides del cacao sobre a la bradicinina. Por otro lado, en el **Artículo 1** también se observa que la ingesta correspondiente a un 6% de cacao (administración de 4,8 g de cacao/ kg de animal/ día a animales que consumen 80 g pienso/ kg de animal/ día) disminuye tanto el edema articular inducido por carragenina como el NO liberado por macrófagos estimulados. Sin embargo, una dieta enriquecida con un 5% de cacao reduce el estrés oxidativo de macrófagos y esplenocitos procedentes de animales con artritis adyuvante (**Artículo 3**), pero sólo se observa una tendencia a disminuir el edema articular tras cuatro semanas de la inducción de la patología (**Artículo 2**). Paradójicamente, el consumo de una dieta con un 10% de cacao no modifica el estrés oxidativo de macrófagos y esplenocitos, ni la inflamación articular en el modelo de artritis adyuvante. En este sentido, se ha descrito que una dosis excesiva de flavonoides puede realizar una función prooxidante en el organismo que los consume (Procházková y col., 2011). Por tanto, entre las concentraciones de cacao empleadas en este estudio parece que el consumo de un 5% de cacao sería, globalmente, el más beneficioso. La ingesta de un 5% de cacao en rata sería equivalente a un consumo de 0,454 g de cacao en el caso de una persona de 60 kg de peso, según la conversión descrita por Reagan-Shaw y col. (2008). Sin embargo, esta comparación tiene una aplicabilidad limitada, ya que los seres humanos siguen dietas muy variables y la microflora intestinal varía entre especies y en función de la dieta (Gibson y Roberfroid, 1995), por lo que este dato sólo podría emplearse como punto de partida para futuros estudios clínicos.

En relación al efecto del cacao sobre las poblaciones linfocíticas, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio en ratas jóvenes sanas, se observó una reducción en la proporción de linfocitos Th en bazo y ganglios linfáticos de animales que consumieron una dieta enriquecida con un 10% de cacao (Ramiro-Puig y col., 2007a; Ramiro-Puig y col., 2008). En el presente estudio se ha demostrado que el consumo prolongado de dietas enriquecidas con cacao reduce la proporción de linfocitos Th en sangre y ganglios linfáticos inguinales de ratas con artritis adyuvante (**Artículo 2**) y con artritis inducida por colágeno (**Artículo 4**). Sin embargo, la reducción de la proporción de linfocitos Th no es suficiente para evitar su implicación en la patogénesis de ambos modelos experimentales de artritis. Estos resultados podrían explicarse en base a los datos relativos a las concentraciones de IFN γ , citocina proinflamatoria secretada principalmente por linfocitos Th activados, en ambas series experimentales. Concretamente, los resultados publicados en el **Artículo 2** ponen de manifiesto que la liberación de IFN γ , por parte de esplenocitos estimulados específicamente, es similar en los tres grupos con artritis adyuvante, con independencia del consumo de una dieta rica en cacao. En cambio, en el **Artículo 4** se observa que la concentración sérica de IFN γ es superior en aquellos animales con artritis inducida por colágeno que consumen una dieta enriquecida con cacao, respecto a los que siguen una dieta estándar. Estos resultados indican que, a pesar de que el cacao reduce de la proporción de linfocitos Th, la producción de la citocina proinflamatoria IFN γ se

mantiene o incluso aumenta. Ello sugiere que o bien los linfocitos Th son más activos para la secreción de esta citocina, o bien IFN γ proviene de otros tipos celulares, como los linfocitos NK (Sherwood y col., 2004). Además, la producción de IFN γ en animales con artritis adyuvante es superior a la de animales sanos (**Artículo 2**), mientras que en ratas con artritis inducida por colágeno es similar (**Artículo 4**). La producción de IFN γ es un factor crítico en la defensa del organismo contra micobacterias (Huang y col., 1993; Flynn y col., 1993) y puede estar implicado en la eliminación de los restos de este microorganismo (Matthys y col., 2000), lo que podría explicar la exacerbada producción de IFN γ por parte de células previamente sensibilizadas a este microorganismo y estimuladas *ex vivo* con micobacteria.

El efecto de las dietas enriquecidas con cacao sobre la población de células T reg también es de particular interés ya que se ha propuesto su implicación en la regulación de la respuesta inmunitaria durante el proceso artrítico (Morgan y col., 2005; Kelchtermans y col., 2009) y, además, se ha descrito que pacientes con artritis reumatoide presentan células T reg con funcionalidad anormal (Sakar y Fox, 2007). En el presente estudio, la inducción de artritis adyuvante comporta una reducción en la proporción sanguínea de linfocitos T reg y el consumo de una dieta con un 10% de cacao evita esta alteración, siendo su proporción similar a la presente en animales sanos. Sin embargo, este efecto no se observa cuando la dieta contiene únicamente un 5% de cacao (**Artículo 2**). La proporción de linfocitos T reg en animales que ingirieron la dieta enriquecida con un 10% de cacao, similar a la de las ratas sanas, podría relacionarse con un incremento en la síntesis y liberación de IL-2, la cual favorece la producción de los linfocitos T reg (Malek y col., 2008). Por otro lado, no se observan cambios significativos en la proporción de linfocitos T reg asociados a la artritis adyuvante en ganglios linfáticos inguinales tras un mes de su inducción (**Artículo 2**). Sin embargo, la artritis inducida por colágeno provoca un aumento en la proporción de T reg al final del estudio (**Artículo 4**), lo cual podría ser indicativo del inicio de la fase de recuperación de esta patología inflamatoria ya que se ha descrito que la transferencia de T reg activadas en ratones con artritis inducida por colágeno previene el desarrollo de la enfermedad y ralentiza su progreso (Kelchtermans y col., 2009; Morgan y col., 2005). No obstante, tras cuatro semanas de la inducción, el consumo de las dietas enriquecidas en cacao no modifica las proporciones de T reg en ganglios linfáticos inguinales de animales artríticos, a pesar de la presencia de metabolitos de epicatequina (uno de los flavonoides mayoritarios del cacao) en esos mismos órganos tras tres semanas de consumo de una dieta enriquecida con un 10% de cacao (Urpí-Sardá y col., 2010).

Las enfermedades autoinmunes se originan cuando tejidos específicos se convierten en dianas de linfocitos T autoreactivos y/o de autoanticuerpos. La formación de inmunocomplejos puede inducir la activación del sistema del complemento, lo que conduce a una mayor respuesta inflamatoria. La artritis reumatoide se caracteriza por la producción de autoanticuerpos séricos de diversos tipos que, a pesar de poseer un papel en parte desconocido dentro de la patología artrítica, son herramientas útiles para el

diagnóstico clínico (Conrad y col., 2010). El consumo de cacao disminuye de manera dosis-dependiente la concentración de anticuerpos séricos dirigidos contra la micobacteria inductora de la patología, desde la segunda semana post-inducción de la artritis adyuvante (**Artículo 2**). A pesar de que esta patología está adscrita principalmente a una respuesta celular, los anticuerpos contra micobacteria parecen tener cierto papel durante la fase tardía de este modelo de artritis (Franch y col., 1994). La drástica reducción en la concentración sérica de estos anticuerpos específicos, en animales con artritis adyuvante que consumieron cacao, podría relacionarse con la moderada disminución de la inflamación articular detectada al final del estudio. Sin embargo, en el modelo de artritis inducida por colágeno, la dieta enriquecida con cacao sólo disminuye la producción de autoanticuerpos anti-colágeno tipo II totales a partir de la cuarta semana tras su inducción (**Artículo 4**). Se ha descrito un papel esencial de estos autoanticuerpos en la patogénesis de la artritis inducida por colágeno (Bajtner y col., 2005), por lo que la ausencia de mejoría clínica en animales que consumen cacao durante el desarrollo de la patología podría vincularse, al menos en parte, a que la concentración de autoanticuerpos séricos es similar a la de los animales sin intervención nutricional, durante las primeras semanas tras la inducción. Una de las posibles variables que podría explicar la acción diferencial del cacao sobre los anticuerpos específicos séricos, podría ser la cepa de rata utilizada en los estudios. En este sentido, para la inducción de la artritis adyuvante se utilizaron ratas de la cepa Wistar (**Artículo 2**), mientras que la artritis inducida por colágeno se indujo en ratas de la cepa consanguínea LOU/CNimr0laHsd (**Artículo 4**). Las ratas LOU/CNimr0laHsd presentan una mayor predisposición a sintetizar inmunoglobulinas monoclonales (Bazin y col., 1974), y quizá el cacao no sea capaz de inhibir tan eficazmente la producción de anticuerpos en organismos genéticamente predispuestos a producirlos en mayor cantidad. Por otra parte, entre ambas cepas también se observa una clara diferencia en los isotipos de anticuerpos modulados por la ingesta de cacao. En el presente estudio, ratas artríticas LOU/CNimr0laHsd que siguieron la dieta con cacao presentan reducidos los anticuerpos de isotipo IgG2a, IgG2b e IgG2c, sin embargo, en estudios previos con ratas Wistar se detectó una reducción de la concentración de IgG1, IgG2a, IgG2c e IgM y, curiosamente, un aumento de IgG2b, en los animales que consumieron cacao durante tres semanas (Pérez-Berezo y col., 2009). Esta diferencia, también podría ser atribuida al agente inyectado, ya que en el caso del estudio de Pérez-Berezo y col. (2009) los animales se inmunizaron con una solución con ovoalbúmina, lo cual conlleva una inmunización sin patología clínica asociada, y las ratas del **Artículo 4** eran inyectadas con una emulsión de colágeno bovino tipo II en adyuvante incompleto de Freund, lo que les induce el desarrollo de una patología artrítica autoinmune. Otro aspecto a considerar con el fin de explicar las diferencias entre estos estudios sería la concentración de compuestos fenólicos presente en los cacaos empleados, ya que los animales con artritis inducida por colágeno (**Artículo 4**) recibieron un cacao que presentaba menor concentración de polifenoles que el utilizado en la artritis adyuvante (**Artículo 2**) y en el estudio de Pérez-Berezo y col. (2009).

Por último, destacar que, a pesar de detectar mejoría clínica sólo a nivel de la respuesta inflamatoria aguda, en conjunto el cacao es capaz de crear un ‘ambiente antiinflamatorio’ en los organismos que lo consumen, como se ha demostrado en la regulación del estrés oxidativo, de la respuesta de humoral y de otros mediadores y efectores de la respuesta inflamatoria, por lo que se considera que podría ser un potencial coadyuvante terapéutico de fármacos antiinflamatorios.

Conclusiones

The results obtained from this study have enabled us to draw the following conclusions:

After one weeks of daily cocoa administration, a local acute inflammatory response is reduced in rats. In particular:

- Cocoa administration at dose of 4.8 g/kg/day diminishs the hind-paw edema induced by carrageenin injection from 1 h up to 6 h. A lower dose of cocoa (2.4 g/kg/day) is able to decrease the hind-paw edema induced by carrageenin only for the first hour.
- The early anti-inflammatory effect of cocoa can be partially due to its regulatory action on the inflammatory mediator bradykinin because animals receiving the dose of 2.4 g/kg/day of cocoa develop lower hind-paw swelling than reference ones in the faster model of acute inflammation induced by bradykinin.
- Cocoa intake (4.8 g/kg/day) diminishes the inflammatory potential of macrophages by reducing the synthesis of reactive oxygen species and nitric oxide, and the release of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6.

Cocoa diet intake before and during experimental arthritis is not enough to reduce the clinical symptoms developed by animals although modulates the production of several inflammatory mediators and reduces the proportion of effector cells. In particular:

- Cocoa-enriched diets not reduce the hind-paw swelling in the models of adjuvant arthritis and collagen-induced arthritis.
- The cocoa diets decrease the oxidative stress associated to the arthritic pathology and increases the antioxidant defence in lymphoid tissues. Specifically, cocoa reduces ROS, NO and TNF- α production in macrophages and normalizes the superoxide dismutase and catalase activities in splenocytes from arthritic animals.
- The cocoa diet prevents some alterations induced by adjuvant arthritis, such as an increase in the proportion of blood Th lymphocytes, a decrease in the proportion blood Treg cells and a disequilibrium in inguinal lymph node NK cell subsets.
- The cocoa intake reduces the humoral immune response induced by experimental arthritis. This cocoa effect is detected later in the autoimmune arthritis model than

in the chronic arthritis one. Specifically, in adjuvant arthritis induced in Wistar rats, the anti-*Mycobacterium butyricum* antibody concentration already decreases at the second week post-induction, whereas in the collagen-induced arthritis induced in LOU rats, the autoantibodies against collagen tipus II appear reduced at the fourth week post-induction.

In summary, this work adds some beneficial actions of cocoa intake. Together its antioxidant properties already stablished, cocoa reveals as a coadjuvant of anti-inflammatory therapy and autoimmune processes.

Bibliografía

A

- Abdelnour A, Bremell T, Holmdahl R, Tarkowski A. Clonal expansion of T lymphocytes causes arthritis and mortality in mice infected with toxic shock syndrome toxin-1-producing staphylococci. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1161-6.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 942-9.
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 229-34.
- Adams RLC, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton)*. 2009; 14: 462-70.
- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 4184-8.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
- Alia M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr* 2006; 45: 19-28.
- Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L, Wahl SM. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1990; 171: 231-47.
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: Receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 787-820.
- Aller MA, Arias JL, Arias J. Inflammatory response phases and their hypothetical trophic meaning. *Eur Respir J* 2004; 23: 353-4.
- Atkins E. Pathogenesis of fever. *Physiol Rev* 1960; 40: 580-646.
- Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Gorla R, Marchesoni A, Caporali R. Switching rheumatoid arthritis treatments: An update. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 397-403.
- Ayer LM, Issekutz AC, Waterhouse CCM, Stadnyk AW. Cytokine mRNA in the joints and draining lymph nodes of rats with adjuvant arthritis and effects of cyclosporin A. *Inflammation* 2000; 24: 447-61.

Azam S, Hadi N, Khan UN, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 2003; 9: 325-30.

B

Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, Osakabe N, Kanegae M, Kondo K. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr* 2007; 137: 1436-41.

Bajtner E, Nandakumar KS, Engström A, Holmdahl R. Chronic development of collagen-induced arthritis is associated with arthritogenic antibodies against specific epitopes on type II collagen. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R1148-57.

Barthold SW, Moody KD, Terwilliger GA, Jacoby RO, Steere AC. An animal model for Lyme arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 539: 264-73.

Bas S, Perneger TV, Seitz M, Tiercy JM, Roux-Lombard P, Guerne PA. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: Comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 809-14.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; 139: 267-84.

Bazin H, Beckers A, Querinjean P. Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur J Immunol* 1974; 4, 44-8.

Beilke MA, Traina-Dorge V, England JD, Blanchard JL. Polymyositis, arthritis, and uveitis in a macaque experimentally infected with human T lymphotropic virus type I. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 610-5.

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 330-7.

Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009; 60: 355-66.

Boissier MC, Chiochia G, Ronziere MC, Herbage D, Fournier C. Arthritogenicity of minor cartilage collagens (types IX and XI) in mice. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1-8.

- Borchers AT, Keen CL, Hannum SM, Gershwin ME. Cocoa and chocolate: Composition, bioavailability, and health implications. *J Med Food* 2000 3: 77-105.
- Børretzen M, Chapman C, Natvig JB, Thompson KM. Differences in mutational patterns between rheumatoid factors in health and disease are related to variable heavy chain family and germ-line gene usage. *Eur J Immunol* 1997; 27: 735-41.
- Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 2003; 25: 3-18.
- Brunnee T, La Porta C, Reddigari SR, Salerno VM, Kaplan AP, Silverberg M. Activation of factor XI in plasma is dependent on factor XII. *Blood* 1993; 81: 580-6.
- Bush KA, Walker JS, Lee CS, Kirkham BW. Cytokine expression and synovial pathology in the initiation and spontaneous resolution phases of adjuvant arthritis: Interleukin-17 expression is upregulated in early disease. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 487-95.
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67: 1033-6.
- Buzás EI, Brennan FR, Mikecz K, Garzó M, Negroiu G, Holló K, Cs-Szabó G, Pintye E, Glant TT. A proteoglycan (aggrecan)-specific T cell hybridoma induces arthritis in BALB/c mice. *J Immunol* 1995; 155: 2679-87.

C

- Carnésecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, Coehlo D, Gossé F, Raul F. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2002; 175: 147-55.
- Carlsén S, Hansson AS, Olsson H, Heinegård D, Holmdahl R. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 477-84.
- Carraway MS, Welty-Wolf KE, Miller DL, Ortel TL, Idell S, Ghio AJ, Petersen LC, Piantadosi CA. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1200-9.
- Carrillo-Esper R, González-Salazar JA. Inflamación-endotelio-coagulación en sepsis. Conceptos actuales. *Cir Cir* 2002; 70: 433-41.
- Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-16.
- Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 2009; 30: 576-87.
- Cienfuegos-Jovellanos E, Quiñones MM, Muguerza B, Moulay L, Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to

- preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 6156-62.
- Cirino G, Cicala C, Bucci M, Sorrentino L, Ambrosini G, DeDominicis G, Altieri DC. Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation. Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo. *J Clin Invest* 1997; 99: 2446-51.
- Cole BC. The immunobiology of *Mycoplasma arthritidis* and its superantigen MAM. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; 174: 107-19.
- Cole DS, Morgan BP. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clin Sci* 2003; 104: 455-66.
- Cone JB. Inflammation. *Am J Surg* 2001; 182: 558-62.
- Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, Dörner T. Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 431-5.
- Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, Laudanna C. Chemokines trigger immediate $\beta 2$ integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000; 13: 759-69.
- Cooles FAH, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 3: 233-40.
- Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1365-74.
- Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Lüscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*. 2009 Mar 17;119(10):1433-41.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 569-90.
- Counet C, Collin S. Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 6816-22.
- Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med* 1977; 146: 1585-602.

D

- Dale DC, Boxer L, Conrad Liles W. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008; 112: 935-45.
- Deng GM, Nilsson IM, Verdrengh M, Collins LV, Tarkowski A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* 1999; 5: 702-5.

- Di Paola R, Cuzzocrea S. Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis. *Autoimmun Rev* 2008; 8: 73-5.
- Dillinger TL, Barriga P, Escarcega S, Jimenez M, Salazar Lowe D, Grivetti LE. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr* 2000; 130: 2057S-72S.
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-8.
- Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 1999; 179: 294-304.
- Dumonde DC, Glynn LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* 1962; 43: 373-83.
- Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 2010; 20: 34-50.
- Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 2010; 59: 459-69.
- Duskin A, Eisenberg RA. The role of antibodies in inflammatory arthritis. *Immunol Rev* 2010; 233: 112-25.

E

- Endo H, Akahoshi T, Nishimura A, Tonegawa M, Takagishi K, Kashiwazaki S, Matsushima K, Kondo H. Experimental arthritis induced by continuous infusion of IL-8 into rabbit knee joints. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 31-5.
- Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, Mietus-Snyder ML. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 2004; 23: 197-204.
- Engler MB, Engler MM. The Emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutr Rev* 2006; 64: 109-18.
- Erdman JW Jr, Carson L, Kwik-Urbe C, Evans EM, Allen RR. Effects of cocoa flavanols on risk factors for cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; 17: 284-7.

F

- Faridi Z, Njike VY, Dutta S, Ali A, Katz DL. Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function: a randomized controlled crossover trial. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 58-63.
- Farouque HM, Leung M, Hope SA, Baldi M, Schechter C, Cameron JD, Meredith IT. Acute and chronic effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in subjects with

- coronary artery disease: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Clin Sci (Lond)* 2006; 111: 71-80.
- Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007; 121: 2381-6.
- Felson DT. Epidemiology of the Rheumatic Diseases. En: *Arthritis and Allied Conditions*. McCarty DJ, Koopman WJ editores. Lea and Febigh. Philadelphia 1993; 17-47.
- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-61.
- Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens* 2003; 21: 2281-6.
- Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, Spieker L, Hermann M, Cooper KA, Serafini M, Lüscher TF, Ruschitzka F, Noll G, Corti R. Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* 2007; 116: 2376-82.
- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178: 2249-54.
- Fraga CG, Litterio MC, Prince PD, Calabró V, Piotrkowski B, Galleano M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 48: 63-7.
- Franch A, Cassany S, Castellote C, Castell M. Time course of antibodies against IgG and type II collagen in adjuvant arthritis. Role of mycobacteria administration in antibody production. *Immunobiology* 1994a; 190: 93-104.
- Franch A, Castellote C, Castell M. Effect of acetylsalicylic acid and dexamethasone on antibody production in adjuvant arthritis. *Rheumatol Int* 1994b; 14: 27-31.
- Franklin EC, Holman HR, Muller-Eberhard HJ, Kunkel HG. An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1957; 105: 425-38.

G

- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 232-41.
- Gautam P, Jain SK. Functions and significance of nitric oxide in patho-physiological processes. *Indian J Biotechnol* 2007; 6: 293-304.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 1401-12.

- Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 201-12.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35.
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Haegeman G, Goya L, Bravo L, Ramos S. Epicatechin induces NF-kappaB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *Br J Nutr* 2010; 103: 168-79.
- Grassi D, Desideri G, Ferri C. Blood pressure and cardiovascular risk: what about cocoa and chocolate? *Arch Biochem Biophys* 2010; 50: 112-5.
- Griffiths LA. Phenolic acids and flavonoids of *Theobroma cacao* L.; separation and identification by paper chromatography. *Biochem J* 1958; 70: 120-5.

H

- Han S, Cao S, Bheekha-Escura R, Zheng B. Germinal center reaction in the joints of mice with collagen-induced arthritis: An animal model of lymphocyte activation and differentiation in arthritic joints. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1438-43.
- Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 2008; 14: 461-9.
- Hatano T, Miyatake H, Natsume M, Osakabe N, Takizawa T, Ito H, Yoshida T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry* 2002; 59: 749-58.
- Hayem G, Chazerain P, Combe B, Elias A, Haim T, Nicaise P, Benali K, Eliaou JF, Kahn MF, Sany J, Meyer O. Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 7-13.
- Hegen M, Keith Jr JC, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1505-15.
- Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Lüscher TF, Riesen W, Noll G, Corti R. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 2006; 92: 119-20.
- Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 2007; 26: 477-89.

- Hollenberg NK, Martinez G, McCullough M, Meinking T, Passan D, Preston M, Rivera A, Taplin D, Vicaria-Clement M. Aging, acculturation, salt intake, and hypertension in the Kuna of Panama. *Hypertension* 1997; 29: 171-6.
- Hrubey PS, Harvey AK, Bendele AM, Chandrasekhar S. Effects of anti-arthritis drugs on IL-1 induced inflammation in rats. *Agents Actions* 1991; 34: 56-9.
- Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon- γ receptor. *Science* 1993; 259: 1742-5.
- Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, Spencer J, Pitzalis C. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med* 2009; 6: e1.
- Hurst WJ, Tarka SM Jr, Powis TG, Valdez F Jr, Hester TR. Cacao usage by the earliest Maya civilization. *Nature* 2002; 418: 289-90.
- Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121: 2373-80.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 276-85.
- Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002; 109: 41-50.

I

- IUIS/WHO Subcommittee on chemokine nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 2003; 21: 48-9.

J

- Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm* 2006; 74: 371-403.
- Jenny M, Saner E, Klein A, Ledochowski M, Schennach H, Ueberall F, Fuchs D. Cacao extracts suppress tryptophan degradation of mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *J Ethnopharmacol* 2009; 122: 261-7.
- Jeong WS, Kim IW, Hu R, Kong AN. Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line. *Pharm Res* 2004; 21: 649-60.
- Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW.

Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* 2005; 11: 1173-9.

Johansson ACM, Sundler M, Kjellén P, Johannesson M, Cook A, Lindqvist AKB, Nakken B, Bolstad AI, Jonsson R, Alarcón-Riquelme M, Holmdahl R. Genetic control of collagen-induced arthritis in a cross with NOD and C57BL/10 mice is dependent on gene regions encoding complement factor 5 and Fc γ RIIb and is not associated with loci controlling diabetes. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1847-56.

Jones BL, Kearns GL. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. 2011 *Clin Pharmacol Ther*; 89: 189-97.

Jourdain C, Tenca G, Deguercy A, Troplin P, Poelman D. In-vitro effects of polyphenols from cocoa and β -sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *Eur J Cancer Prev* 2006; 15: 353-61.

Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1786-800.

K

Kang NJ, Lee KW, Lee DE, Rogozin EA, Bode AM, Lee HJ, Dong Z. Cocoa procyanidins suppress transformation by inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 2008; 283: 20664-73.

Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-87.

Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 2000; 130: 2105S-8S.

Katz D, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2011; en prensa.

Kaumann AJ, Levy FO. 5-Hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 674-706.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-84.

Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 1-20.

Kelchtermans H, Geboes L, Mitera T, Huskens D, Leclercq G, Matthys P. Activated CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 744-50.

Kenny TP, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 293-300.

Kenny TP, Shu SA, Moritoki Y, Keen CL, Gershwin ME. Cocoa flavanols and procyanidins can modulate the lipopolysaccharide activation of polymorphonuclear cells in vitro. *J Med Food* 2009; 12: 1-7.

Key NS, Geng J, Bach RR. Tissue factor; from Morawitz to microparticles. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007; 118; 165-73.

Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 1977; 20:1396-1401.

Keystone EC, Ware CF, Tumor necrosis factor and anti-tumor necrosis factor therapies. *J Rheumatol Suppl* 2010; 37: 27-39.

Kim JE, Son JE, Jung SK, Kang NJ, Lee CY, Lee KW, Lee HJ. Cocoa polyphenols suppress TNF- α -induced vascular endothelial growth factor expression by inhibiting phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1) activities in mouse epidermal cells. *Br J Nutr.* 2010; 104: 957-64.

Kleinau S, Erlandsson H, Holmdahl R, Klareskog L. Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement. *J Autoimmun* 1991; 4: 871-80.

Koga T, Kakimoto K, Hirofuji T, Kotani S, Sumiyoshi A, Saisho K. Muramyl dipeptide induces acute joint inflammation in the mouse. *Microbiol Immunol* 1986; 30: 717-23.

Kurosawa T, Itoh F, Nozaki A, Nakano Y, Katsuda S, Osakabe N, Tsubone H, Kondo K, Itakura H. Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 2005; 179: 237-46.

L

Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 213-20.

Laudanna C, Alon R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost* 2006; 95: 5-11.

Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher EC. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002; 186: 37-46.

Lecci A, Giuliani S, Tramontana M, Carini F, Maggi CA. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides* 2000; 34: 303-13.

- Lee HS, Korman BD, Le JM, Kastner DL, Remmers EF, Gregersen PK, Bae SC. Genetic risk factors for rheumatoid arthritis differ in Caucasian and Korean populations. *Arthritis Rheum* 2009; 60, 364-71.
- Lee KW, Kang NJ, Oak MH, Hwang MK, Kim JH, Schini-Kerth VB, Lee HJ. Cocoa procyanidins inhibit expression and activation of MMP-2 in vascular smooth muscle cells by direct inhibition of MEK and MT1-MMP activities. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 34-41.
- Lee KW, Kundu JK, Kim SO, Chun KS, Lee HJ, Surh YJ. Cocoa polyphenols inhibit phorbol ester-induced superoxide anion formation in cultured HL-60 cells and expression of cyclooxygenase-2 and activation of NF-kappaB and MAPKs in mouse skin in vivo. *J Nutr* 2006; 136: 1150-5.
- Lehman TJ, Allen JB, Plotz PH, Wilder RL. Polyarthritis in rats following the systemic injection of *Lactobacillus casei* cell walls in aqueous suspension. *Arthritis Rheum* 1983; 26:1259-65.
- Leung BP, Conacher M, Hunter D, McInnes IB, Liew FY, Brewer JM. A novel dendritic cell-induced model of erosive inflammatory arthritis: distinct roles for dendritic cells in T cell activation and induction of local inflammation. *J Immunol* 2002; 169(12):7071-7.
- Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 1990; 323: 645-55.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678-89.
- Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Weisman M, Emery P, Feldmann M, Harriman GR, Maini RN. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1594-602.

M

- Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol* 2008; 28: 635-9.
- Mao TK, Powell J, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Influence of cocoa procyanidins on the transcription of interleukin-2 in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunother* 1999; 15: 23-9.

- Mao TK, Powell J, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Hammerstone JF, Gershwin ME. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 beta in peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 2000; 66: 1377-86.
- Mao TK, Van De Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Cocoa flavonols and procyanidins promote transforming growth factor-beta1 homeostasis in peripheral blood mononuclear cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 93-9.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440: 228-32.
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 229-65.
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440, 237-41.
- Maskarinec G. Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr Cancer* 2009; 61: 573-9.
- Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are eliminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001; 166: 4177-84.
- Matthys P, Vermeire K, Heremans H, Billiau A. The protective effect of IFN- γ in experimental autoimmune diseases: a central role of mycobacterial adjuvant-induced myelopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 447-54.
- McCullough ML, Chevaux K, Jackson L, Preston M, Martinez G, Schmitz HH, Coletti C, Campos H, Hollenberg NK. Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47: S103-9.
- McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100: S97-S103.
- Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-8.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell* 2010; 140: 771-6.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454: 428-35.
- Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 557-69.
- Mena VR, Riveron RI, Perez JA. Nuevas consideraciones fisiopatológicas sobre el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica relacionada con la sepsis. *Rev Cubana Pediatr* 1996; 68: 57-70.

- Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing. An overview. *Clin Plastic Surg* 2003; 30: 1-12.
- Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, Llorach R, Garrido I, Gómez-Cordovés C, Andres-Lacueva C, Bartolomé B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites *Food Funct* 2010; 1: 233-53.
- Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006; 147: S193-S201.
- Moore KL, Agur MR. Introducción a la anatomía clínica. En: *Fundamentos de anatomía con orientación clínica*. Panamericana. Buenos Aires 2006; 17-20.
- Morgan ME, Flierman R, Van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, Van Ewijk W, Van Laar JM, de Vries RR, Toes RE. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2212-21.
- Mowen KA, Glimcher LH. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev* 2004; 202: 203-22.
- Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, Nyssönen K, Salonen JT. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1351-9.

N

- Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Research* 2002; 4: S233-42.
- Nam J, Emery P. Aspects of TNF inhibitor therapy in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2010; 20: 325-30.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173-82.
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-52.
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fogelman AM. Mechanisms of disease: proatherogenic HDL-an evolving field. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 504-11.
- Noé V, Peñuelas S, Lamuela-Raventós RM, Permanyer J, Ciudad CJ, Izquierdo-Pulido M. Epicatechin and a cocoa polyphenolic extract modulate gene expression in human Caco-2 cells. *J Nutr* 2004; 134: 2509-16.

O

- Ono K, Takahashi T, Kamei M, Mato T, Hashizume S, Kamiya S, Tsutsumi H. Effects of an aqueous extract of cocoa in nitric oxide production of macrophages activated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Nutrition* 2003; 19: 681-5.
- Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-72.
- Ortmann RA, Shevach EM. Susceptibility to collagen-induced arthritis: Cytokine-mediated regulation. *Clin Immunol* 2001; 98: 109-18.
- Osakabe N, Baba S, Yasuda A, Iwamoto T, Kamiyama M, Takizawa T, Itakura H, Kondo K. Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic Res* 2001; 34: 93-9.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K. Catechins and their oligomers linked by C4 --> C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 51-6.
- Ottaviani JJ, Keen CL, Fraga CG. Chocolate and health: on the vascular effects of flavanols in cocoa. *Agro Food Industry Hi-Tech* 2006; 17: 9-12.

P

- Padmanabhan N, Selye H. Acute polyarthritis produced by lipopolysaccharides in rats. *Ann Allergy* 1962; 20:320-4.
- Pangburn MK, Rawal N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 6-10.
- Pawlinski R, Pedersen B, Kehrl B, Aird WC, Frank RD, Guha M, Mackman N. Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model. *Blood* 2003; 101: 3940-7.
- Pazos M, Andersen ML, Medina I, Skibsted LH. Efficiency of natural phenolic compounds regenerating alpha-tocopherol from alpha-tocopheroxyl radical. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 3661-6.
- Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 91: 95-101.
- Pecchi E, Dallaporta M, Jean A, Thirion S, Troadec JD. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiol Behav* 2009; 97: 279-92.
- Peña M. Artritis Reumatoidea. 30 años de experiencia. Editorial Servioffset. Bogotá 1997.
- Pérez-Berezo T, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Permanyer J, Franch A, Castell M. Influence of a cocoa-enriched diet on specific immune response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 389-97.

- Pérez-Berezo T, Franch A, Castellote C, Castell M, Pérez-Cano FJ. Mechanisms involved in down-regulation of intestinal IgA in rats by high cocoa intake. *J Nutr Biochem* 2011a, in press.
- Pérez-Berezo T, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Pérez-Cano FJ, Castell M. Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol Nutr Food Res* 2011b; 55: S56-S66.
- Pérez-Cano FJ, Franch A, Perez-Berezo T, Ramos-Romero S, Castellote C, Castell M. Flavonoids on the immune system. 2011 In: 'Bioactive Foods in chronic disease states' Elsevier en prensa.
- Pérez-Cano FJ, Pérez-Berezo T, Ramos-Romero S, Ramiro-Puig E, Castellote C, Franch À, Castell M. Is there an anti-inflammatory potential beyond the antioxidant power of cocoa? En: *Chocolate, fast foods and sweeteners: consumption and health*. Bishop MR editor. Nova Science Publishers, Inc. New York 2009; 85-104.
- Persson IA, Persson K, Hägg S, Andersson RG. Effects of cocoa extract and dark chocolate on angiotensin-converting enzyme and nitric oxide in human endothelial cells and healthy volunteers--a nutrigenomics perspective. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 57: 44-50.
- Pétrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 615-22.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: A molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 2006; 203: 2569-75.
- Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 803-15.
- Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, Vafeiadou K, Tzounis X, Whiteman M, Rice-Evans C, Spencer JP. The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 960-8.
- Potter M, Wax JS. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. *J Immunol* 1981; 127:1591-5.
- Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 332-40.
- Preza AM, Jaramillo ME, Puebla AM, Mateos JC, Hernández R, Lugo E. Antitumor activity against murine lymphoma L5178Y model of proteins from cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds in relation with in vitro antioxidant activity. *BMC Complement Altern Med* 2010; 10: 61.

Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011; 82: 513-23.

Pura Naik J. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3579-83.

R

Ramiro E, Franch A, Castellote C, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Castell M. Effect of *Theobroma cacao* flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Br J Nutr* 2005a; 93: 859-66.

Ramiro E, Franch A, Castellote C, Pérez-Cano F, Permanyer J, Izquierdo-Pulido M, Castell M. Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J Agric Food Chem* 2005b; 53: 8506-11.

Ramiro-Puig E, Casadesús G, Lee HG, Zhu X, McShea A, Perry G, Pérez-Cano FJ, Smith MA, Castell M. Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress. *Eur J Nutr* 2009; 48: 54-61.

Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: Antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr* 2009; 101: 931-40.

Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Castellote C, Izquierdo-Pulido M, Permanyer J, Franch A, Castell M. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin Exp Immunol* 2007a; 149: 535-42.

Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Castellote C, Permanyer J, Franch A, Izquierdo-Pulido M, Castell M. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 555-65.

Ramiro-Puig E, Urpi-Sarda M, Perez-Cano FJ, Franch A, Castellote C, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Castell M. Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *J Agric Food Chem* 2007b; 55: 6431-8.

Ramljak D, Romanczyk LJ, Metheny-Barlow LJ, Thompson N, Knezevic V, Galperin M, Ramesh A, Dickson RB. Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 537-46.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22: 659-61.

Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 2000; 130: 2109S-14S.

- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1603-16.
- Riewald M, Ruf W. Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis. *Crit Care* 2003; 7: 123-9.
- Roark CL, French JD, Taylor MA, Bendele AM, Born WK, O'Brien RL. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol* 2007; 179: 5576-83.
- Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 2008; 3, 99-126.
- Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martín MA. Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J Nutr Biochem* 2011; en prensa.
- Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martín MA. Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J Nutr Biochem* 2011; en prensa.
- Rosenbaum CC, O'Mathúna DP, Chavez M, Shields K. Antioxidants and antiinflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Altern Ther Health Med* 2010; 16: 32-40.
- Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 19-34.

S

- Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T. Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell Immunol* 1997; 177: 129-36.
- Sánchez Atrio AI, Pérez Gómez A, Movasat A, Turrión Nieves AI, Álvarez-Mon Soto M. Arthritis reumatoide (I). *Medicine* 2009; 10: 1921-6.
- Sánchez D, Quiñones M, Moulay L, Mugerza B, Miguel M, Aleixandre A. Changes in arterial blood pressure of a soluble cocoa fiber product in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 1493-501.
- Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Casals I, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventós RM. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Mass Spectrom* 2003; 38: 35-42.

- Sarkar S, Fox DA. Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 710-3.
- Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 227-35.
- Scheid L, Reusch A, Stehle P, Ellinger S. Antioxidant effects of cocoa and cocoa products ex vivo and in vivo: is there evidence from controlled intervention studies? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 737-42.
- Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998; 187: 1205-13.
- Schnorr O, Brossette T, Momma TY, Kleinbongard P, Keen CL, Schroeter H, Sies H. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Arch Biochem Biophys* 2008; 476: 211-5.
- Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German JB, Keen CL. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 36-40.
- Seligson FH, Krummel DA, Apgar JL. Patterns of chocolate consumption. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 1060S-4S.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005; 6: 1191-7.
- Shen HM, Pervaiz S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J* 2006; 20: 1589-98.
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18, 385-405.
- Shi S, Ciurli C, Cartman A, Pidoux I, Poole AR, Zhang Y. Experimental immunity to the G1 domain of the proteoglycan versican induces spondylitis and sacroiliitis, of a kind seen in human spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2903-15.
- Simon SI, Hu Y, Vestweber D, Smith CW. Neutrophil tethering on E-selectin activates β 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol* 2000; 164: 4348-58.
- Sivera Mascaró F, Vela Casasempere P, Pascual Gómez E. Tratamiento de la artritis reumatoide. *Medicine* 2005; 9: 1822-9.
- Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gorter S, Knevel R, Nam J, Schoels M, Aletaha D, Buch M, Gossec L, Huizinga T, Bijlsma JW, Burmester G, Combe B, Cutolo M, Gabay C, Gomez-Reino J, Kouloumas M, Kvien TK, Martin-Mola E, McInnes I, Pavelka K, van Riel P, Scholte M, Scott DL, Sokka T,

- Valesini G, van Vollenhoven R, Winthrop KL, Wong J, Zink A, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 964-75.
- Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 2008; 9: 310-8.
- Son J, Pang B, McFaline JL, Taghizadeh K, Dedon PC. Surveying the damage: the challenges of developing nucleic acid biomarkers of inflammation. *Mol Biosyst* 2008; 4: 902-8.
- Song YW, Kang EH. The pathogenic role of rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Int J Clin Rheumatol* 2010; 5: 651-8.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14.
- Stetson DB, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3- dependent innate immune response. *Immunity* 2006; 24: 93-103.
- Stevens CR, Blake DR, Merry P, Revell PA, Levick JR. A comparative study by morphometry of the microvasculature in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1991; 4: 1508-13.
- Stievano L, Piovan E, Amadori A. C and CX3C chemokines: cell sources and physiopathological implications. *Crit Rev Immunol* 2004; 24: 205-28.
- T**
- Taylor PC, Feldmann M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 578-82.
- Taylor PC, Sivakumar B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 293-8.
- Thornton S, Duwel LE, Boivin GP, Ma Y, Hirsch R. Association of the course of collagen-induced arthritis with distinct patterns of cytokine and chemokine messenger RNA expression. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1109-18.
- Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmunity* 2010; 35: 10-4.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146: 857-68.

U

Urpi-Sarda M, Ramiro-Puig E, Khan N, Ramos-Romero S, Llorach R, Castell M, Gonzalez-Manzano S, Santos-Buelga C, Andres-Lacueva C. Distribution of epicatechin metabolites in lymphoid tissues and testes of young rats with a cocoa-enriched diet. *Br J Nutr* 2010; 103: 1393-7.

Urzainqui A, Serrador JM, Viedma F, Yáñez-Mó M, Rodríguez A, Corbí AL, Alonso-Lebrero JL, Luque A, Deckert M, Vázquez J, Sánchez-Madrid F. ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity* 2002; 17: 401-12.

V

Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 2001; 85: 342-50.

Vallbracht I, Rieber J, Oppermann M, Förger F, Siebert U, Helmke K. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1079-84.

Varela N, Chorny A, Gonzalez-Rey E, Delgado M. Tuning inflammation with anti-inflammatory neuropeptides. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 461-78.

Verheijden GF, Rijnders AW, Bos E, Coenen-de Roo CJ, van Staveren CJ, Miltenburg AM, Meijerink JH, Elewaut D, de Keyser F, Veys E, Boots AM. Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1115-25.

Vicuña Pinedo RG, Ortiz García A. Artritis reumatoide (I). Etiopatogenia. *Medicine* 2005; 99: 1805-1814.

Vingsbo C, Jonsson R, Holmdahl R. Avridine-induced arthritis in rats; a T cell-dependent chronic disease influenced both by MHC genes and by non-MHC genes. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 359-63.

Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shuta D, Samman N, Agbor GA. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 8071-6.

Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, van Venrooij WJ, Ménard HA. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R142–50.

W

- Waksman BH. Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand J Immunol* 2002; 56: 12-34.
- Wang JY, Roehrl MH. Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14362-7.
- Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 2000; 130: 2115S-9S.
- Wernhoff P, Unger C, Bajtner E, Burkhardt H, Holmdahl R. Identification of conformation-dependent epitopes and V gene selection in the B cell response to type II collagen in the DA rat. *Int Immunol* 2001; 13: 909–19.
- West MA, Mathei R, Bubrick MP. Autoregulation of hepatic macrophages activation in sepsis. *J Trauma* 1993; 34: 473-9.
- Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 801-6.
- Williams JP, Meyers JA. Immune-mediated inflammatory disorders (I.M.I.D.s): The economic and clinical costs. *Am J Manag Care* 2002; 8: S664-81.
- Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S, Gruening M, Pfister E, Schewe T, Sies H. Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F(2)-isoprostane concentrations in humans. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 411-21.
- World Cocoa Foundation. How chocolate is made. <http://www.worldcocoafoundation.org/learn-about-cocoa/tree-to-table/how-chocolate-is-made.asp> 2011; Juny 15th, 2011.
- Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49: 1618-31.

X

- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/ Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269: 4705-8.

Y

- Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, Nakamura H, Furukawa F, Imazawa T et al. Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis in vitro, and in vivo mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 2002; 185: 123-30.

- Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, Okazaki K, Furukawa F, Imazawa T et al. Chemoprevention of lung carcinogenesis by cacao liquor proanthocyanidins in a male rat multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Lett* 2003; 191: 49-57.
- Yan SF, Barile GR, D'Agati V, Yan SD, Ramasamy R, Schmidt AM. The biology of RAGE and its ligands: uncovering mechanisms at the heart of diabetes and its complications. *Curr Diab Rep* 2007; 7: 146-53.
- Yasuda A, Natsume M, Sasaki K, Baba S, Nakamura Y, Kanegae M et al. Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet. *Biofactors* 2008; 33: 211-23.
- Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 2009; 227: 54-65.
- Yoshizaki K, Nakagawa T, Kaieda T, Muraguchi A, Yamamura Y, Kishimoto T. Induction of proliferation and Ig Production in Human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *J Immunol* 1982; 128: 1296-301.

Z

- Zare F, Bokarewa M, Nenonen N, Bergström T, Alexopoulou L, Flavell RA, Tarkowski A. Arthritogenic properties of double-stranded (viral) RNA. *J Immunol* 2004; 172: 5656-63.
- Zeng H, Locatelli M, Bardelli C, Amoruso A, Coisson JD, Travaglia F et al. Anti-inflammatory properties of clovamide and Theobroma cacao phenolic extracts in human monocytes: evaluation of respiratory burst, cytokine release, NF- κ B activation, and PPAR γ modulation. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 5342-50.
- Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, de Miguel E, Rosenberg LC, Poole AR. Induction of arthritis in BALB/c mice by cartilage link protein: involvement of distinct regions recognized by T and B lymphocytes. *Am J Pathol* 1998; 153: 1283-91.
- Zhang P, Han D, Tang T, Zhang X, Dai K. The destruction evaluation in different foot joints: New ideas in collagen-induced arthritis rat model. *Rheumatol Int* 2009; 29: 607-13.
- Zhang WY, Liu HQ, Xie KQ, Yin LL, Li Y, Kwik-Urbe CL, Zhu XZ. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 508-15.
- Zvaifler NJ. The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv Immunol* 1973; 16: 265-336.