

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**EFFECTO DE LA FIBRA EN UN MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL  
EN RATA. PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA**

TESIS DOCTORAL

**Óscar de Haro y Velázquez de Castro**

**2007**





Directores:

Dr. Antonio Zarzuelo Zurita

Catedrático del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada.

Dr. Julio Juan Gálvez Peralta

Profesor titular del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada.

Dra. Mònica Comalada Vila

Investigadora contratada del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada.



## ÍNDICE

---



---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. FISIOLÓGÍA DEL TRACTO DIGESTIVO</b> .....	1
1.1. Aspectos básicos de la anatomía y fisiología del intestino humano.....	1
1.2. Digestión y absorción de nutrientes en la mucosa intestinal.....	4
1.3. La microbiota del TGI.....	5
<b>2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL</b> .....	8
2.1. Etiología y patogénesis.....	8
2.2. Tratamiento.....	12
2.2.1. Fármacos antiinflamatorios.....	12
2.2.1.1. Aminosalicilatos.....	12
2.2.1.2. Corticoides.....	14
2.2.2. Inmunosupresores.....	15
2.2.3. Terapias biológicas.....	16
2.2.3.1. Bloqueo de citocinas proinflamatorias.....	16
2.2.3.2. Bloqueo de moléculas de adhesión.....	18
2.2.4. Manipulación de la flora bacteriana.....	18
2.2.4.1. Probióticos.....	18
2.2.4.2. Antibióticos.....	19
<b>3. FIBRA DIETÉTICA</b> .....	20
3.1. Concepto de Fibra dietética.....	20
3.2. Componentes de la Fibra Dietética.....	21
3.2.1. Polisacáridos.....	21
3.2.2. Oligosacáridos.....	22
3.2.3. Lignina.....	24
3.3. Tipos de Fibra dietética.....	24
3.3.1. Fibras fermentables y no fermentables.....	25
3.3.2. Fibras solubles e insolubles.....	26
3.4. Fuentes de Fibra.....	28
3.5. Funciones de la fibra.....	31
3.5.1. Actividad prebiótica.....	31
3.5.2. Producción colónica de AGCC.....	32
3.5.3. Actividad frente al cáncer de colon.....	34

---

4. FIBRA EN LA EII.....	35
4.1. Estudios en humanos.....	36
4.2. Estudios en animales.....	38
4.3. Estudios <i>in vitro</i> .....	40
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
1. REACTIVOS Y COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS.....	49
2. ENSAYOS IN VIVO. MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR TNBS.....	50
2.1. Animales de experimentación.....	50
2.2. Evaluación de la actividad prebiótica de las dietas.....	51
2.3. Evaluación del efecto antifinflamatorio intestinal de las dietas en el modelo del TNBS.....	51
2.3.1. Inducción de la colitis experimental .....	51
2.3.2. Diseño experimental.....	52
2.3.2. Valoración del proceso inflamatorio intestinal.....	53
2.3.2.1. Determinación de la actividad mieloperoxidasa colónica.....	54
2.3.2.2. Determinación del contenido de glutatión total.....	55
2.3.2.3. Determinación de los niveles colónicos de LTB4.....	57
2.3.2.4. Determinación de la expresión de iNOS y PCNA en tejido colónico.....	57
2.3.2.5. Cuantificación de la flora bacteriana.....	59
2.3.2.6. Cuantificación de AGCC en los contenidos intestinales por cromatografía de gases.....	60
3. ENSAYOS IN VITRO.....	61
3.1. Fermentabilidad de las fibras.....	61
3.2. Obtención y cultivo de las líneas celulares epiteliales intestinales (HT-29 y FHC).....	62
3.3. Ensayo de proliferación celular en HT-29 y FHC.....	63
3.4. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina.....	64
3.5. Ensayos de viabilidad por la técnica de cristal violeta.....	64
3.8. Determinación de la expresión de IL-8.....	65

---

4. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	65
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
1. EFECTO DE LOS AGCC SOBRE LA FISIOLOGÍA DEL EPITELIO INTESTINAL.....	69
1.1. Modelo de epitelio intestinal maduro y célula epitelial cancerosa mediante estudios in vitro con líneas celulares.....	69
1.2. Efecto de los AGCC sobre la proliferación y la diferenciación, en función del estado de confluencia de las células epiteliales.....	73
1.3. Efecto de los AGCC sobre la viabilidad de células HT-29 en cultivos no diferenciados y diferenciados.....	78
1.4. Efecto de los AGCC sobre la proliferación y viabilidad de células epiteliales normales.....	80
1.5. Efecto de los AGCC sobre la producción de IL-8 estimulada por LPS en distintos cultivos de HT-29.....	81
2. CAPACIDAD FERMENTATIVA DE DIFERENTES TIPOS DE FIBRA.....	83
2.1. Capacidad fermentativa in vitro de las fibras.....	83
2.2. Capacidad Fermentativa in vivo de las fibras.....	85
2.2.1. Producción de AGCC en ratas.....	85
2.2.2. Modulación de la microbiota intestinal.....	87
2.2.3. Modificación del pH de los contenidos intestinales.....	88
3. EFECTO DE LAS FIBRAS EN EL MODELO DE COLITIS POR TNBS.....	90
3.1. Valoración del proceso inflamatorio.....	90
3.2. Producción de AGCC por los contenidos colónicos en el modelo de TNBS.....	98
3.2. Microflora intestinal en ratas colíticas.....	100
4. EFECTO DIFERENCIAL SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CEI DE UNA MEZCLA DE AGCC PRODUCIDOS IN VIVO TRAS LA FERMENTACIÓN COLÓNICA DE FIBRA.....	102
<b>DICUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
1. Papel de los AGCC en la homeostasis del epitelio intestinal colónico.....	110

---

2- Producción de AGCC por las fibras seleccionadas.....	115
3- Efecto antiinflamatorio intestinal de las fibras estudiadas: FOS Y salvado de arroz.....	123
<b>CONCLUSIONES</b> .....	133
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	137
<b>ANEXO</b> .....	163
Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral.....	165
Abrebiaturas.....	167

## **INTRODUCCIÓN**

---



## INTRODUCCIÓN

### 1. FISIOLÓGÍA DEL TRACTO DIGESTIVO.

#### 1.1. Aspectos básicos de la anatomía y fisiología del intestino humano.

El tracto gastrointestinal (TGI) cumple la función de digerir los alimentos y absorber los nutrientes, pero además tiene una importante función de barrera, ya que está en contacto con multitud de microorganismos. Sumado a esto, otro aspecto importante es que el TGI es el mayor órgano del sistema inmunológico humano. Anatómicamente se compone de diferentes secciones: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano. Cada una de estas secciones realiza diferentes funciones y para ello tienen diferentes estructuras y secreciones.

El término “mucosa” se emplea para designar a los epitelios que revisten las cavidades del organismo que se comunican con el exterior, como la de los aparatos respiratorio, genitourinario y digestivo. La superficie mucosa del TGI (200-300 m<sup>2</sup> en un adulto) constituye la mayor interfase de nuestro organismo con el mundo exterior. Se trata del lugar donde se realiza la digestión y absorción de los nutrientes y, simultáneamente, debe actuar como barrera frente a agentes nocivos, incluyendo microorganismos patógenos. Entre los mecanismos que tienen este cometido se encuentran diversos factores no inmunológicos, como las secreciones gástrica, pancreática y biliar, la motilidad, el *mucus* o el recambio celular. Además de estos factores fisiológicos, la microbiota y el sistema inmunológico (que incluye tanto al tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal como a la inmunidad sistémica) crean y mantienen una barrera adicional. Dentro de la mucosa intestinal y para llevar a cabo estas funciones, existen diferentes tipos celulares.

Las células más directamente expuestas a la luz intestinal son los enterocitos, células epiteliales íntimamente unidas en su zona apical, que cumplen además de su función barrera, un papel crucial en la adquisición de nutrientes. Por este motivo, su superficie externa presenta numerosas microvellosidades, pequeños pliegues densamente agrupados que aumentan la superficie de absorción de los enterocitos.

Otro grupo celular que integra la mucosa intestinal corresponde a las células caliciformes, células epiteliales especializadas en la secreción de glicoproteínas, que forman una capa de *mucus* responsable de la protección de las células epiteliales del contacto directo con el ambiente existente en la luz intestinal.

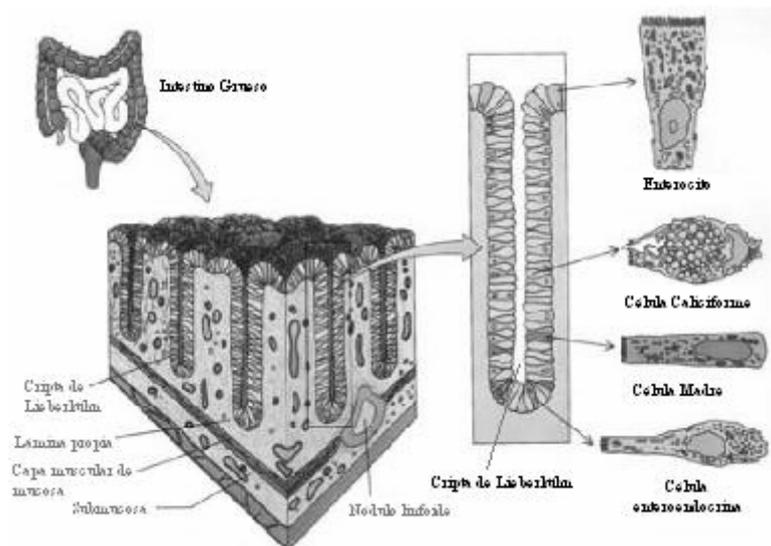
Por otra parte, también se encuentran otras células como las células M, que son responsables de captar moléculas del lumen intestinal y transferirlas a la lámina propia; las células de Paneth, que tienen una función defensiva segregando sustancias bactericidas como la lisozima; las células enteroendocrinas, que liberan hormonas que coordinan diferentes funciones intestinales. Por último, se hayan linfocitos intraepiteliales distribuidos por el epitelio para actuar como centinelas frente a posibles agresiones procedentes de la luz intestinal (Kato y Owen, 2005).

Bajo el epitelio se encuentra en primer lugar la membrana basal y a continuación, una capa de tejido conjuntivo denominado lámina propia. Esta última capa contiene diversas células inmunocompetentes, incluyendo células dendríticas, macrófagos y linfocitos residentes, que forman una unidad funcional con el epitelio. Estas células reciben y procesan las moléculas captadas por las células M. Esto es de gran importancia puesto que son las encargadas de filtrar el paso de nutrientes sin dejar pasar agentes potencialmente perjudiciales para el organismo.

Existe una gran similitud entre la estructura histológica del intestino delgado y del grueso, aunque hay algunas diferencias a destacar. En el intestino delgado las

criptas y vellosidades, junto con las microvellosidades de los enterocitos, confieren una gran superficie para la absorción de nutrientes. En el colon no es necesaria esta gran área ya que la absorción se restringe fundamentalmente a agua y electrolitos (Potter, 1999). Por este motivo, la mucosa colónica carece de vellosidades y microvellosidades. Por otro lado, las células caliciformes secretoras de moco son mucho más abundantes en el epitelio colónico que en el intestino delgado (Potter, 1999).

Otro aspecto muy importante del epitelio colónico es que se renueva constantemente cada 6 días aproximadamente. Esta renovación se lleva a cabo en las criptas de Lieberkühn, invaginaciones que tienen una profundidad de alrededor de 50 células, que se encuentran en gran número en la mucosa colónica (fig. 1).



**Figura 1.** Esquema de la mucosa, las vellosidades, las criptas de Lieberkühn y las células que componen el intestino grueso. Fuente: Gartner e Hiatt (2002).

En el fondo de estas criptas se localizan las células precursoras. Estas células se dividen por mitosis continuamente permitiendo la renovación del epitelio mediante proliferación y diferenciación de las células recién formadas, a medida que éstas suben a lo largo de la cripta (Potter, 1999). Las células maduras pierden su capacidad de dividirse de nuevo y finalmente mueren por apoptosis, exfoliándose a la luz intestinal.

El proceso de maduración es clave para el correcto funcionamiento de la mucosa. En el adenoma esta secuencia está alterada, ocurriendo una mitosis continua de las células sin sufrir el proceso de diferenciación, de manera que el compartimento donde proliferan puede llegar a ocupar la cripta completa (Cruz-Bustillo, 2004).

### **1.2. Digestión y absorción de nutrientes en la mucosa intestinal.**

Como se comentó anteriormente, una de las principales funciones del TGI es la digestión y absorción de los nutrientes procedentes de la dieta. Para esto se segregan diferentes enzimas a lo largo del tubo digestivo cuya función es hidrolizar las moléculas en otras más sencillas, que puedan atravesar la mucosa para incorporarse al torrente circulatorio.

El proceso comienza en la cavidad bucal. Las glándulas salivales secretan amilasa salival, que degrada parte del almidón, y lipasa salival, que actúa sobre las grasas dando lugar a compuestos más sencillos como son los ácidos grasos. En el estómago la pepsina degrada parcialmente las proteínas.

En el duodeno se liberan ácidos biliares y diversos tipos de enzimas. La función de los ácidos biliares es permitir que las grasas puedan ser atacadas en medio acuoso. Entre las enzimas encontramos amilasa pancreática, lipasa pancreática,

tripsina y quimiotripsina. La amilasa pancreática continúa degradando el almidón, mientras que la lipasa pancreática lo hace con las grasas. Las otras enzimas degradan péptidos menos complejos, producidos tras la acción de la pepsina.

En la mucosa del yeyuno e íleon se produce lactasa, maltasa y diferentes peptidasas, para completar lo máximo posible la digestión de los nutrientes aportados en la dieta.

La fracción no absorbida y los restos que no han podido ser digeridos pasarán al intestino grueso, en donde se finalizará el proceso digestivo gracias a la flora microbiana. Los microorganismos presentes en el colon, debido a su gran cantidad y diversidad, poseen el arsenal enzimático necesario para fermentar esos restos.

### **1.3. La microbiota del TGI.**

El TGI humano se coloniza con una comunidad microbiana extremadamente compleja (más de 400 especies en cada individuo). De hecho se estima que contiene aproximadamente  $10^{14}$  células procarióticas, cifra diez veces mayor que la suma de todas las células eucariotas del cuerpo humano (Moore y Holdeman, 1974).

La microbiota aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanzamos por el TGI. En el estómago, el bajo pH existente sólo permite el desarrollo de un pequeño número de especies. En el intestino delgado los principales factores limitantes para el establecimiento de microorganismos son los jugos pancreáticos y biliares y los movimientos peristálticos. A este nivel, los niveles aumentan progresivamente, desde  $10^4$ - $10^5$  unidades formadoras de colonias (ufc)/g de contenido en el duodeno, hasta más de  $10^8$  ufc/g en la región distal del íleon (Nord y Kager, 1984).

En el intestino grueso el pH está más próximo a la neutralidad, la velocidad de tránsito es mucho más lenta y las secreciones biliar y pancreática están mucho más diluidas. Por ello, no es de extrañar que el mayor número de bacterias en el TGI resida precisamente en este segmento. Además, existe un ambiente muy reductor y desprovisto de oxígeno por lo que la mayoría de las poblaciones son anaerobias estrictas y constituyen lo que se denomina la microbiota dominante, caracterizada por concentraciones del orden de  $10^9$ - $10^{12}$  ucf/g. Los géneros más abundantes son *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptoestreptococcus*, *Ruminococcus* y *Clostridium* (Tannock, 2002). En concentraciones inferiores aparecen poblaciones de bacterias anaerobias facultativas como *Lactobacillus*, *Enterobacterium*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, con tasas comprendidas entre  $10^5$  y  $10^8$  ucf/g (Holzapfel *et al.*, 1998). Éstas, pese a su inferior número, pueden resultar esenciales para la homeostasis microbiana en el intestino grueso.

Estas bacterias comensales presentes en el TGI juegan un papel fundamental en el organismo. Podemos dividir su aportación en 4 funciones: nutritiva, trófica, protectora e inmunológica.

a) **Función nutritiva:** La microbiota comensal es una fuente importante de vitaminas, como la vitamina K, y favorece la absorción de minerales, como el calcio o el hierro; sin embargo la principal función metabólica de la microbiota intestinal es la fermentación de los restos de la dieta no digeridos. Se estima que estos residuos no digeridos a nivel del colon humano alcanzan los 20-60 g de carbohidratos y 5-20 g de proteínas al día (Xaus, 2004). La diversidad genética de la microbiota intestinal produce diversos enzimas y rutas bioquímicas distintas a las que se encuentran en el huésped, permitiendo así la recuperación de parte de la energía de la dieta, que sin su actuación se perdería.

b) **Función trófica:** De esa fermentación colónica se pueden producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC), fundamentalmente acetato, propionato y butirato (ver apartado 3.5.2). Los cuales cumplen una importante función trófica en el epitelio intestinal, regulando tanto los procesos mecánicos como los fenómenos de proliferación y diferenciación epitelial (Frankel *et al.*, 1994). El butirato es absorbido rápidamente por el colonocito, donde es oxidado. De hecho, los colonocitos no reciben su energía de la circulación general como el resto de las células, sino que lo hacen de esta metabolización del butirato (Redondo, 2002a). Los otros dos AGCC son absorbidos y pasan al torrente circulatorio, teniendo diferentes destinos. Mientras que el propionato es utilizado principalmente por el hígado en la gluconeogénesis, el acetato se incorpora en la lipogénesis, que tiene lugar en el tejido adiposo, además de en el hígado (Rombeau y Kripke, 1990).

c) **Función protectora:** Otra de las funciones más relevantes de las bacterias comensales es la regulación y estabilización del ecosistema, evitando la colonización por parte de otros microorganismos patógenos. Existe un fenómeno de competición no sólo por el espacio, sino también por los nutrientes disponibles entre los microorganismos ya instaurados y los patógenos. Además, la microbiota da lugar a unas condiciones de pH, producción de bacteriocinas, etc., que dificultan de forma importante la colonización por un elemento patógeno extraño a la microbiota normal. En definitiva, la microbiota comensal cumple una función protectora frente a las infecciones.

d) **Función inmunológica:** El correcto desarrollo del sistema inmunológico de las mucosas depende, en gran medida, de la intercomunicación entre las bacterias comensales de las mucosas y las células inmunocompetentes. La presencia de las bacterias comensales es necesaria para el desarrollo del correcto equilibrio y regulación del sistema inmunológico del individuo.

Sumado a esto, otro aspecto interesante de la flora presente en el TGI es que, cuando se produce una alteración en la barrera intestinal, estos microorganismos pasan a ser un objetivo frente al que actúa el sistema inmunitario, que puede desencadenar un proceso inflamatorio, conduciendo a distintas patologías intestinales, entre las que cabe destacar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

## **2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.**

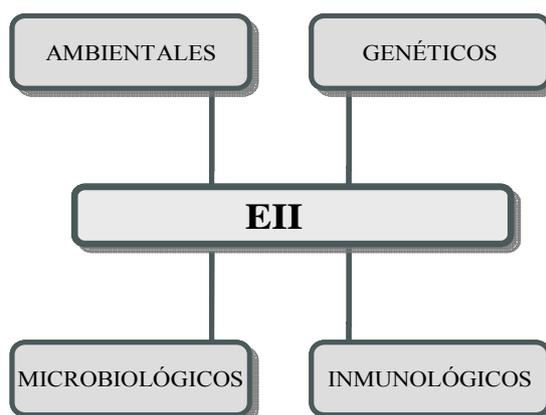
### **2.1. Etiología y patogénesis.**

El término EII comprende dos patologías muy relacionadas, la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), que se caracterizan por una inflamación crónica del intestino y por presentar períodos de exacerbación de los síntomas, seguidos de intervalos más o menos prolongados de remisión de los mismos. La CU se presenta solamente en el intestino grueso y el proceso inflamatorio se confina en la mucosa. La EC puede manifestarse en cualquier parte del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano y puede afectar a toda la pared del tubo digestivo, formando incluso abscesos y fistulas. En ocasiones se muestra con obstrucción intestinal (Fiocchi, 2005). En la tabla I se nombran las diferencias clínicas entre las dos patologías.

La etiología de la EII sigue considerándose desconocida, aunque se ha propuesto la interacción de factores ambientales, genéticos, microbiológicos e inmunológicos (fig. 2).

Existe una mayor incidencia de EII en las áreas urbanas de países industrializados (Fiocchi, 2005). Esto se ha asociado a **factores ambientales** como el mayor grado de higiene, la dieta y el gran uso de antibióticos que se produce en estos países más desarrollados económicamente (Wills-Karp *et al.*, 2001).

<b>Tabla I.</b> Diferencias anatomopatológicas y clínicas entre la CU y la EC.		
	Colitis Ulcerosa	Enfermedad de Crohn
Localización	Sólo colon	Todo el tubo digestivo
Úlceras	Sólo mucosas	Toda la pared intestinal
Diarrea	Líquida con sangre, moco y pus	Pastosa, rara vez con sangre
Fiebre	+	+
Fístulas	No	Sí
Anemia	Frecuente	Infrecuente
Pérdida de peso	+	++
Dolor abdominal	+	++
	Tipo retortijón con tenesmo	Después de las comidas



**Figura 2.** Factores que intervienen en la etiología de la EII.

Apoyando la importancia de los **factores genéticos** se encuentra el dato de que existe una mayor probabilidad de contraer algún tipo de EII entre los descendientes de pacientes afectados. Además, se han identificado algunos genes

implicados en la aparición de EC, como el CARD15/NOD2, el OCTN y el DLG5, que codifican proteínas implicadas en la permeabilidad de la mucosa intestinal frente a antígenos microbianos (Lacatos, 2006).

Junto a esto, en los últimos años se ha ido incrementado la importancia atribuida a la función de los **factores microbiológicos**. Diferentes estudios apoyan la hipótesis de que, en la EII, la flora intestinal es un objetivo frente al que actúa el sistema inmunitario, desencadenando la inflamación (Guarner y Malagelada, 2003). Lo cual puede estar además relacionado con un desequilibrio en la microbiota intestinal, en la que predominan las bacterias agresivas frente a una insuficiente cantidad de especies protectoras (Shanahan, 2000).

A todo lo anterior hemos de sumar los **factores inmunológicos**, ya que la translocación de endotoxinas y antígenos promovida en una situación de barrera intestinal alterada puede activar la respuesta inmunitaria de forma exagerada y sin capacidad de autolimitarse, originando una inflamación de tipo crónico (MacDermott *et al.*, 1996).

La secuencia de eventos en el proceso inflamatorio intestinal comienza con la activación de la respuesta inmunitaria innata, al producirse el reclutamiento de leucocitos desde el torrente sanguíneo al tejido dañado. Una vez allí, los neutrófilos liberan péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno, que causan por sí mismos aún más daño tisular y participan en el reclutamiento de otras células del sistema inmune. Entre éstas se encuentran los macrófagos que, una vez activados, producen citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, a la vez que radicales libres de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), amplificando la respuesta inmunitaria mucosal (Kurtovic y Segal, 2004).

Esta inflamación aguda evoluciona hacia la progresión de la respuesta tisular, en forma de inflamación crónica, que se caracteriza por la aparición de un infiltrado celular, compuesto sobre todo por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, prevaleciendo la formación de tejido fibroso sobre el exudado de líquidos. En la EC se detectan granulomas de linfocitos y macrófagos, mientras que en la CU se reclutan en primer lugar los macrófagos, y posteriormente se incorporan linfocitos. Los macrófagos desempeñan un papel clave en este proceso por la cantidad de sustancias biológicamente activas que pueden producir, y que pueden resultar destructivas si se producen de modo descontrolado. Los linfocitos también migran al tejido, atraídos por sustancias quimiotácticas producidas por los macrófagos. A su vez secretan citocinas y cronifican la reacción inflamatoria. En el caso de la EC, los linfocitos secretan citocinas del tipo Th1 (linfocitos T colaboradores tipo 1) (IL-6, IL-2, TNF, IFN) preferentemente, mientras que en el caso de UC se produce una respuesta del tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13). En los dos casos, todos estos mediadores contribuyen activamente en la cascada patogénica que inicia y perpetúa la respuesta inflamatoria en el intestino (Sartor, 1997).

En las reacciones inflamatorias crónicas el recambio celular está alterado como consecuencia de los mediadores de la inflamación. La modificación de este equilibrio celular puede conducir, en un principio, a la atrofia de la mucosa, pero a ésta le sigue un incremento de la actividad proliferativa (Cordon-Cardo y Prives, 1999), que puede dar origen a situaciones de metaplasia y cambios reversibles en la diferenciación celular. La inflamación, actuando directamente como un agente genotóxico, favorece la aparición de mutaciones y, al mismo tiempo, es capaz de romper el control celular, permitiendo la división celular con el DNA dañado, a la vez que frena la apoptosis (Griffiths *et al.*, 1997).

Esto podría ser una explicación para el hecho de que la EII se encuentre asociada con un incremento en la incidencia de cáncer de colon. Se estima que la prevalencia de cáncer colorrectal en pacientes de CU es de un 3,7% aproximadamente. El riesgo de cáncer colorrectal incrementa con la duración de la enfermedad. Así, existe una incidencia del 2% tras 10 años de transcurso de la enfermedad, del 9% tras 20 años y del 19% tras 30 años (Krok y Lichtenstein, 2004). El desarrollo de este tipo de cáncer es responsable de un tercio de las muertes asociadas a CU. En contraste, hay datos tanto a favor como en contra de la hipótesis de que la EC está asociada con el cáncer de colon. Sí se observan valores de incidencia de cáncer similares a los de CU cuando se aíslan los casos de EC colónica (Sharan y Schoen, 2002).

## **2.2. Tratamiento.**

El tratamiento de la EII tiene como objetivos principales promover la remisión del ataque agudo de la enfermedad y reducir la incidencia de recurrencias. Se emplean fármacos clásicos como aminosalicilatos, corticoides, inmunosupresores y antibióticos, así como nuevas terapias biológicas desarrolladas en los últimos años.

### **2.2.1. Fármacos antiinflamatorios**

#### **2.2.1.1. Aminosalicilatos.**

Los aminosalicilatos son fármacos que contienen en su estructura la molécula del ácido **5-aminosalicílico** (5-ASA) o **mesalazina**. El primer fármaco empleado fue la **sulfasalazina**, en la que se une, mediante un puente “azo”, una molécula de 5-ASA a otra de sulfapiridina, que actúa de molécula transportadora (asegurando la disponibilidad del 5-ASA en el colon y previniendo su absorción y metabolismo en el intestino delgado). Así, el 5-ASA es liberado en el colon gracias a las azobacterias,

que rompen este puente “azo” (Svart, 1942). La sulfasalazina presenta dos problemas: en primer lugar, que la molécula de sulfapiridina es la responsable de la mayoría de las reacciones adversas atribuidas a este fármaco y, en segundo lugar, que al liberarse en el colon no va a ser activa en la EC que se manifieste en intestino delgado. Esto ha hecho que se hayan desarrollado nuevas formas de transportar el 5-ASA (Beltrán *et al.*, 1997):

a) Formas de liberación controlada, en las que la molécula de 5-ASA se recubre de una resina acrílica que se disuelve en valores de pH superiores a 6 (eudragit-L) o a 7 (eudragit-S), similares a los que existen en el intestino delgado distal o en el colon. Existen también formas de liberación sostenida en las que microgránulos de 5-ASA con una membrana semipermeable de etilcelulosa liberan el compuesto de modo continuo en todo el intestino, de forma tiempo-dependiente sin relación con el pH luminal.

b) Dímero compuesto por dos moléculas de 5-ASA unidas por un enlace azo (olsalazina) que requieren de la reducción bacteriana para romperse y liberar el principio activo.

c) Administración del 5-ASA en forma tópica intrarrectal (enemas, supositorios, espumas o geles).

El mecanismo de acción de la mesalazina no está del todo definido, aunque diferentes estudios *in vitro* han demostrado su efecto modulador sobre la síntesis y liberación de leucotrienos (LTB<sub>4</sub>) y prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), sobre la producción de determinadas citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-2), y sobre la producción de radicales libres de oxígeno (Greenfield *et al.*, 1993). Son necesarias concentraciones elevadas del fármaco en la luz intestinal para poder ejercer su efecto terapéutico, por lo que son preferibles formas farmacéuticas que liberen localmente la 5-ASA en la mucosa.

Los aminosalicilatos están indicados en los brotes inflamatorios de intensidad leve, tanto en la EC como en la CU (Klotz, 2000; Stein y Hanauer, 1999) y en el mantenimiento de la remisión de la CU (Sutherland *et al.*, 2000). Su papel en el mantenimiento de la remisión de la EC es controvertido (Sutherland, 2000; Cammá *et al.*, 1997, Lochs *et al.* 2000).

#### **2.2.1.2. Corticoides.**

Los corticoides actúan a través de la inhibición de la transcripción de interleucinas, de la supresión del metabolismo del ácido araquidónico, y de la estimulación de la apoptosis de linfocitos de la lámina propia del intestino (Franchimont *et al.*, 2003).

Los corticoides, tales como **prednisona**, **prednisolona** o **metilprednisolona**, constituyen el tratamiento de elección de los brotes moderados y graves de la enfermedad y en los casos de falta de respuesta a los salicilatos (Hanauer y Sandbord, 2001). Sin embargo, en un 20-30% de los casos no hay respuesta (corticorretractariedad) y es necesario aplicar otros tratamientos (Ho *et al.*, 2006). Los corticoides, por su gran número de efectos secundarios, no constituyen un tratamiento adecuado para mantener la remisión de la enfermedad, pero en ocasiones no es posible suspenderlos (corticodependencia). De forma general, se debe evitar su administración en tratamientos prolongados, a favor de otras terapias con menos efectos tóxicos. Esto ha condicionado el desarrollo de corticoides de administración oral o rectal de actuación local, efectivos en la EII y a la vez con un menor número de reacciones adversas sistémicas.

La **budesonida**, corticoide modificado para alcanzar acción tópica intestinal y disminuir la biodisponibilidad sistémica, está indicada en la EC ileal o ileocecal, de intensidad leve o leve-moderada, siendo su actividad superior a la de los salicilatos

(Gomollón *et al.*, 1999). Sin embargo, no ha mostrado eficacia en el tratamiento de mantenimiento por períodos superiores a un año (Ferguson *et al.*, 1998). En la actualidad, se está evaluando el papel de la budesonida oral en el tratamiento de la CU, aunque ya se ha comprobado su eficacia en la CU activa (Kokman *et al.*, 2004).

La administración intravenosa de corticoides está justificada cuando los enfermos requieran hospitalización.

### **2.2.2. Inmunosupresores**

La justificación en la utilización desde hace varias décadas de estos fármacos reside en las múltiples alteraciones de tipo inmunológico que caracterizan a la EII. Las principales indicaciones son: corticodependencia y corticorrefractariedad, enfermedad fistulosa, enfermedad perianal, prevención de la recurrencia postquirúrgica en la EC, pouchitis y retraso del crecimiento en niños. Entre los inmunosupresores encontramos azatioprina (AZA), metotrexato y ciclosporina.

La **AZA** es metabolizada *in vivo* para dar 6-mercaptopurina (6-MP), la cual puede seguir dos vías metabólicas distintas: degradación en metabolitos inactivos o la generación de ácido tioinosínico, nucleótido derivado de la 6-tioguanina (Lennard, 2002). Este último se acumula intracelularmente y es considerado como el metabolito activo responsable del efecto citotóxico de estos fármacos, ya que inhibe la síntesis celular de purinas, las interconversiones de nucleótidos, la síntesis de ARN y ADN, así como la replicación cromosómica. Todo este conjunto de procesos hace que se inhiba la proliferación y activación de los linfocitos ante la respuesta inmune que tiene lugar en la EII.

Tanto la AZA como la 6-MP son eficaces en la inducción de la remisión y en el mantenimiento de la misma, tanto en CU como en EC (Pearson *et al.*, 1995;

George et al., 1996). La AZA debe mantenerse durante largos períodos de tiempo para mantener bajo control la enfermedad (Fraser et al., 2002). El efecto secundario más preocupante es la posibilidad de inducción de neoplasias a largo plazo.

El **metotrexato** se utiliza en el caso de intolerancia o falta de respuesta a la AZA o a la 6-MP y es eficaz, tanto en la EC activa, como en el mantenimiento de la remisión (Feagan et al. 1995, Feagan et al. 2000). Inhibe la síntesis de citocinas y eicosanoides, pero el mecanismo de acción no se conoce del todo (Fraser, 2003).

La **ciclosporina**, que inhibe de forma selectiva las células CD4<sup>+</sup> y la liberación de citocinas, se ha utilizado en los brotes corticorretractarios de CU (Lichtiger et al., 1994) y en la EC fistulizante (Present y Lichtiger, 1994).

### **2.2.3. Terapias biológicas.**

Dentro del término terapias biológicas se engloban diferentes actuaciones terapéuticas que tienen en común actuar en puntos aislados del proceso inflamatorio. Se incluyen en este grupo diferentes estrategias. Por un lado el bloqueo de la acción de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6 o IL-7, y por otro lado la interferencia en el reclutamiento de células inflamatorias mediante anticuerpos frente a moléculas de adhesión.

#### **2.2.3.1. Bloqueo de citocinas proinflamatorias.**

Dado el importante papel del TNF $\alpha$  en el desarrollo de la EII, esta citocina constituye una diana clave en el tratamiento de estos procesos crónicos. El **infiximab** es un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  quimérico (ratón-hombre). El **CDP571** y el **adalimumab** (o CDP870) son anticuerpos monoclonales anti-TNF $\alpha$  con mayor proporción humanizada. Los tres son útiles en la remisión de la EC activa (Targan et al., 1997; Sandborn et al., 2004; Schreiber et al., 2003) y el infiximab ha

demostrado ser eficaz en el mantenimiento de remisión a corto plazo (Hanauer et al., 2002). La principal limitación del infliximab la constituye el desarrollo de anticuerpos antiquméricos. Se espera que los otros dos tengan menos problemas en este aspecto al estar humanizados, pero se necesitan más estudios para confirmarlo.

El TNF $\alpha$  ejerce sus efectos proinflamatorios a través de su unión con dos receptores específicos transmembrana, p55 y p75. **Etanercept** es una proteína de fusión humana entre la porción Fc de una inmunoglobulina humana con dos receptores p75 solubles, y **onercept** es una forma recombinante humana del receptor p55 soluble. Ambos neutralizan la actividad biológica del TNF $\alpha$  por unión tanto a su forma soluble como a la anclada a membrana, y evitan la unión del TNF $\alpha$  a sus receptores nativos. Mientras que el etanercept no ha mostrado ser efectivo en la inducción de la remisión en pacientes con EC activa (Sandborn et al., 2001), en un estudio piloto se demostró una eficacia dosis-dependiente del onercept en pacientes con EC (Rutgeerts et al., 2003).

Análogamente, se están desarrollando anticuerpos frente a otras citocinas proinflamatorias, como por ejemplo el **MRA**, un anticuerpo monoclonal humanizado frente al receptor soluble de IL-6 (IL-6R). Se ha encontrado una elevada concentración de IL-6R en pacientes de EC (Reinecker et al., 1993), y el tratamiento con MRA ha sido testado en la EC con buenos resultados (Ito et al., 2004).

Igualmente, IL-12 e INF- $\gamma$  son citocinas claves en el desarrollo de la respuesta inmune Th1 (Lim y Hanauer, 2004). Tanto el **fontolizumab**, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-INF- $\gamma$  (Rutgeerts et al., 2002), como el **J695** (ABT-874) un anticuerpo monoclonal humano anti-IL-12 (Mannon et al., 2004), han mostrado ser efectivos en la EC activa.

Muchos son los agentes desarrollados para tratar de inhibir los procesos de activación y proliferación de los linfocitos. En este sentido, la terapia antiCD4 con el uso de anticuerpos monoclonales como **cM-T412**, **MAX.16H5**, y **BF-5**, ha inducido remisión en pacientes tanto con EC como con CU (Ardizzone y Porro, 2002). Con el objeto de inhibir la proliferación de células T se han desarrollado anticuerpos frente a IL2R, **daclizumab** o **basiliximab**, obteniendo buenos resultados en la CU (Van Assche et al. 2003; Creed et al., 2003).

### **2.2.3.2. Inhibición de moléculas de adhesión.**

El reclutamiento de células inflamatorias desde la circulación sistémica se considera una etapa crítica de la amplificación de la respuesta inflamatoria. El **natalizumab** es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado frente a  $\alpha$ 4-integrina, que inhibe, por tanto, la migración transendotelial. Este tratamiento ha demostrado ser eficaz en la inducción de la remisión, tanto en pacientes de EC (Gordon *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2003), como de CU (Gordon *et al.*, 2002).

### **2.2.4. Manipulación de la flora bacteriana.**

#### **2.2.4.1. Probióticos.**

Dada la importancia del equilibrio en la microbiota intestinal en el control de respuesta inmunológica local y sistémica, se puede justificar la utilización de bacterias en pacientes de EII, en lo que se conoce como probióticos. El término probiótico hace referencia a un “suplemento alimentario con microorganismos vivos que afecta beneficiosamente al hospedador mediante una mejora en el equilibrio de la microbiota intestinal” (Macfarlane y Cummings, 2002). Este tipo de tratamiento también ha demostrado la importancia de la composición de la flora presente en el lumen intestinal, ya que ciertos probióticos son capaces de modular el sistema

inmunitario, confiriendo al huésped un aumento de su resistencia frente a microorganismos patógenos (Borrueal, 2003).

De hecho, la terapia probiótica ha sido efectiva para la atenuación de la colitis experimental (Madsen *et al.*, 2001, O'Mahony *et al.*, 2001, Perán *et al.*, 2005), así como en el mantenimiento de la remisión de la pouchitis, EC y CU (Gionchetti *et al.*, 2000, 2003; Hart *et al.*, 2003).

#### **2.2.4.2. Antibióticos.**

El papel de los antibióticos parece más evidente en la EC que en la CU. El **metronidazol** ha mostrado ser útil como terapia primaria en tratamientos de pacientes con EC (Sutherland *et al.*, 1991), así como para evitar recurrencias del proceso inflamatorio tras resección intestinal (Rutgeerts *et al.*, 1995). El **ciprofloxacino** ha mostrado también su efectividad en la EC activa (Arnold *et al.* 2002), aunque de forma discreta en pacientes con CU (Turunen *et al.*, 1999).

A pesar del amplio abanico de posibilidades terapéuticas, aún no existe un tratamiento ideal para la EII, con un perfil adecuado de eficacia y seguridad, por lo que existe una demanda de nuevas estrategias terapéuticas eficaces y exentas de reacciones adversas. Por esto, profundizar en el papel de agentes con pocos efectos adversos puede ser de gran interés. En este sentido, se puede considerar el empleo de diferentes tipos de fibra dietética, que han demostrado en diferentes estudios una posible actividad en la EII, a la vez que se mostraron prácticamente exentos de toxicidad.

### **3. FIBRA DIETÉTICA.**

#### **3.1. Concepto de fibra dietética.**

La fibra dietética comprende una amplia variedad de materiales complejos y es, por tanto, difícil de conceptualizar. No existe una definición aceptada internacionalmente, pero varios autores han tratado de definirla desde mediados del siglo pasado. Hipsley en 1953 fue el primer científico que reflejó por escrito el término de fibra dietética, definiéndolo como “los constituyentes no digeribles que se encuentran en la pared de la célula vegetal”, haciendo sinónimo el término de fibra vegetal con el de fibra dietética (Hipsley, 1953).

Posteriormente Burkitt y Trowell adoptan un término más amplio y definen la fibra dietética como “el remanente de los componentes de la planta que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas intestinales humanas” (Burkitt y Trowell, 1975). Este concepto engloba a los componentes de la pared celular como celulosas, hemicelulosas y lignina, y a otros polisacáridos presentes en las plantas como las gomas, mucílagos, celulosas modificadas, oligosacáridos y pectinas, que son comestibles y resistentes a la digestión.

En esa época diversos estudios epidemiológicos encuentran una correlación entre el consumo de determinados alimentos no digeribles y la disminución de ciertas patologías, como el estreñimiento, la obesidad, la diabetes, la enfermedad coronaria e incluso determinados tipos de cáncer, proponiendo la conocida “hipótesis de la fibra dietética” (Kim, 2000). El motivo para incluir estos nuevos componentes de las plantas se basaba en las propiedades fisiológicas atribuidas a la fibra dietética, pero no necesariamente a su similitud química o a su situación en la pared celular.

En el año 2001, la *American Association of Cereal Chemist* (AACC) amplió aún más el concepto de fibra dietética: “La fibra dietética es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con completa o parcial fermentación en el intestino grueso. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina, y sustancias asociadas de la planta. Las fibras dietéticas promueven efectos beneficiosos fisiológicos como el laxante, atenúa los niveles del colesterol en sangre y atenúa la glucosa en sangre” (AACC Dietary Fiber Technical Committee, 2001).

### **3.2. Componentes de la Fibra Dietética.**

Los componentes de la fibra se pueden clasificar también por su estructura química. Por un lado, se pueden encontrar diferentes polisacáridos y oligosacáridos, y por otro lado, la lignina, que se debe considerar independientemente, dado su grado de complejidad.

#### **3.2.1. Polisacáridos.**

La **celulosa** es un polisacárido lineal formado por unidades de D-glucosa (hasta 10.000) unidos por un enlace  $\beta$ -1,4. Existen abundantes puentes de hidrógeno que se establecen intra e intercatenariamente, lo que conduce a una organización de las cadenas en miofibrillas y fibras, formando estructuras cristalinas muy estables (Cosgrove, 2005). Esta disposición estructural, junto a su composición química, explica las propiedades de la celulosa, destacando su carácter de insolubilidad en agua.

Las **hemicelulosas** se diferencian de la celulosa en el tamaño de la molécula (de 50 a 2000 residuos), en el tipo de sus monómeros, que en la celulosa es sólo glucosa, mientras en la hemicelulosa además de glucosa tiene otros tipos de azúcares,

y finalmente, en su estructura espacial, siendo en la celulosa lineal y en las hemicelulosas ramificada (Heredia *et al.*, 1995).

El **almidón resistente** se define como la suma de almidón y productos de su degradación que no han sido absorbidos en el intestino delgado de sujetos sanos (Topping y Clifton, 2001). El almidón resistente se comporta en el colon como un sustrato importante para la fermentación bacteriana, con lo que puede aportar los beneficios derivados de la misma.

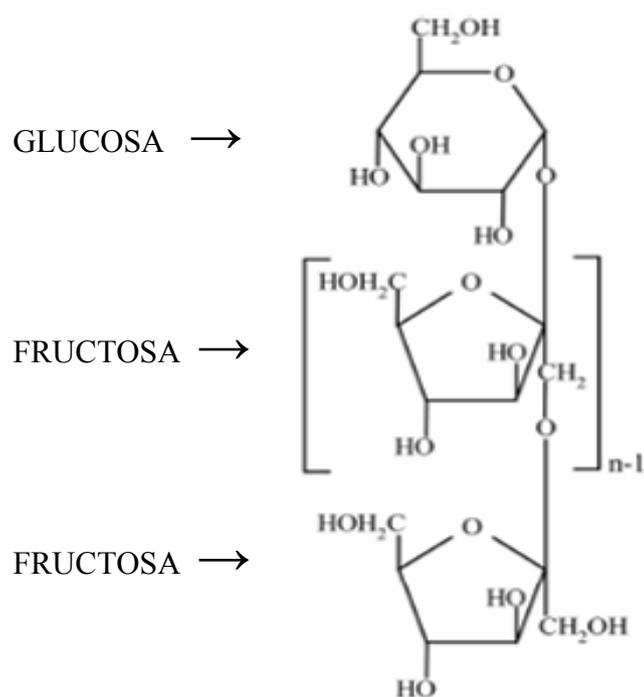
Las **peptinas** se pueden definir como un grupo de polímeros contruidos sobre restos de ácido  $\alpha$ -galacturónico unidos en 1-4 con arabinanas y galactanas (Ridley *et al.*, 2001). Otros polisacáridos como las **gomas** son complejos, siempre heterogéneos y ramificados, que contienen diversos azúcares neutros y ácidos urónicos, que pueden estar metilados o acetilados (Verbeken *et al.*, 2003). Por último, los **mucílagos** son polisacáridos complejos en cuya composición entran, al igual que en las gomas, azúcares como arabinosa y manosa junto con ácidos urónicos, especialmente galacturónico (Tharanathan, 2005).

### **3.2.2. Oligosacáridos.**

Los oligosacáridos son glúcidos en los que se unen de 2 a 10 monómeros. Uno de los tipos de fibra que más se han estudiado en los últimos años son los denominados **fructanos**, que son cadenas lineales de fructosa unidas entre sí mediante un enlace  $\beta$ -(1-2) (fig. 3) (Watzl *et al.*, 2005). Existen diferentes tipos de fructanos que han demostrado un efecto beneficioso para la salud (Swennen *et al.*, 2006), como los **fructooligosacáridos** (FOS), formados por 2-10 monómeros. Un caso especial es la **inulina**, cuyo grado de polimerización es de 2 a 60, por lo que no es estrictamente un oligosacárido, sino una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos, aunque se asocia frecuentemente a los FOS por su similitud química y su

comportamiento en el tubo digestivo. Tanto FOS como inulina llegan inalterados al intestino grueso, ya que el TGI no produce ningún enzima capaz de romper el enlace  $\beta$ -(1-2) (Watzl *et al.*, 2005).

Los FOS más importantes son kestosa (GF<sub>2</sub>), nistosa (GF<sub>3</sub>) y fructosilnistosa (GF<sub>4</sub>), constituidos por una molécula de glucosa y dos, tres o cuatro de fructosa, respectivamente.



**Figura 3.** Estructura química de fructanos (n = grado de polimerización).

A los FOS se les atribuye un importante efecto favorecedor del crecimiento de especies de *Bifidobacterium*, ya que pueden ser degradados por  $\beta$ -oxidasas que producen estas bacterias, y no lo son por bacterias patógenas como *Escherichia coli* o *Clostridium perfringens* (Watzl *et al.*, 2005)

Otros oligosacáridos con importancia en la industria alimentaria son los **galactosacáridos (GOS)**. En los GOS se une una molécula de lactosa, también en disposición lineal, a cuatro galactosas (Mateu, 2004). Al igual que los FOS y la inulina, también son fácilmente hidrolizados por la microbiota colónica.

Además de FOS y GOS, existen otros oligosacáridos que se ingieren con diferentes alimentos como la rafinosa, verbascosa y estaquiosa. Son cadenas lineales de fructosa, glucosa y 1, 2 ó 3 galactosas respectivamente. A ellos se les atribuye, entre otras cosas, la flatulencia que ocasionan las legumbres.

### **3.3.3. Lignina.**

Las ligninas son moléculas con elevado peso molecular, que resultan de la unión de varios alcoholes fenilpropílicos. Se encuentran en los cereales de grano entero. Es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogenicidad, por lo que no es posible describir una estructura definida (Boerjan *et al.*, 2003). Las ligninas son polímeros insolubles en ácidos y en álcalis fuertes, no se digieren ni se absorben y tampoco son atacados por la microbiota de colon (Lin y Lin, 1990). Esto hace que el proceso de lignificación afecte notablemente a la digestibilidad de la fibra.

### **3.3. Tipos de fibra dietética.**

Las fibras se suelen clasificar en función de dos de sus propiedades, que son responsables de la mayoría de sus beneficios fisiológicos: capacidad de fermentabilidad y comportamiento en contacto con el agua.

#### **3.3.1. Fibras fermentables y no fermentables**

La fibra llega al intestino grueso de forma inalterada. Aquí, al contrario de lo que ocurre con las enzimas digestivas humanas del intestino delgado, las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas de gran actividad metabólica, pueden digerir en mayor o menor medida la fibra dependiendo de su composición química y de su estructura.

El ciego es un receptáculo donde se almacenan las heces durante un cierto tiempo y donde las bacterias intestinales degradan la fibra consumida, así como los carbohidratos solubles malabsorbidos en el intestino delgado, como lactosa y fructosa, y los carbohidratos endógenos, como las mucinas y las glucoproteínas del intestino grueso. Estas reacciones son tan intensas que el valor del pH desciende bruscamente de 7-7,5 a 6-6,5 y la temperatura sube aproximadamente 0,7°C (Redondo, 2002-B). Las moléculas complejas son desdobladas a hexosas, pentosas y alcoholes que ya no pueden ser absorbidos en el intestino grueso, sirviendo de sustrato a otras colonias bacterianas que las degradan a hidrógeno, metano y dióxido de carbono, responsables de cierto grado de flatulencia, ácido láctico y, especialmente, AGCC (Cummings y Branch, 1986). En estos procesos se produce una gran cantidad de energía que es aprovechada por las bacterias que realizan esta fermentación.

Es importante tener en cuenta que la degradación total o parcial de la fibra en el colon no sólo depende del tipo de ésta, sino también de la velocidad con que se realiza el tránsito a lo largo del mismo; en el caso de un tránsito rápido, la cuota de degradación es más pequeña que si acontece de forma lenta (El Oufir *et al.*, 2000).

Todos los tipos de fibra a excepción de la lignina pueden ser fermentadas por las bacterias intestinales, aunque en general las solubles lo son en mayor cantidad que las insolubles. Así, las pectinas, gomas o mucílagos tienen un grado de

fermentabilidad del 80-95%, mientras que la celulosa lo tiene entre un 15-50% (Redondo.2002-B).

En función de la fermentación bacteriana, la fibra puede dividirse en:

- **Fibras no fermentables (<10%).** Entre éstas destacamos fibras insolubles como la lignina y algunas fibras solubles como la carragenina, la metilcelulosa y la carboximetilcelulosa.

- **Fibras parcialmente fermentables (10-70%),** donde podemos destacar las fibras insolubles ricas en celulosa. También pueden entrar en este grupo algunas fibras solubles como el agar y otras parcialmente solubles como las semillas de Plantago o el salvado de arroz.

- **Fibras fermentables (>70%).** Están constituidas por fibras solubles ricas en hemicelulosas (goma guar, glucomanano) o ricas en ácidos glucurónicos (pectinas o algunas gomas). También se incluyen en este grupo los fructanos.

### **3.3.2. Fibras solubles e insolubles**

El comportamiento de las distintas fibras en relación con el agua es muy diverso y depende de muchos factores (Mateu, 2004), entre los que podemos señalar la prevalencia de grupos hidroxilo y carboxilo, y la estructura tridimensional. Los grupos hidroxilo presentes en la fibra establecen puentes de hidrógeno con las moléculas de agua; los grupos carboxílicos, a través de interacciones iónicas más fuertes, se unen con iones metálicos y éstos a su vez con el agua. Esta unión además favorecerá la orientación de las moléculas de agua. En tercer lugar la presencia de la estructura tridimensional de los polímeros, lineal o ramificada, permite la acumulación de agua en la matriz de la fibra.

Debido al diferente comportamiento en relación con el agua, se habla de fibras solubles y fibras insolubles (tabla II), condicionando de forma importante sus efectos fisiológicos (Southgate *et al.*, 1978). Las fibras solubles en contacto con el agua forman un retículo donde ésta queda atrapada, originando soluciones de gran viscosidad. Son fibras con elevada capacidad para retener agua. Entre ellas podemos destacar las pectinas, algunas hemicelulosas, las gomas, los mucílagos y los polisacáridos procedentes de algas. La capacidad gelificante es la responsable de muchos de los efectos fisiológicos de la fibra, como la disminución de la glucemia postprandial y de los niveles plasmáticos de colesterol (Mateu, 2004).

<b>Tabla II.</b> Solubilidad y fermentabilidad de las fibras.			
	Principalmente solubles	Solubles+Insolubles	Principalmente insolubles
Fermentables (>70%)	Pectina Goma guar Goma arábica Tragacanto Fructanos		
Parcialmente fermentables (10-70%)	Agar <i>Plantago ovata</i> (cáscara)	Salvado de arroz <i>Plantago ovata</i> (semilla)	Salvado de trigo Celulosa
No fermentables (<10%)	Carragenina Karaya		Lignina

Las fibras insolubles, como la celulosa, diversas hemicelulosas y la lignina, se caracterizan por su escasa capacidad para formar soluciones viscosas. Estas fibras pueden retener agua, aunque esta capacidad es siempre menor que en el caso de las solubles.

Las características físicas pueden influir también en la capacidad de captar agua, así por ejemplo, es muy importante el tamaño de la partícula ingerida. El salvado de trigo finamente molido capta un 26% menos de agua que el no molido (Redondo, 2002-B)

Finalmente, es interesante resaltar que los procesos de fermentación en el intestino grueso pueden afectar a la capacidad de retención hídrica de los diferentes tipos de fibra. Así, las fibras que contienen componentes insolubles tales como la celulosa y hemicelulosa, con menor grado de retención acuosa inicial, tienden a tener un mayor efecto sobre la retención final de agua y por tanto, un mayor peso fecal que las solubles. La razón de este hecho, aparentemente paradójico, radica en que las fibras solubles que retienen más agua en los segmentos digestivos iniciales son fermentadas por la microbiota intestinal colónica, con lo que se produce más masa bacteriana que contribuye a la masa fecal, pero desaparece el agua que retenían. Por el contrario, la fibra insoluble es mucho menos atacable por la microbiota, contribuyendo decisivamente a los contenidos fecales por el residuo no digerido y el agua retenida, aunque en principio esta última era menor comparativamente con la que retenía la fibra soluble. En este sentido, el salvado de trigo, rico en celulosa y hemicelulosa no soluble, aumenta mucho el residuo no digerido, mientras que la fibra de frutas y verduras y otros polisacáridos solubles fermentan en gran proporción dando lugar a una menor masa fecal, aunque produzcan una gran masa bacteriana.

### **3.4. Fuentes de Fibra.**

La fibra es un nutriente básico, fundamental para regular el tránsito, la función intestinal y mantener el ecosistema de la flora bacteriana. Por este motivo es recomendable hacer una dieta equilibrada con un consumo adecuado de alimentos

ricos en fibra. La ingesta recomendada de fibra es 20-30 g/día (Redgwell y Fischer, 2005). La Food and Drug Administration (FDA) recomienda que una dieta equilibrada para una persona sana debe tener una proporción de fibra insoluble de 70-75% y de fibra soluble 25-30%. El consumo diario de fibra en España se sitúa en torno a 22 g, mientras que en países en vías de desarrollo llega a 60 g (García Peris, 2004).

Cada tipo de fibra se encuentra en alimentos diferentes. La celulosa es el compuesto más abundante de las paredes celulares de las plantas, de ahí su importancia cuantitativa en el conjunto de la fibra. En general, aportan cantidades muy importantes de celulosa las verduras, frutas, frutos secos y cereales. Una proporción mayoritaria del salvado de los cereales es celulosa.

Las hemicelulosas se encuentran asociadas a la celulosa como constituyentes de las paredes celulares. Este hecho es muy interesante, ya que ambas sustancias forman parte de la cubierta externa (lo que constituye fundamentalmente el salvado), y por tanto el aporte en fibra va a ser muy diferente en función del grado de extracción de la harina, cuando se trata de pan u otros derivados de cereales. De ahí la importancia de los alimentos integrales en cuanto al aporte diario de fibra.

Las pectinas incorporadas en los alimentos naturales son, junto a la celulosa y hemicelulosas, los tres componentes mayoritarios de la fibra alimentaria. El almidón se encuentra distribuido ampliamente en tubérculos, como la patata, en granos y semillas, en un gran número de frutos y en los rizomas de muchas plantas.

Los fructanos se encuentran en productos de origen vegetal como cebolla, alcachofa, tomate y remolacha. En la industria alimentaria se pueden obtener FOS a partir del fraccionamiento de inulina y también se sintetizan FOS de cadena corta a partir de la sacarosa por acción de la fructosil furanosidasa (Flickinger *et al.*, 2003).

Los GOS se encuentran presentes en la leche de vaca y se obtienen industrialmente a partir de la lactosa mediante una transgalactosilación con una  $\beta$ -D-galactosidasa.

Algunos productos ricos en fibra han demostrado tener propiedades terapéuticas, como es el caso de las **semillas** y de las **cutículas de *Plantago ovata***. Las cutículas de *Plantago ovata* contienen fibras solubles e insolubles en una relación aproximada de 70:30, es decir, bastante más solubles que insolubles. En las semillas, por el contrario, la relación es de 20:80, es decir, más cantidad de insolubles que solubles, en la misma proporción que recomienda la FDA. Las semillas de *Plantago ovata* son, por tanto, una fuente de fibra ideal que cumple con la recomendación citada (Redondo, 2002-A).

La **malta agotada** (MA) es un alimento que se obtiene de la capa de aleurona y la fracción del escutelo de la cebada germinada. Contiene gran cantidad de fibra dietética insoluble (34%) y de proteína rica en glutamina (46%) (Kanauchi *et al.*, 1999). El principal componente de la fibra de la MA es hemicelulosa, que adopta una estructura especial que permite que la glutamina no sea atacada por los enzimas digestivos ni absorbida hasta llegar al colon, donde la hemicelulosa es fermentada y la glutamina liberada al lumen. Esto es importante porque el efecto beneficioso que ejerce la MA se le atribuye, en parte, a esta glutamina (Kanauchi *et al.*, 2001-B).

El **salvado de arroz** es un subproducto obtenido en el proceso del pulido para la obtención de arroz blanco para consumo humano. Está constituido por parte de la almendra harinosa, la capa de aleurona, el germen y la cascarilla. Tiene una gran cantidad de fibra en una proporción soluble/insoluble 1:7. No presenta una proporción tan adecuada como la fibra presente en las semillas de *Plantago ovata*, pero tiene la ventaja con respecto a ésta que el salvado de arroz es mucho más

económico. Esto se debe a que es un desecho industrial, ya que el arroz se comercializa mayoritariamente como arroz refinado (Reddy y Yeng, 2006). Existen diferentes estudios que han mostrado los efectos beneficiosos del salvado de arroz como laxante y para reducir los niveles plasmáticos de colesterol (Deis, 1997).

### **3.5. Funciones de la fibra.**

Se han descrito numerosas funciones beneficiosas para la fibra, como en el control de la obesidad, el metabolismo lipídico o el glucídico (Sastre, 2003). Nos vamos a centrar en aquellas que pueden contribuir a su aplicación en la EII.

#### **3.5.1. Actividad prebiótica.**

Se define prebiótico como “un ingrediente no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una o un limitado número de bacterias en el colon” (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). En este sentido, los criterios para definir un prebiótico serán: resistencia a la digestión en intestino delgado, hidrólisis y fermentación por la flora colónica, y estimulación selectiva del crecimiento de bacterias en el colon. Los prebióticos pueden tener diferentes actividades como antiinflamatorias, anticarcinogénicas, antiosteoporóticas, antimicrobianas, hipolipidémicas o moduladoras de la glucemia (Swennen *et al.*, 2006).

El efecto prebiótico de un carbohidrato suele valorarse en función de su capacidad de estimular la proliferación de bacterias “saludables” o deseables (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) en detrimento de las no deseables (*Bacteroides*, *Clostridium*, *E. coli*). Las bifidobacterias son bacterias presentes en gran número en la población bacteriana intestinal del adulto. Este grupo de bacterias ha mostrado efectos beneficiosos, tales como la síntesis de vitamina B, la inhibición del

crecimiento de gérmenes patógenos, disminución del pH intestinal, disminución del colesterol, protección de infecciones intestinales, estimulación de la función intestinal y mejora de la respuesta inmune (Rastall, 2004). Algunas bifidobacterias pueden disminuir la concentración de amonio. Los lactobacilos también presentan efectos saludables, como inhibición de patógenos, función antibiótica, disminución del pH intestinal y prevención del sobrecrecimiento bacteriano por *Candida*, *Pseudomonas* y estafilococos durante el tratamiento antibiótico.

No todos los tipos de fibra tienen actividad prebiótica. De hecho, parece que las bacterias o probióticos prefieren metabolizar los carbohidratos de tamaño pequeño (oligosacáridos) que los de tamaño mayor (polisacáridos) (Cummings y Branch, 1986). Existen diferentes carbohidratos con probada eficacia prebiótica, entre los que se incluyen los FOS, la inulina, los GOS y la MA (Rastall y Maitin, 2002).

### **3.5.2. Producción colónica de AGCC.**

El mejor conocimiento de la fisiología intestinal ha permitido atribuir a los AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato, un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis colónica. Estos AGCC son producidos en el intestino grueso por fermentación bacteriana anaeróbica de carbohidratos y polisacáridos procedentes de la dieta no digeridos en segmentos superiores del intestino. Se producen AGCC en el colon por fermentación microbiana en una proporción molar aproximada de 65:25:15 (García-Peris, 2005) y son transferidos rápidamente al torrente sanguíneo. La infusión colónica de AGCC resultó en una mayor proliferación celular en segmentos intestinales distantes (Kripke *et al.*, 1989; Ichikawa *et al.*, 2002), lo cual sugiere que la producción de AGCC en el colon induce cambios fisiológicos a través del tracto intestinal.

La absorción de estos compuestos en el ciego y en el colon es muy eficiente y sólo se excreta el 5-10 % con las heces (Ruppin *et al.*, 1980). Los AGCC atraviesan rápidamente la mucosa colónica mediante un cotransporte con sodio y potasio, que arrastran además agua de la luz intestinal. Esto favorece la excreción de bicarbonato, para contrarrestar la diferencia de cargas (Bowling *et al.*, 1993).

De estos AGCC, el butirato se considera la principal fuente de energía de los colonocitos (Mortensen y Clausen, 1996). Lo que puede tener claras repercusiones en la etiología de patologías como la EII. De hecho, se ha propuesto que existe una relación entre la EII y una disminución en la producción y/o metabolismo de los AGCC. En este sentido, estudios previos han encontrado menores concentraciones de AGCC en el lumen colónico de pacientes de CU que las que se producen en sujetos normales (Vernia *et al.*, 1988), al igual que en el modelo de colitis idiopática en monos algodón-top (Stonerook *et al.*, 1996).

Un estudio ha detectado también un defecto en la metabolización del butirato (Den Hond *et al.*, 1998) en pacientes de CU. Se observó una menor oxidación colónica del butirato cuando la enfermedad se encuentra activa, mientras que la remisión se asociaba con una oxidación normal. Esto último sugiere que la mucosa no tiene alterada intrínsecamente la oxidación de butirato, y por lo tanto no es un defecto primario en la CU.

Diferentes estudios han revelado que, además de una mayor producción de AGCC, la suplementación con fibra dietética puede promover el uso de butirato por parte de las células epiteliales colónicas (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002, Jacobash *et al.*, 1999). Algo que se ha descrito tanto en la colitis experimental (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002), como en la EII humana (Roedinger, 1980, Den Hond *et al.*, 1998).

Por último, se ha observado que existe un cambio en el metabolismo de los colonocitos. La producción anaeróbica de adenosina trifosfato (ATP) mediante glicolisis, que caracteriza a la inflamación intestinal, se convierte en una producción aeróbica de ATP tras la oxidación del butirato (Jacobash *et al.*, 1999). La restauración de la función metabólica en estas células intestinales acelera la regeneración del tejido colónico inflamado en comparación con los animales no tratados, y preserva la integridad de la mucosa colónica. Esto es necesario por ser un punto clave para controlar la respuesta inmune exacerbada que caracteriza el proceso inflamatorio intestinal (MacDermott. 1996).

### **3.5.3. Actividad frente al cáncer de colon.**

Son muchos los estudios, tanto epidemiológicos como intervencionales, que relacionan la aparición del cáncer de colon y el consumo de fibra, aunque los resultados que han obtenido resultan contradictorios. En el año 2000 dos estudios controlados encontraron que la fibra tenía poco o ningún beneficio en la prevención de recurrencias de formación de adenoma (Schatzkin *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2000). Dos artículos posteriores sí que demuestran un papel protector de la fibra en adenomas colónicos distales y en cáncer colorrectal (Peters *et al.*, 2003; Bingham *et al.*, 2003). Los primeros estudios intervecionales que no muestran beneficio eran de mucho menor tamaño muestral y una menor duración del seguimiento. Teniendo en cuenta que la suplementación de fibra en esos primeros estudios no era muy alta (10g/día) y que el estudio puede encontrarse sesgado al tomarse pacientes con antecedentes de adenoma, tal vez sean necesarios otros estudios controlados para aportar más luz al tema.

Se han propuesto diferentes mecanismos por los que la fibra puede proteger del cáncer de colon: a) incrementa el volumen fecal y, por tanto, diluye los

carcinógenos y procarcinógenos fecales. b) disminuye el tiempo de tránsito intestinal y se reduce así el tiempo de exposición a diversos carcinógenos en el colon. c) la fibra incrementa la excreción fecal de ácidos biliares, a los que se le asocia una toxicidad carcinógena. d) la fermentación colónica de la fibra disminuye el pH en la luz colónica, pudiendo frenar el desarrollo del tumor, a la vez que los AGCC actúan en el metabolismo de los colonocitos impidiendo el desarrollo tumoral. (Lim, 2005).

El butírate es el AGCC que más se ha implicado en estos procesos. Presenta diferentes actividades como reducir la proliferación celular e inducir diferenciación y apoptosis (Boffa *et al.*, 1992, Hague y Paraskeva, 1995). Dichos efectos de proliferación, diferenciación y apoptosis son de gran importancia y, a menudo son utilizados para determinar la progresión del cáncer colorrectal (Lim, 2005).

#### **4. FIBRA EN LA EII.**

Teniendo en cuenta las características de la fibra, especialmente su capacidad de producir AGCC y de modular la flora en el colon, se encuentra plenamente justificado su utilización en el tratamiento de la EII. Por esto, diferentes trabajos en humanos, en animales y en líneas celulares han evaluado su actividad antiinflamatoria intestinal.

##### **4.1. Estudios en humanos.**

El primer trabajo sobre fibra dietética como una potencial opción terapéutica en el tratamiento de la EII se llevó a cabo a finales de la década de los 70, en el que

se evaluó el impacto de la suplementación dietética de salvado de avena en el mantenimiento de la remisión en pacientes con CU (Davies y Rhodes, 1978, tabla III). Desafortunadamente, en este estudio esta fibra no incrementa el tiempo de remisión.

En 1991 un estudio con cáscara de *Plantago ovata*, en pacientes de CU (Hallert *et al.*, 1991) tampoco logró prolongar el tiempo de remisión, aunque sí se observó una normalización del tránsito intestinal. En cambio, las semillas de esta planta sí mostraron eficacia para mantener la remisión en esos pacientes (Fernández-Bañares *et al.*, 1999), asociándose con mayores concentraciones de butirato en la porción distal del colon. Estas diferencias se atribuyen a que la cáscara de *Plantago ovata* se compone principalmente de fibra soluble y fermentable, mientras que las semillas se componen tanto de fibra soluble como insoluble. Así cuando se usan las semillas de *Plantago ovata* se producirían AGCC a lo largo de todo el colon, al ser fermentadas lentamente, mientras que la fibra de la cáscara fermentaría sólo en el colon ascendente, con lo que no serían capaces de liberar AGCC en las zonas distales del intestino grueso.

El efecto beneficioso del incremento de butirato también ha sido demostrado en otros estudios, por ejemplo con salvado de avena en pacientes con CU en remisión (Hallert *et al.*, 2003). En este trabajo, a diferencia del de Davies y Rhodes, sí se obtienen resultados positivos. Otra estrategia diferente para restaurar de los niveles luminales de AGCC es administrarlos directamente en enemas intrarectales (Patz *et al.*, 1996, Steihart *et al.*, 1994), aunque en estos estudios se han observado resultados dispares. Mientras que algunos han demostrado un efecto beneficioso, otros han descrito la falta de efectividad del tratamiento con enemas de AGCC (o enemas de butirato sólo) (Breuer *et al.*, 1997, Scheppach, 1996).

**Tabla III.** Estudios de la actividad de diferentes tipos de fibra en enfermos con EII.

Fibra	Autores	Tipo de EII	Año
Salvado de avena	Davies y Rhodes	CU	1978
<i>Plantago ovata</i> (cáscara)	Hallert <i>et al.</i>	CU	1991
Malta agotada	Mitsuyama <i>et al.</i>	CU	1998
<i>Plantago ovata</i> (semillas)	Fernández-Bañares <i>et al.</i>	CU	1999
Malta agotada	Kanauchi <i>et al.</i>	CU	2001
Salvado de avena	Hallert <i>et al.</i>	CU	2003
Malta agotada	Hanai <i>et al.</i>	CU	2004
Fructooligosacáridos	Lindsay <i>et al.</i>	EC	2006

Desde 1998, varios estudios han documentado los efectos beneficiosos de la MA en la CU humana (Mitsuyama *et al.*, 1998; Kanauchi *et al.*, 2001, 2002, 2003A; Hanai *et al.*, 2004). El principal componente de la fibra de la MA es hemicelulosa, la cual ha demostrado ser utilizada eficientemente por las bacterias colónicas, promoviendo así el incremento de la producción de AGCC, en la luz colónica y estimulando el crecimiento de bifidobacterias (Kanauchi *et al.*, 2003B). Así, la administración de MA a pacientes con CU leve o moderadamente activa tuvo como resultado un descenso significativo del índice de actividad clínica de la enfermedad (Kanauchi *et al.*, 2002, 2003A), a la vez que en otro ensayo se obtuvo una menor proporción de recurrencias en pacientes de CU, gracias a la suplementación con MA (Hanai *et al.*, 2004). Esto indica que el papel prebiótico de la fibra dietética puede ser un apoyo adicional a su efecto beneficioso en la EII humana.

En la EC activa la capacidad prebiótica de la fibra también puede tener un papel beneficioso. En este sentido, el tratamiento con FOS obtuvo una disminución en el índice de la enfermedad, a la vez que un importante incremento en la concentración de bifidobacterias fecales (Lindsay *et al.*, 2006).

#### 4.2. Estudios en animales.

Los diferentes estudios realizados en modelos experimentales de colitis han proporcionado una valiosa información sobre los mecanismos implicados en el efecto antiinflamatorio intestinal de la fibra, apoyando su potencial papel en el tratamiento de la EII humana (tabla IV). Para estudiar la fisiopatología y posibles tratamientos de la EII se han empleado diferentes modelos de colitis en animales, como las producidas por administración de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) intracolónicamente (Morris *et al.*, 1989) o por sulfato de dextrano (DSS) en el agua de bebida (Cooper *et al.*, 1993); o la desarrollada espontáneamente en ratas transgénicas HLA-B27 (Hammer *et al.*, 1990). Estos tres modelos experimentales han sido ampliamente utilizados y han aportado un gran avance en el estudio, tanto de la enfermedad, como de su tratamiento (Elson *et al.*, 1995).

**Tabla IV.** Estudios de la actividad de diferentes tipos de fibra en modelos de colitis en rata.

Fibra	Autores	Modelo de colitis	Año
Almidón resistente	Jacobash <i>et al.</i>	TNBS	1999
Malta agotada	Kanauchi <i>et al.</i>	HLA-B27	1999
Inulina	Videla <i>et al.</i>	DSS	2001
Malta agotada	Kanauchi <i>et al.</i>	DSS	2001
<i>Plantago ovata</i> (semillas)	Rodríguez-Cabezas <i>et al.</i>	TNBS	2002
Galactooligosacáridos	Holma <i>et al.</i>	TNBS	2002
Fructooligosacáridos	Cherbut <i>et al.</i>	TNBS	2003
<i>Plantago ovata</i> (semillas)	Rodríguez-Cabezas <i>et al.</i>	HLA-B27	2003
Almidón resistente	Moreau <i>et al.</i>	DSS	2003
Fructooligosacáridos	Moreau <i>et al.</i>	DSS	2003
Almidón resistente	Morita <i>et al.</i>	TNBS	2004
Mezcla de Fructanos	Hoentjen <i>et al.</i>	HLA-B27	2005

En este sentido, se ha publicado que la suplementación dietética a ratas de semillas de *Plantago ovata* resultó en una mejoría del estado inflamatorio en dos modelos experimentales de colitis: en TNBS (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002) y en ratas transgénicas HLA-B27 (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2003).

También ha demostrado ser efectiva la suplementación dietética con MA a ratas transgénicas HLA-B27 (Kanauchi *et al.*, 1999) y en la colitis inducida por DSS (Kanauchi *et al.*, 2001A, 2003B). Igualmente, el almidón resistente presentó actividad en los modelos de DSS (Moreau *et al.*, 2003, 2004) y de TNBS (Jacobash *et al.*, 1999, Morita *et al.*, 2004).

Se han realizado varios ensayos con oligosacáridos e inulina. En el modelo de TNBS, el tratamiento con FOS (Cherbut *et al.*, 2003) y GOS (Holma *et al.*, 2002) ha demostrado ser efectivo, mientras que la administración de inulina lo fue en el modelo de DSS (Videla *et al.*, 2001). En estos estudios se asoció el efecto a una modulación de la microbiota colónica. En cambio, no se produjo recuperación de la mucosa tras administrar FOS a ratas con colitis inducida por DSS (Moreau *et al.*, 2003). En este aspecto, sí se observó actividad antiinflamatoria cuando se ensayó una mezcla de FOS e inulina en ratas HLA-B27 (Hoentjen *et al.*, 2005).

Una característica común en todos estos estudios experimentales con fibra dietética fue que el efecto terapéutico se asoció con una mayor producción de AGCC en la luz colónica. Lo cual contrarresta el déficit energético que se produce en el colonocito como consecuencia del proceso inflamatorio intestinal, de manera similar a lo publicado en la EII humana (Vernia *et al.*, 1988, Den Hond *et al.*, 1998).

La ingesta de fibra dietética puede ejercer otras acciones diferentes que también pueden contribuir al efecto antiinflamatorio intestinal. Diferentes estudios *in vivo* en modelos experimentales de colitis han publicado la capacidad de la fibra dietética de atenuar la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo interleucina-6 (IL-6), IL-8, y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002, 2003, Kanauchi *et al.*, 1999, 2001-A, 2003-B, Videla *et al.*, 2001).

### 4.3. Estudios *in vitro* de AGCC.

En las últimas décadas se han realizado diversos intentos para aislar células de la mucosa intestinal y así, poder abordar estudios *in vitro* (Pinkus, 1975) pero en general no han tenido éxito dada la escasa viabilidad de las células aisladas. Por otra parte, los intentos de establecer líneas celulares basadas en enterocitos tampoco han tenido éxito (Raul *et al.*, 1978; Quraoni y Wands, 1979). Por este motivo, se ha recurrido al empleo de distintas líneas celulares procedentes de adenocarcinoma de colon humano como modelos *in vitro* para el estudio de procesos fisiológicos y patológicos del epitelio intestinal. Hoy en día, existen diferentes líneas celulares, como HT-29, Caco-2 y T<sub>84</sub> (Rousset, 1986; Sambuy *et al.*, 2005; McCay, 2005).

En este sentido, existen diferentes estudios que ponen de manifiesto el papel antiproliferativo, antiinflamatorio, anticancerígeno de los AGCC, productos de la fermentación de la fibra, en distintos modelos de líneas epiteliales. Se ha demostrado el papel antiproliferativo y apoptótico del butirato en células Caco-2 (Litvak *et al.*, 1998) y en HT-29 (Hinnebusch *et al.*, 2002).

Sobre las células del sistema inmune, el butirato también ejerce efectos antiinflamatorios, inhibiendo la producción de TNF $\alpha$  en la línea celular monocítica humana THP-1 (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2003), en células mononucleares de la lámina propia obtenidas de biopsias intestinales humanas (Segain *et al.*, 2000). Igualmente, inhibió los efectos biológicos de esta citocina en diferentes líneas celulares epiteliales intestinales, como HT-29, T<sub>84</sub> y Caco-2 (Kovaricova *et al.*, 2000; Andoh *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha demostrado la capacidad del butirato para inhibir la expresión de moléculas de adhesión, como VCAM-1 e ICAM-1, en células

endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) activadas con TNF $\alpha$ . (Zapolska-Downar *et al.*, 2004).

Por último, se ha analizado el posible mecanismo de acción que ejerce el butirato en estos tipos celulares, mostrando que su efecto probablemente se produzca mediante la inhibición de la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Andoh *et al.*, 1999, Inan *et al.*, 2000). Los estudios *in vitro* realizados en células de adenocarcinoma humano (SW480, SW620 y HeLa229) indican que el tratamiento con butirato es capaz de inhibir la actividad del NF- $\kappa$ B estimulado por TNF $\alpha$  (Luhrs *et al.*, 2001-B). Su efecto inhibitor en la activación de NF- $\kappa$ B podría deberse a su capacidad de bloquear la actividad de la enzima histona desacetilasa. Este mecanismo también ha sido descrito para el propionato (Huang *et al.*, 1997, Hinnebusch *et al.*, 2002). De hecho, se demostró que el tratamiento de pacientes de CU con enemas de butirato inhibió la activación de NF- $\kappa$ B en los macrófagos de la lámina media (Luhrs *et al.*, 2002).

## **OBJETIVOS**

---



## **objetivos**

La EII es una enfermedad cuya incidencia es mayor en los países del norte de Europa que en los del sur (cita). Esta mayor incidencia se ha postulado como una consecuencia de la menor ingesta de fibra y otros nutrientes por parte de los habitantes de estos países nórdicos.

A pesar de esto, siguen sin existir fármacos exentos de efectos adversos, por lo que una posible estrategia sería el uso de maniobras de tipo dietético que colaboren en una mayor eficacia del tratamiento.

Por otra parte, diversos investigadores proponen que la EII se puede deber a un déficit en la mucosa intestinal de AGCC, en especial de butirato, debido a que tiene un importante papel en la homeostasis colónica. El butirato se ha propuesto que juega un papel crucial en la fisiología de la mucosa colónica ya que es la principal fuente de energía de las células epiteliales. Esto ha hecho que se plantee la hipótesis de que la falta de butirato pudiera ser responsable de la pérdida de función barrera del epitelio que favorece la instauración de la EII en pacientes predispuestos. Sin embargo, las terapias basadas en la administración de butirato presentan resultados contradictorios, debido fundamentalmente a la dificultad de administración y la baja persistencia de este AGCC en contacto con la mucosa.

En esta tesis doctoral, los objetivos que pretendemos abordar son:

- a) Estudiar el papel de los AGCC en la homeostasis del epitelio intestinal colónico, considerando células diferenciadas y no diferenciadas.
- b) Estudiar el efecto antiinflamatorio intestinal de fibras con diferente grado de fermentabilidad y producción de AGCC.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 1. Reactivos y composición de las dietas.

Todos los reactivos, salvo los que se indican en el texto, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid).

En este estudio se utilizaron tres dietas diferentes, que se elaboraron a partir de una dieta estándar (tabla V), con un 5% de fibra en los tres casos. En la dieta Control se añadieron 5g de celulosa por cada 95g de la dieta estándar, mientras que en las otras dos se incorporaron fructooligosacáridos (dieta FOS) o salvado de arroz pulverizado (dieta S) en la misma proporción.

<b>Tabla V.</b> Composición de las tres dietas utilizadas en el estudio.			
	<b>Control (g/kg)</b>	<b>FOS (g/kg)</b>	<b>S (g/kg)</b>
<b>Proteínas y aminoácidos</b>			
caseína (Arla foods)	258	258	258
L-metionina (Sigma)	3	3	3
<b>Lípidos</b>			
Aceite de girasol (Koipe)	50	50	50
<b>Vitaminas/Minerales</b>			
Mezcla vitaminas/minerales (Panlab)	10	10	10
<b>Carbohidratos</b>			
Almidón de maíz (Cerestar)	579	579	579
Sacarosa (Azucarera Ebro)	50	50	50
Celulosa (Sigma)	<b>50</b>	0	0
FOS (PULEVA biotech)	0	<b>50</b>	0
Salvado de arroz (PULEVA biotech)	0	0	<b>50</b>

Para la preparación de la dieta FOS se utilizaron fructooligosacáridos (FOS) de cadena corta (FOS-cc) obtenidos de PULEVA biotech (Granada, España) por un método anteriormente descrito (Bañuelos *et al.*, 1998). La composición final corresponde a un mezcla de: 0,85% glucosa (G), 0,60% fructosa (F), 3,80% sacarosa (GF), 50,00% kestosa (GF<sub>2</sub>), 35,00% nistosa (GF<sub>3</sub>) y 10,00% fructosil-nistosa (GF<sub>4</sub>).

Tras su recepción se pulverizaron y tamizaron las tres dietas con un tamiz de 840 µm de luz de malla. Después se almacenaron a 4° C hasta su utilización.

## **2. Ensayos *in vivo*. Modelo de colitis experimental inducida por TNBS.**

### **2.1. Animales de experimentación.**

Los estudios se realizaron de acuerdo con las directivas de la *Convención para la protección de los animales vertebrados usados en experimentación y con otros fines científicos* establecidas por la Unión Europea (85/ETS123; 86/609/EEC).

Los animales utilizados en este estudio fueron 40 ratas albinas hembras de la cepa Wistar de 180-200 g de peso, suministradas por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los animales se mantuvieron en el estabulario del laboratorio desde al menos 5 días antes de iniciar los experimentos, a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas se alojaron individualmente en jaulas y fueron alimentadas con las dietas antes comentadas y agua corriente *ad libitum*.

## **2.2. Evaluación de la actividad prebiótica de las dietas.**

Se distribuyeron aleatoriamente 30 ratas en tres grupos, a los que se le administró durante 4 semanas una dieta con diferentes fuentes de fibra:

- Grupo **Control** (n=10): Los animales fueron alimentados con dieta al 5% de celulosa.
- Grupo **FOS** (n=10): Los animales fueron alimentados con una dieta suplementada con FOS al 5%.
- Grupo **S** (n=10): Los animales fueron alimentados con una dieta suplementada con un 5% de salvado de arroz.

Tras este periodo se sacrificó a los animales, y se les extrajeron los contenidos colónicos para cuantificar la producción de AGCC y analizar la microbiota fecal (ver apartados 2.4.5 y 2.4.6).

## **2.3. Evaluación del efecto antinflamatorio intestinal de las dietas en el modelo del TNBS.**

### **2.3.1. Inducción de la colitis experimental.**

La colitis se indujo utilizando el método descrito por Morris *et al.* (1989), con algunas modificaciones introducidas por nuestro grupo (Gálvez *et al.*, 2000). Los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno de 24 horas, después del cual fueron anestesiados ligeramente con halotano y se procedió a la administración rectal de 0,25 ml de una solución de 10 mg de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en etanol al 50 % (v/v). La instilación se realizó introduciendo un catéter de teflón (2 mm de grosor) 8 cm desde el ano, manteniendo a los animales en posición supina hasta la recuperación de la anestesia. La solución de TNBS se preparó a partir de un

liofilizado de la solución comercial de origen consistente en una solución acuosa al 5 % p/v.

### **2.3.2. Diseño experimental.**

Los animales se distribuyeron de modo aleatorio en cuatro grupos, de los cuales tres fueron sometidos a inflamación intestinal. Se les administraron las diferentes dietas durante 5 semanas. En la 4ª semana se les indujo la colitis experimental:

- Grupo **Blanco** (n=10): A los animales se les administró por vía rectal 0,25 ml de solución salina isotónica de NaCl (0,9 %), siendo alimentados con una dieta con el 5% de celulosa.
- Grupo **Control-TNBS** (n=10): Las ratas fueron alimentadas con dieta al 5% de celulosa. En la cuarta semana se les indujo la colitis con TNBS.
- Grupo **FOS-TNBS** (n=10): Las ratas fueron alimentadas con una dieta suplementada con FOS. En la cuarta semana se les indujo la colitis con TNBS.
- Grupo **S-TNBS** (n=10): Se mantuvo a las ratas con una dieta en la que la fuente de fibra era el salvado de arroz. En la cuarta semana se les indujo la colitis con TNBS.

Durante el desarrollo de estas experiencias se controló diariamente el peso y el consumo de comida de los animales, así como la aparición de diarrea por visualización de restos perianales (Bell *et al.*, 1995) una vez inducida la colitis. Todos los animales fueron sacrificados a los siete días de la administración del agente inflamatorio intestinal.

### 2.3.3. Valoración del proceso inflamatorio intestinal.

Tras el sacrificio de los animales por dislocación cervical se les extrajo el colon en su totalidad, observándose la existencia o no de adhesiones entre el intestino grueso y los órganos adyacentes. Se tomaron muestras de heces de colon y ciego, que fueron pesadas y procesadas para las determinaciones posteriores de AGCC (ver apartado 2.3.3.6) y para el análisis de la flora bacteriana fecal (ver apartado 2.3.3.5). Estas muestras se mantuvieron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día en que se realizaron estas determinaciones. Seguidamente se procedió a la limpieza de los distintos segmentos intestinales, retirando los restos de grasa y las adhesiones mesentéricas, sobre una placa petri con hielo.

El colon se lavó con solución salina isotónica (NaCl 0,9%) y se determinó su peso, así como su longitud bajo una tensión constante de 2 g. Tras abrirlo longitudinalmente, un observador ajeno al desarrollo del experimento valoró el daño macroscópico de acuerdo con una escala, según el criterio descrito por Bell (tabla VI), poniéndose de manifiesto la presencia o no de las distintas características del proceso inflamatorio (Bell *et al.*, 1995).

Por último, el colon se dividió en cuatro fragmentos longitudinales que, a excepción de uno, fueron congelados inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la realización posterior de las determinaciones bioquímicas (ver apartados siguientes). El segmento destinado a la determinación de glutatión total, se congeló en 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) (Fluka, Madrid) al 5 % (p/v), con objeto de inhibir su degradación por la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (Anderson, 1985). El fragmento no congelado fue procesado en el momento de su obtención para la determinación de la producción de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Todas las determinaciones se realizaron en las dos semanas siguientes al sacrificio de los animales.

**Tabla VI.** Criterio de asignación del índice de daño macroscópico en la colitis inducida por TNBS (Bell *et al.*, 1995). A efectos de valoración histológica, se considera que el tejido está inflamado cuando presenta hiperemia y engrosamiento en la pared.

0 puntos	Colon normal
1 punto	Hiperemia localizada, sin úlceras
2 puntos	Ulceración sin hiperemia ni engrosamiento en la pared intestinal
3 puntos	Ulceración con un punto de inflamación
4 puntos	Dos o más sitios de ulceración e inflamación
5 puntos	Zonas grandes de daño, inflamación y ulceración con una extensión mayor de 1 cm
6-10 puntos	Zonas grandes de daño tisular con una extensión mayor de 2 cm, añadiéndose 1 punto (hasta 10) por cada cm adicional de extensión

En un estudio paralelo, los contenidos colónicos se homogeneizaron inmediatamente tras su obtención en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 150 mM (100 mg/ml, pH=7,8) en atmósfera inerte y en una proporción 1:5 (p/v). Posteriormente fueron centrifugados a 10000 G durante 15 minutos a 4°C y por último se filtraron a través de un filtro de 22 µm de diámetro de poro. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para estudios *in vitro* de proliferación celular en una línea celular de epitelio intestinal a las diluciones indicadas (ver apartado 3.3).

#### **2.3.3.1. Determinación de la actividad mieloperoxidasa colónica.**

La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) se realizó por el método descrito por Krawisz *et al.* (1984). Esta enzima se utiliza como marcador de la infiltración de neutrófilos, aunque no es una enzima estrictamente específica de estos fagocitos.

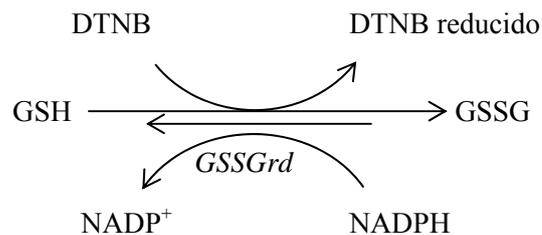
Los fragmentos de colon se dispusieron sobre una placa petri enfriada con hielo y se picaron con tijeras durante aproximadamente 15 segundos. A continuación,

se homogeneizaron en tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 0,5 % (p/v) en tampón fosfato salino (PBS, 50 mM, pH=6), a una dilución final de 1:20 (p/v) en un homogeneizador Heidolph durante aproximadamente 45 segundos. El HTAB actúa como detergente, lo cual facilita la liberación de la enzima MPO de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, donde se encuentra almacenada. Seguidamente, el homogeneizado se sonicó durante 10 segundos y se sometió a un triple proceso de congelación-descongelación, procesos que facilitan la ruptura de estructuras celulares, favoreciendo también de este modo la liberación de la enzima. Tras la última descongelación se centrifugó el homogeneizado a 7000 G durante 10 minutos a 4°C y se procedió a la determinación de la actividad MPO siguiendo la cinética de la reacción frente al agua oxigenada. Para ello se añadieron 100 µl del sobrenadante a 3 ml del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por clorhidrato de o-dianisidina (0,167 mg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0,0005 % (p/v) en PBS (50 mM, pH=6). El incremento de absorbancia se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro Biorad 680 XR. La actividad MPO se calcula por interpolación en una curva patrón, realizada con peroxidasa de rábano. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 mmol/min de peróxido de hidrógeno a 25°C. Los resultados se expresaron como U/g tejido fresco.

#### **2.3.3.2. Determinación del contenido de glutatión total.**

La determinación del contenido colónico de glutatión total se realizó de acuerdo con el método de la reducción cíclica DTNB-GSSG (Anderson, 1985). Este método se basa en la oxidación del glutatión reducido (GSH) presente en una muestra a su forma oxidada (GSSG) mediante su incubación con el ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB), el cual es reducido y adquiere una coloración

amarillenta que puede ser determinada espectrofotométricamente. El GSSG generado es reducido por acción de la enzima glutatión reductasa (GSSGrd) en presencia de NADPH. El GSH formado se oxida de nuevo, dando lugar a un ciclo continuo en el cual la velocidad de reducción del DTNB (con el consiguiente incremento de la absorbancia) es proporcional a la cantidad total de glutatión (GSH + GSSG) (fig. 4).



**Figura 4.** Mecanismo de reducción cíclica de DTNB, a partir de la oxidación de GSH.

Para efectuar esta determinación se utilizaron los fragmentos de colon congelados en solución de TCA al 5 % (p/v). Se picaron con tijeras durante 15 segundos aproximadamente, sobre una placa petri con hielo y posteriormente se homogeneizaron en la solución de TCA en una proporción 1:20 (p/v) en un homogeneizador automático Heidolph. A continuación, se centrifugó el homogeneizado a 2000 G, durante 5 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante que se sometió a una segunda centrifugación a 10000 G durante 5 minutos a 4°C. Para la determinación del glutatión total se mezclaron 20 µl de sobrenadante, 20 µl de tampón PBS-EDTA (PBS 143 mM, EDTA 6,3 mM, pH=7,5), 140 µl de solución de β-NADPH (0,289 mM) en PBS-EDTA y 20 µl de DTNB (6 mM) en tampón PBS-EDTA, en una placa Microtitter de 96 pocillos para ELISA, que se incubó a 30°C durante 5 minutos. Tras adicionar 15 µl de solución de glutatión reductasa (Boehringer-Mannheim, Barcelona) (266 UI/ml) en PBS-EDTA, se agitó y se

registró el incremento de absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro Biorad 680 XR. La concentración de glutatión se calculó por interpolación en la curva patrón realizada con GSH comercial. Los resultados se expresaron como nmoles de glutatión total/g tejido fresco.

#### **2.3.3.3. Determinación de los niveles colónicos de LTB<sub>4</sub>.**

Para la determinación de este parámetro bioquímico se realizó un procedimiento simple de extracción de forma inmediata (<1 h) a la obtención del órgano (McCafferty *et al.*, 1992). Los fragmentos de colon se picaron con unas tijeras sobre una placa petri con hielo durante 15 segundos y se incubaron en PBS (10 mM, pH=7,4) en proporción 1:5 (p/v) a 37°C durante 20 minutos con agitación constante. A continuación, se centrifugaron las muestras a 9000 G durante 30 minutos a 4°C y se congeló el sobrenadante obtenido a -80°C. Para la determinación de la concentración de LTB<sub>4</sub> se utilizó un kit comercial de enzimoimmunoensayo suministrado por Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Reino Unido). Los resultados se expresan como ng/g tejido fresco.

#### **2.3.3.4. Determinación de la expresión de iNOS y PCNA en tejido colónico.**

La expresión de iNOS y de PCNA se estudió mediante la técnica de Western Blot. Para ello, los fragmentos colónicos fueron descongelados y homogenizados en proporción 1:5 (p/v) en PBS con dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1%, desoxicolato sódico al 0,1% y tritón X-100 al 1%, conteniendo inhibidores de proteasas (aprotinina, 1,10-fenantrolina, iodocetamida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Seguidamente, los homogenados se centrifugaron a 10.000 G durante 10 min.

Tras la homogenización, se determinó el contenido en proteínas por el método del ácido bicinchonínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Este método se basa en la capacidad de algunos aminoácidos y del enlace peptídico para reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . Se usa un colorante con un máximo de absorbancia de 562 nm, que se obtiene mezclando dos reactivos A y B en proporción 50:1 (v/v). El reactivo A es una disolución acuosa de BCA (25,8 mM),  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,16 M), tartrato sódico-potásico (5,7 mM), NaOH (0,1 M) y  $\text{NaHCO}_3$  (0,11 M) (pH=11,25). El reactivo B es una disolución acuosa al 40% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Para realizar la determinación, se añadieron, a 2  $\mu\text{l}$  del homogenado, 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de coloración y, tras incubar a 37°C durante 30 min, se procedió a la lectura espectrofotométrica a 560 nm. El cálculo del contenido de proteínas se realizó por interpolación en una curva patrón de albúmina sérica bovina.

Para desnaturalizar las proteínas, los sobrenadantes (100  $\mu\text{g}$ ) se mantuvieron durante 5 min a 95°C en tampón de carga laedmi 5X (Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, SDS 5%, 2-mercaptoetanol 8,8% (v/v), glicerol 37,5%, azul de bromofenol 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y fueron sometidos a electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7%. Como indicador de peso molecular se utilizó una mezcla de proteínas previamente mezcladas con un colorante (BioRad, Hercules, CA, USA). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Protan<sup>®</sup>, Schlecher & Schuell, Alemania), la cual fue posteriormente bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% (p/v) en tampón Tris salino (TBS) conteniendo Tween-20 al 0,1% (v/v) (TBS-T). Tras el bloqueo, las membranas se sometieron a tres lavados con TBS-T durante 5 minutos, y fueron expuestas a las correspondientes diluciones de anticuerpo incorporado en albúmina de suero bovino al 5% (p/v) en TBS-T. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-iNOS de conejo en una dilución 1/3000, y anti-PCNA de ratón diluido 1/1500 (ambos anticuerpos de

Transduction Labs, Madrid, España) en tampón TBS-T, y se mantuvieron en agitación durante 12 horas a 4°C. En el caso de iNOS, el anticuerpo secundario que se empleó fue anti-IgG de conejo e anti-IgG de ratón para PCNA. Ambos se diluyeron 1/3000 en el mismo tampón. Las bandas resultantes fueron detectadas por quimioluminiscencia (NEM Life Science Products, Zaventem, Bélgica) y se revelaron sobre película fotográfica (Kodak, Madrid, España). La intensidad de las bandas se cuantificó mediante el programa *Scion Image*.

El control de la carga proteica fue estandarizado reincubando las membranas con anticuerpo primario anti- $\beta$ -actina, diluido 1/3000. El anticuerpo secundario empleado fue anti-IgG de conejo (1/3000).

#### **2.3.3.5. Cuantificación de la flora bacteriana.**

Las muestras de contenidos intestinales se homogenizaron en agua de peptona a una concentración de 100 mg/ml. A continuación se hicieron diluciones seriadas 1:10 hasta 1/10<sup>8</sup>. Estas diluciones se cultivaron en medios específicos.

Para hacer recuento de lactobacilos los contenidos lumbinales se cultivaron en agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe; Merck, Darmstadt, Alemania). Se trata de un medio natural muy rico que contiene polisorbato, acetato, magnesio y manganeso que actúan como factores de crecimiento para muchos lactobacilos. Para bifidobacterias se empleó el mismo medio MRS suplementado con 0,5 mg/l de dicloxacilina y 0,5 g/l de L-Cisteína. Se usaron placas de petri de 10 cm de diámetro (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en las que se vertió aproximadamente 15 ml de medio de cultivo estéril.

Para el cultivo de coliformes, anaerobios y enterobacterias se utilizaron placas comerciales *Petrifim*® (3M, Madrid, España).

Las placas se inocularon con 200 µl de homogenado de heces en el agua de peptona. En las placas de petri se extendió el homogenado con un asa de cristal por toda la superficie del agar durante 15 segundos para asegurar una distribución homogénea. En las placas *Petrifilm*® en cambio se presiona con un aplicador para repartir el inóculo sobre todo el área. Los cultivos se incubaron a 37° C durante 24 horas. En el caso de lactobacilos y bifidobacterias se introdujeron las placas en grupos de 10 en jarras con condiciones de anaerobiosis y para los grupos de coliformes, aerobios y enterobacterias se incubaron en pilas de 20 placas en condiciones aeróbicas. Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias (CFU) por mg de heces (media ± desviación estándar).

#### **2.3.3.6. Cuantificación de AGCC en los contenidos intestinales por cromatografía de gases.**

Los AGCC son los principales productos derivados de la fermentación de la fibra por la flora bacteriana intestinal, principalmente acético, propiónico y butírico (Wong *et al.*, 2006). Por este motivo procedimos a su determinación en los contenidos colónicos de los animales utilizados en nuestros estudios.

Los contenidos colónicos se homogeneizaron inmediatamente tras su obtención en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 150 mM (100 mg/ml, pH 7,8) en atmósfera inerte y en una proporción 1:5 (p/v). El homogenado fue repartido bajo atmósfera de argón en 4 tubos con tapón de rosca. Tras agitar los tubos vigorosamente, se incubaron durante 24 horas a 37°C con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, los tubos se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.

Tras descongelar los homogenados, los AGCC fueron extraídos con éter etílico y posteriormente cuantificados por cromatografía de gases (Tangerman y Nagengast, 1996). Para ello, a una alícuota de 5 ml de homogenado fecal se le

adicionaron 250  $\mu$ l de una solución de ácido 2-metil valérico (Fluka) (47 mM), que constituye el estándar interno, y 250  $\mu$ l de ácido sulfúrico concentrado. Tras agitar fuertemente se centrifugó a 10.000 G durante 5 minutos. En tubos de vidrio con tapón de pyrex se adicionaron 3 ml de sobrenadante y 1 ml de éter. Se agitó suavemente evitando la formación de micelas y se dejó reposar unos instantes hasta la formación de dos fases: una inferior acuosa y otra superior de éter etílico donde se encuentran los AGCC. Se recogió la capa superior y tras deshidratarla con sulfato sódico anhidro y filtrarla con algodón, se inyectaron 2  $\mu$ l en el cromatógrafo de gases para la determinación y cuantificación de los AGCC presentes. Se empleó un cromatógrafo de gases de alta resolución Carlo Erba serie 8000 modelo 8060 de Thermo Quest asociado a un detector de masa Platform II de Micromass. Dicho cromatógrafo consta de una columna capilar INNOWAX de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu$ m de espesor de película y de un inyector modo sin división de flujo a 200°C. La línea de transferencia se estableció en 220°C y la temperatura se programó desde 80°C (2 minutos) hasta 200°C (9 minutos) a una velocidad de variación térmica de 5°C/min.

El análisis del detector de masas se hizo mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, en un analizador cuadrupolar efectuando barridos de 40 a 400 Da. Los resultados se expresaron como  $\mu$ mol de AGCC/g de heces.

### **3. Ensayos *in vitro*.**

#### **3.1. Fermentabilidad de las fibras.**

La flora colónica es capaz de fermentar la fibra presente en la dieta para producir AGCC, pero cada tipo de fibra tiene una capacidad diferente de ser fermentada.

Se utilizaron heces frescas procedentes de tres ratas sanas alimentadas con la dieta estándar. Las heces se homogenizaron en agua de peptona tamponada (200 mg/mL). Estos homogenados se dividieron en tres y dos de ellos se incubaron, por un lado con FOS (10 mg/ml) y por otro con salvado de arroz (10 mg/ml). La incubación se llevó a cabo a 37°C con agitación constante, en condiciones anaeróbicas. Se tomaron muestras a 0, 6, 12, 24 y 48 horas. Se utilizaron tubos separados para los diferentes tiempos de fermentación. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis de la concentración de AGCC (ver apartado 2.4.6) y recuento de lactobacilos y bifidobacterias intestinales (ver apartado 2.4.5). Las heces de cada animal se incubaron independientemente y por duplicado.

### **3.2. Obtención y cultivo de las líneas celulares epiteliales intestinales (HT-29 y FHC).**

Estos estudios *in vitro* se llevaron a cabo en dos líneas celulares. Ambas líneas celulares fueron obtenidas del Servicio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Granada:

- La línea celular de adenocarcinoma colónico **HT-29** fue utilizada como modelo de epitelio intestinal, además de como células cancerosas. Las HT-29 se cultivaron en DMEM, suplementado con L-glutamina (2 mM), antibióticos y 10 % suero bovino fetal (Boeheringer Mannheim, Barcelona) a 37°C y con una tensión de CO<sub>2</sub> del 5 %. Las células recibieron pases dos veces a la semana tras exponerlas a tripsina/EDTA (0,05/0,02%). Para los experimentos de cultivos diferenciados, se mantuvieron durante 18 días células HT-29 confluentes.

- La línea celular fetal de colon humano normal (**FHC**, *fetal human cells*). A diferencia de las anteriores no se trata de células tumorales, por lo que su crecimiento es mucho más lento y requieren un especial cuidado. El cultivo celular recibió pases cada semana tras exponerlas a tripsina/EDTA (0,25/0,03%). El medio en el que se cultivaron las FHC se compone de DMEM (45%), medio de Ham F12 (45%), HEPES 25 mM, 10 ng/ml de toxina colérica, 0,005 mg/ml de insulina, 0,005 mg/ml de transferrina, 100 ng/ml de hidrocortisona y 10 % de suero bovino fetal (Boehring Mannheim, Barcelona). Se incubaron a 37°C con una tensión de CO<sub>2</sub> del 5 %.

Para realizar los ensayos de proliferación, viabilidad y expresión de citocinas (ver apartados siguientes), las células se sembraron en placas de 6 y 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), dependiendo del grado de confluencia requerido.

### **3.3. Ensayo de proliferación celular en HT-29 y FHC.**

La proliferación de ambas líneas celulares se determinó por el ensayo de incorporación de timidina tritiada (Xaus *et al.*, 2001), con pequeñas modificaciones. Las HT-29 se sembraron a diferentes grados de confluencia: 1 x 10<sup>5</sup> células (no confluentes), 5 x 10<sup>5</sup> células (sub-confluentes), 15 x 10<sup>5</sup> células (confluentes) y el cultivo diferenciado (de 18 días) en 1 ml de medio completo por pocillo en presencia o ausencia de las concentraciones de AGCC indicadas en cada caso. Se incubaron durante 24 horas en placas de 24 pocillos. En el caso de las células FHC, las placas se cultivaron hasta alcanzar sub-confluencia. Entonces, se les añadió timidina-<sup>3</sup>H (1μCi/ml) (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA). Tras 6 horas de incubación a 37°C en las células HT-29 y 24 horas en el caso de las FHC, se retiró el medio y las células se fijaron en metanol al 70% enfriado en hielo. Tras tres lavados en TCA al 5% a 4°C, las células se solubilizaron en SDS al 1% y NaOH 0,3 M a temperatura

ambiente. La radioactividad se cuantificó mediante centelleo líquido utilizando un medidor de centelleo Packard 1400 Tri-Carb. Cada determinación se realizó por triplicado.

### **3.4. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina.**

Las células HT-29 fueron cultivadas como no diferenciadas (sub-confluentes,  $5 \times 10^5$  células) o a densidad confluyente ( $15 \times 10^5$  células) como cultivo diferenciado en placas de 6 pozos. Se añadieron en este punto los diferentes AGCC a las concentraciones indicadas durante 48 horas.

La diferenciación celular se determinó mediante la actividad fosfatasa alcalina (PA) (Bessey *et al.*, 1946). La fosfatasa alcalina actúa sobre el p-nitrofenilfosfato (pNPP) dando lugar a fosfato y a anilina, la cual presenta color amarillo, que se puede cuantificar espectrofotométricamente. Para ello se incubaron por duplicado 30  $\mu$ l del medio en el que se mantuvieron las células con los AGCC con 50  $\mu$ L de pNPP disuelto en tampón glicina (50 mM, pH=10,5) con 0,5 mM de  $MgCl_2$  en una placa microtiter para ELISA (Nunc), durante 30 minutos a 37°C. Tras ese tiempo, se paró la reacción con 120  $\mu$ l de NaOH 2N y se midió la absorbancia a 405 nm. Por otro lado, se cuantificaron las proteínas por BCA para expresar los resultados de actividad enzimática de PA como mU/mg de proteína (ver apartado 2.4.4). Cada muestra se analizó por triplicado.

### **3.5. Ensayos de viabilidad por la técnica de cristal violeta.**

Células HT-29 a diferente estado de confluencia y células FHC sub-confluentes ( $5 \times 10^5$  células) se incubaron en placas de 24 pozos en 1 ml de medio completo en presencia o ausencia de los AGCC indicados. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se determinó la viabilidad mediante tinción con cristal violeta

(Xaus *et al.*, 2001). El cristal violeta solamente penetra en células vivas, por lo que es una buena técnica para determinar viabilidad celular. Las células fueron teñidas y fijadas con 0,2% de cristal violeta en etanol al 2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras 4 lavados con PBS, las células se despegaron con SDS al 1% durante 30 minutos en agitación. Después se recogieron y centrifugaron a 2000 G durante 5 minutos. Finalmente, se cuantificó la intensidad del color utilizando un lector de ELISA (Nunc) a una longitud de onda de 540 nm. Cada muestra se analizó por triplicado.

### **3.6. Determinación de la expresión de IL-8.**

La secreción de IL-8 en los cultivos de las células HT-29 y FHC se cuantificó mediante un kit comercial de ELISA para IL-8 humana (CytoSets, Biosource International, Nivelles, Bélgica). Se incubaron células a diferentes confluencias en placas de 24 pocillos en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de AGCC durante 1 hora. Tras esto se estimuló a las células con lipopolisacárido (LPS, 1µg/mL). Los sobrenadantes obtenidos 24 horas después fueron congelados a -80°C hasta el día del análisis con el kit de ELISA. Los resultados se expresaron como ng/mL de sobrenadante. Cada muestra se analizó por triplicado.

### **4. Estudio estadístico.**

Los resultados de los ensayos *in vivo* se expresaron como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media, y los de los ensayos *in vitro* se expresaron como la media aritmética  $\pm$  desviación estándar de la media. La significancia estadística de las diferencias entre las medias se determinó mediante la prueba de la t de Student. Los datos no paramétricos se evaluaron mediante el test de Mann-Whitney. Las

diferencias entre porcentajes se analizaron con el test de  $\chi^2$ . El programa estadístico utilizado fue SPSS versión 12.0.

## RESULTADOS

---



## **1. Efecto de los AGCC sobre la fisiología del epitelio intestinal.**

La fermentación de la fibra por la microbiota intestinal produce AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato. De ellos, el butirato es considerado como el sustrato energético de las células epiteliales y parece ser que protege de la carcinogénesis colónica en ratas (Young *et al.*, 1996), probablemente por su habilidad de inhibir la proliferación de las células epiteliales tumorales. No obstante, también hay diferentes estudios que sugieren el efecto beneficioso del butirato sobre la reparación/regeneración producida después de un daño colónico (Breuer *et al.*, 1991). Sin embargo, no hay estudios sobre el propionato y acetato sobre la fisiología de las células epiteliales.

Considerando toda esta información, nos planteamos una serie de cuestiones: ¿qué función realmente ejercen el butirato y los otros AGCC en la homeostasis del epitelio intestinal? ¿Están realmente involucrados en la protección contra el cáncer de colon? O, al contrario, ¿participan en la regeneración epitelial durante la recuperación del tejido en la inflamación? Finalmente, ¿cual es el efecto de los AGCC durante la proliferación normal de las células epiteliales?

### **1.1. Modelo de epitelio intestinal maduro y célula epitelial cancerosa mediante estudios *in vitro* con líneas celulares.**

Para contestar estas cuestiones, nuestro primer objetivo fue estudiar el efecto de estos AGCC sobre el epitelio intestinal normal y las células epiteliales cancerosas. Sin embargo, para estos ensayos, nos vimos obligados a recurrir a líneas celulares de CEI, ya que los cultivos *ex vivo* de estas células son muy difíciles de manipular

(Panja, 2000). Por este motivo, para los ensayos *in vitro*, se seleccionaron dos líneas celulares de CEI: las HT-29 (*Adenocarcinoma de colon humano*; ECACC n°: 91072201) y FHC (*célula epitelial normal de colon humano*; ATCC n°: CRL-1831).

La línea celular HT-29, debido a su origen tumoral, ha sido frecuentemente empleada en estudios oncológicos (Marchetti *et al.*, 1997; Milovic *et al.*, 2000). Sin embargo, también existen diversos trabajos en qué estas células han sido consideradas como modelo de células epiteliales normales, dado que presentan similitudes estructurales y funcionales de epitelio intestinal (Andoh *et al.*, 2001; Kalina *et al.*, 2002). Por este motivo, algunos de los resultados obtenidos con estas células fueron contrastados utilizando la línea celular FHC, ya que al no ser de origen tumoral, presenta un fenotipo celular mucho más similar a las células epiteliales presentes en el colón (Haza *et al.*, 2000).

Además, también se ha descrito que las células HT-29, cuando se mantienen por un periodo de tiempo prolongado y en condiciones normales de cultivo de forma confluyente, reducen su grado de proliferación adquiriendo un fenotipo epitelial diferenciado y polarizado, de forma similar a lo que ocurre en el epitelio normal colónico (Chantret *et al.*, 1998). Uno de los métodos experimentales que puede permite caracterizar indirectamente el grado de diferenciación de estas líneas celulares puede ser el análisis de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (FA) (Siavoshian *et al.*, 1997b).

Para confirmar estas observaciones, se estudió si el grado de maduración y diferenciación de las células HT-29 depende, efectivamente, de la confluencia celular. Para ello se incubaron diferentes concentraciones de células HT-29 en medio completo (DMEM + 10% FBS), en placas de cultivo celular durante dos horas, tiempo suficiente para su adhesión a la placa de cultivo. Seguidamente, mediante la observación al microscopio óptico, se clasificó los cultivos celulares en no

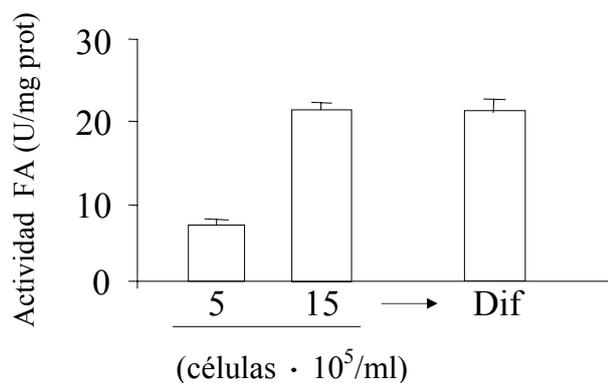
confluentes (30-40 %), subconfluentes (60-70 %) y confluentes (95-100 %) en función del área de la placa ocupada por las células HT-29. El análisis microscópico, mediante recuento del número de células en las placas, mostró que los cultivos se podían clasificar en:

- a) **Cultivos no confluentes:**  $1 \cdot 10^5$  células/ml.
- b) **Cultivos subconfluentes:**  $5 \cdot 10^5$  células/ml.
- c) **Cultivos confluentes:**  $15 \cdot 10^5$  células/ml.

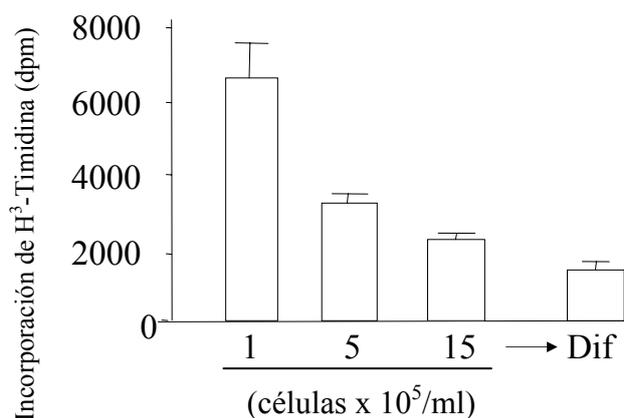
Por otro lado, las células HT-29 fueron mantenidas durante un periodo de 18 días, en medio completo, en un estado de máxima confluencia para conseguir un fenotipo polarizado y diferenciado de epitelio intestinal normal. En este caso, se denominó **cultivo diferenciado** (d).

El análisis de la actividad FA, confirmó que las células HT-29 confluentes ( $15 \cdot 10^5$  células/ml) y las células HT-29 diferenciadas durante 18 días (Dif) mostraban una mayor actividad FA que las células en cultivos subconfluentes ( $5 \cdot 10^5$  células/ml), sin existir diferencias entre estos dos últimos estados de confluencia (fig. 5).

De forma similar, para analizar si el estado proliferativo de las células HT-29 también depende de la confluencia celular, se cultivaron  $1 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$ , y  $15 \cdot 10^5$  células/ml en placas de 24 pocillos, en las que posteriormente se realizó el ensayo de proliferación mediante la incorporación de  $H^3$ -timidina. Los resultados obtenidos nos mostraron que aunque las células HT-29 se encontraron siempre proliferando en presencia de medio completo, el incremento en el estado de confluencia del cultivo supuso una reducción del estado de proliferación de las células (fig. 6).



**Figura 5.** Actividad Fosfatasa Alcalina (FA) en células HT-29 cultivadas a diferente confluencia:  $5 \cdot 10^5$  células/ml (subconfluentes),  $15 \cdot 10^5$  células/ml (confluentes) y células HT-29 diferenciadas (Dif). Las células fueron incubadas en placas de 6 pocillos durante 48, excepto las diferenciadas que fueron mantenidas en estas placas durante 18 días. La actividad FA fue determinada espectrofotometricamente y los resultados fueron expresados como U de Actividad FA /mg proteína total y se presentaron como la media  $\pm$  DE.



**Figura 6.** Ensayo de proliferación de las células HT-29 cultivadas a diferente confluencia:  $1 \cdot 10^5$  células/ml (no confluentes),  $5 \cdot 10^5$  células/ml (subconfluentes),  $15 \cdot 10^5$  células/ml (confluentes) fueron incubados durante 24 horas y células diferenciadas (Dif) mantenidas en medio completo durante 18 días. Entonces, se realizó el ensayo de proliferación mediante incorporación de timidina tritiada. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  DE.

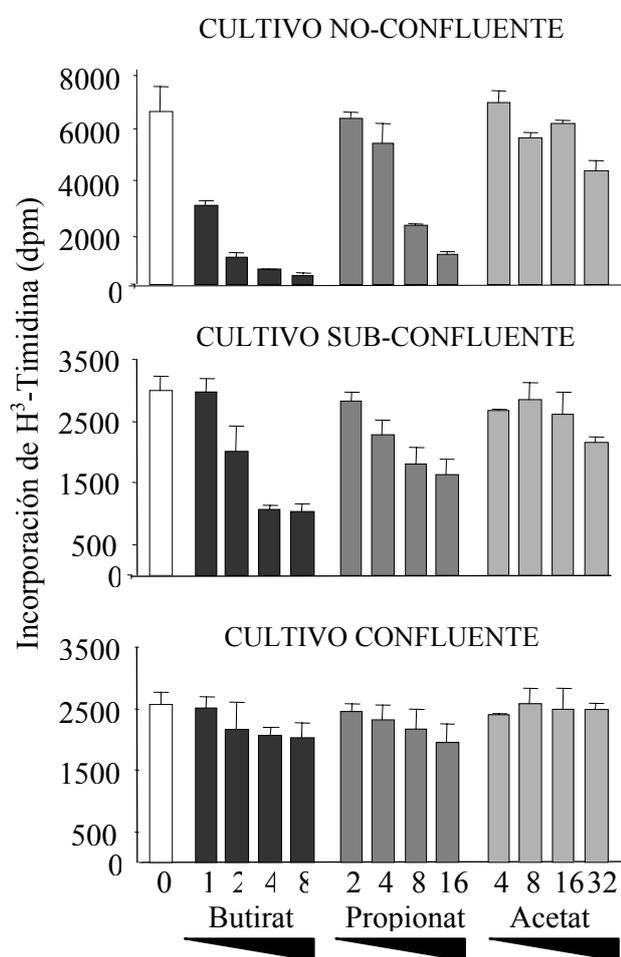
Así, demostramos que en el caso de los cultivos de células HT-29 confluentes ( $15 \cdot 10^5$  células/ml) y diferenciados (18 días), el aumento de la confluencia celular produce un incremento en la diferenciación de las células HT-29 (medida por la actividad FA) y una reducción del estado de proliferación de estas células (medido por ensayo de incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina), y por tanto, produce un fenotipo de epitelio intestinal maduro. Asimismo, el cultivo de HT-29 subconfluyente ( $5 \cdot 10^5$  células/ml) muestra un fenotipo de célula neoplásica, caracterizado por un menor grado de diferenciación y, junto a las HT-29 no confluentes ( $1 \cdot 10^5$  células/ml), un mayor grado de proliferación.

### **1.2. Efecto de los AGCC sobre la proliferación y la diferenciación, en función del estado de confluencia de las células epiteliales.**

El siguiente objetivo fue determinar si los AGCC modifican la proliferación, diferenciación y viabilidad celular de las células HT-29, y si ese efecto depende de la confluencia celular. Dado que en condiciones normales se producen diferentes cantidades de cada uno de los AGCC (D'Argenio y Mazzaca, 1999), se optó por ensayar cada AGCC en el intervalo de concentraciones a la que se pueden encontrar fisiológicamente en el intestino grueso: butirato sódico (1, 2, 4, 8 mM), propionato sódico (2, 4, 8, 16 mM) y acetato sódico (4, 8, 16, 32 mM).

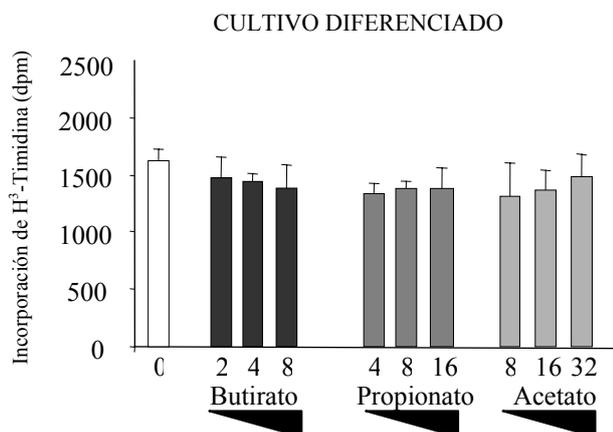
El efecto de estos AGCC sobre la proliferación celular de las HT-29 a diferente confluencia fue determinado mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada (fig. 7). En este sentido, observamos como el butirato y el propionato inhibieron la proliferación de las células HT-29 no confluentes ( $1 \cdot 10^5$  células/ml) y subconfluentes ( $5 \cdot 10^5$  células/ml) de forma dosis-dependiente (fig. 7), mientras que en los cultivos confluentes ( $15 \cdot 10^5$  células/ml) sólo se observa un ligero efecto. En todos los casos, el butirato fue más eficaz que el propionato. Finalmente,

el tratamiento con acetato no modificó el grado de proliferación en ningún tipo de cultivo analizado, aún cuando se utilizaron concentraciones 4-16 veces mayores a las que se emplearon en las incubaciones con butirato (fig. 7).



**Figura 7.** La inhibición de la proliferación de HT-29 por parte del butirato y propionato depende de la confluencia celular.  $1 \cdot 10^5$  células/ml (no confluentes),  $5 \cdot 10^5$  células/ml (subconfluentes) y  $15 \cdot 10^5$  células/ml (confluentes) fueron incubadas durante 24h con las concentraciones indicadas de los AGCC (mM). Transcurrido este tiempo, se midió la proliferación mediante el análisis de la incorporación de timidina tritiada y los resultados fueron expresados como media  $\pm$  DE.

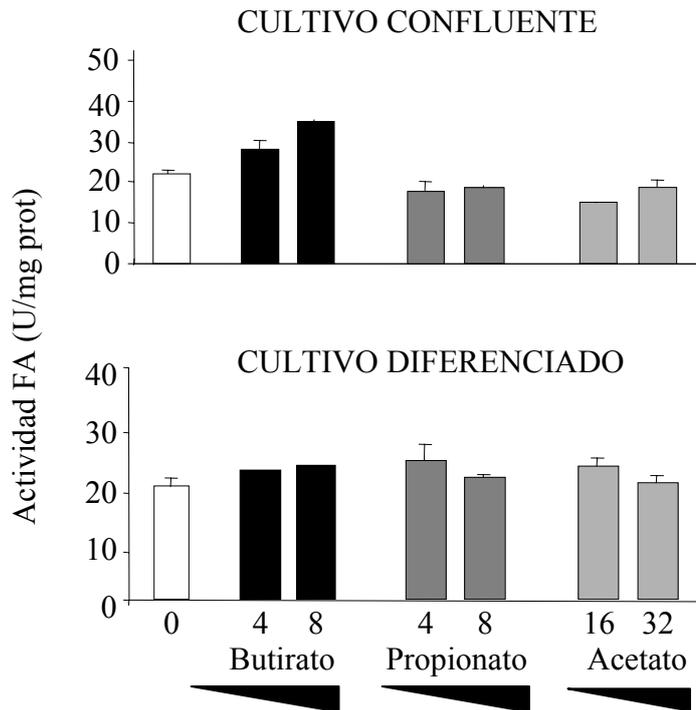
Por otra parte, en un cultivo diferenciado bajo esas mismas condiciones, ninguna de las concentraciones probadas de los diferentes AGCC inhibió la proliferación de las células HT-29 (fig. 8), lo cual nos sugirió que los AGCC no ejercen ningún efecto antiproliferativo en células muy diferenciadas.



**Figura 8.** Los AGCC no afectan a la proliferación de cultivos diferenciados de HT-29. Las células HT-29 fueron mantenidas durante 18 días con medio completo y transcurrido este tiempo se incubó con los AGCC (mM) a las concentraciones indicadas durante 24 h. La proliferación celular fue medida mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  DE.

El siguiente paso consistió en estudiar el efecto de los AGCC sobre la diferenciación de las células HT-29 mediante la determinación de la actividad FA. Los resultados obtenidos, nos indicaron que en el cultivo subconfluyente de HT-29 (fig. 9) sólo el butirato fue capaz de inducir un incremento en la actividad FA. Sin embargo, el propionato y el acetato, a las concentraciones analizadas, no modificaron la actividad basal de FA incluso 48 horas después del tratamiento (fig. 9).

De forma similar a lo observado en la proliferación celular, el butirato y los otros AGCC no modificaron la actividad FA en los cultivos confluentes y diferenciados (fig. 10).

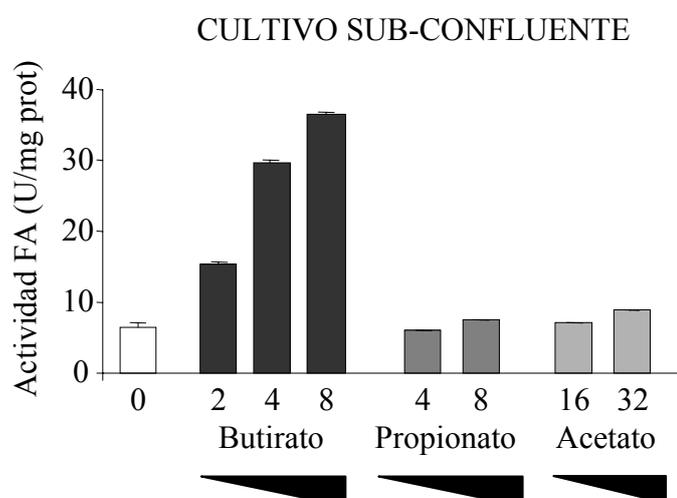


**Figura 9.** El butirato aumenta la diferenciación celular en cultivos sub-confluentes de HT-29. Unas  $5 \cdot 10^5$  células HT-29 fueron incubadas con AGCC a distintas concentraciones (mM) durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se midió la actividad FA y los resultados fueron expresados como media  $\pm$  DE.

Por tanto, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, hasta este momento, de los ensayos de proliferación y diferenciación sobre confluencia de las células HT-29, podemos establecer que:

a) Los efectos de los AGCC sobre la proliferación y diferenciación en cultivos no confluentes ( $1 \cdot 10^5$  células/ml) son muy similares a los obtenidos en cultivos de HT-29 subconfluentes ( $5 \cdot 10^5$  células/ml).

b) Los resultados obtenidos de los AGCC sobre la proliferación y diferenciación en cultivos confluentes ( $15 \cdot 10^5$  células/ml) son muy similares a los obtenidos en cultivos diferenciados en medio completo durante 18 días.

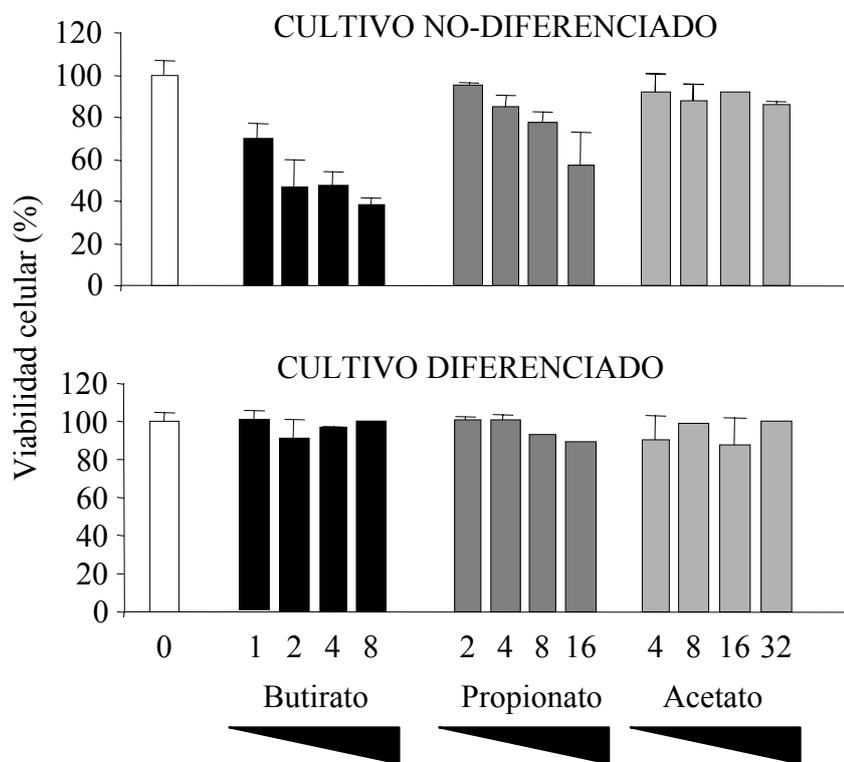


**Figura 10.** Los AGCC no afectan a la diferenciación celular en cultivos confluentes y diferenciados de HT-29. Las células crecidas en un estado confluyente ( $15 \cdot 10^5$  células/ml) y en estado diferenciado fueron incubadas con AGCC a distintas concentraciones (mM) durante 48 h. La diferenciación fue analizada mediante la actividad FA y los resultados fueron expresados como media  $\pm$  DE.

En este punto, decidimos reducir el número de distintos tipos de cultivos celulares para simplificar la metodología posterior. En los siguientes ensayos, se utilizaron los cultivos subconfluentes ( $5 \cdot 10^5$  células/ml), que denominamos como **cultivos no diferenciados**, por presentar alto grado de proliferación y baja diferenciación epitelial, similar a un fenotipo canceroso. En contraposición con los cultivos de HT-29 confluentes ( $15 \cdot 10^5$  células/ml), que pasaron a denominarse como **cultivos diferenciados**, por presentar baja tasa de proliferación y un alto grado de diferenciación, análogamente a lo observado en un epitelio intestinal maduro.

### 1.3. Efecto de los AGCC sobre la viabilidad de células HT-29 en cultivos no diferenciados y diferenciados.

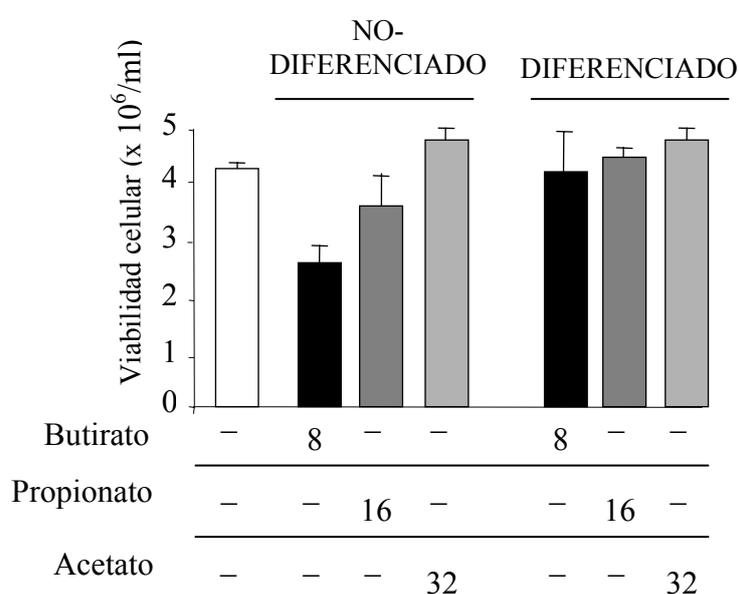
La siguiente pregunta que nos planteamos fue si el efecto de los AGCC en la viabilidad celular depende también del grado de diferenciación celular. Para ello, se realizaron ensayos de viabilidad mediante tinción con cristal violeta, que permite cuantificar las células adheridas a la placa y, por tanto, viables. Los resultados indicaron que tras el tratamiento con butirato se obtuvo una reducción en la viabilidad celular en los cultivos no diferenciados (fig. 11).



**Figura 11.** El butirato, pero no los otros AGCC, reduce la viabilidad celular en cultivos de HT-29 no diferenciados. Las células HT-29 en cultivo no diferenciado ( $5 \cdot 10^5$  células/ml) y diferenciado ( $15 \cdot 10^5$  células/ml) fueron incubadas con AGCC a las concentraciones indicadas (mM) durante 24 h. La viabilidad celular fue analizada mediante tinción por Cristal violeta y los resultados fueron expresados como media  $\pm$  DE.

Sin embargo, los otros AGCC no disminuyeron la viabilidad de estas células (fig. 11), de forma que sólo se observó un débil efecto inhibitorio en estas células no diferenciadas cuando fueron tratadas con dosis altas de propionato (16mM).

Estos resultados fueron confirmados mediante el recuento de células viables por el marcaje con azul tripán. En este caso también se observó que el butirato inhibe la viabilidad de forma dependiente del grado de diferenciación (fig. 12), siendo menor cuanto mayor es el número de células presentes en los cultivos.



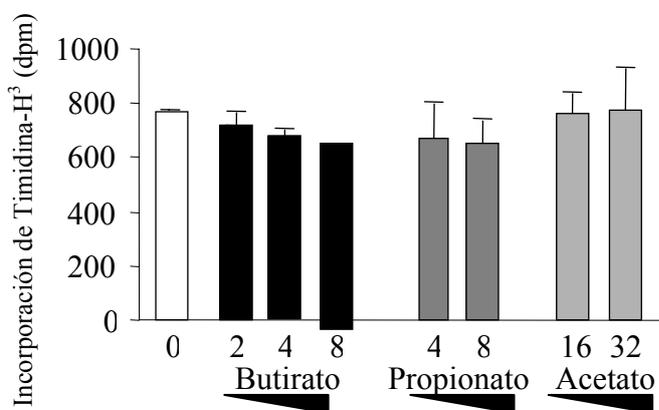
**Figura 12.** El butirato, pero no los otros AGCC, inhiben la viabilidad celular en HT-29 no diferenciadas por tinción con azul tripan.  $5 \cdot 10^5$  cels/ml (cultivo no diferenciado) y  $15 \cdot 10^5$  cels/ml (cultivo diferenciado) fueron incubadas con AGCC a las concentraciones indicadas (mM) durante 24 H. Resultado expresado como media  $\pm$  DE.

Por tanto, nuestros resultados indican que el butirato inhibe la viabilidad celular en cultivos poco diferenciados de HT-29, de igual forma que lo hacía con la proliferación. Los efectos que observamos con el propionato sobre la proliferación y

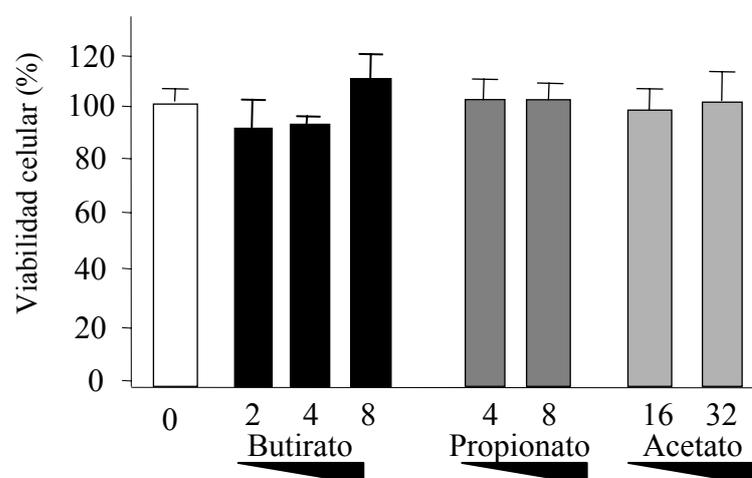
viabilidad se consiguen a concentraciones más altas (16 mM) y siempre en menor medida que las observadas con el butirato. En contraposición, no observamos ningún efecto del acetato sobre la proliferación y viabilidad en ningún cultivo analizado de HT-29.

#### 1.4. Efecto de los AGCC sobre la proliferación y viabilidad de células epiteliales normales.

Una vez observado que el butirato reducía la proliferación y la viabilidad en la línea celular de HT-29 y que estos efectos se relacionaban con su estado de diferenciación y proliferación, decidimos profundizar en el estudio evaluando los efectos del butirato y los otros AGCC en la línea celular colónica no tumoral FHC. En este caso las células fueron cultivadas hasta llegar a una subconfluencia. Al igual que en los cultivos diferenciados de células HT-29, ninguno de los AGCC a las concentraciones analizadas, modificó la proliferación (fig. 13) o la supervivencia (fig. 14) en estas células de procedencia no cancerígena.



**Figura 13.** Los AGCC no afectan a la proliferación de las células epiteliales normales. Las células FHC subconfluentes fueron incubadas durante 24 h con las concentraciones indicadas de AGCC (mM). Transcurrido este tiempo se realizó un ensayo de proliferación mediante incorporación de timidina tritiada y los resultados fueron expresados como media  $\pm$  DE



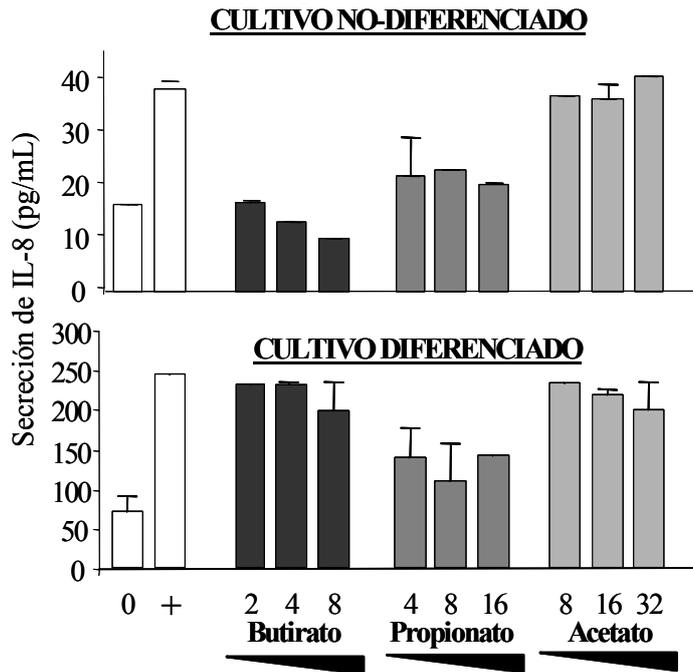
**Figura 14.** Viabilidad celular establecida por recuento tras tinción con azul tripan en células FHC incubadas durante 24 H con las concentraciones indicadas de AGCC (mM). Resultado expresado como media  $\pm$  DE

Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos previamente sobre el efecto de la proliferación y viabilidad de los AGCC en cultivos de HT-29 diferenciados, nos sugieren que estos cultivos se comportan como células epiteliales maduras y que los AGCC no ejercen ningún efecto sobre las funciones de proliferación y viabilidad de estas células.

### **1.5. Efecto de los AGCC sobre la producción de IL-8 estimulada por LPS en distintos cultivos de HT-29.**

En este punto, nos interesó estudiar el efecto de los AGCC sobre otras funciones colónicas, como puede ser su efecto en el control de los procesos inflamatorios intestinales. Para ello, las células HT-29 no diferenciadas y diferenciadas fueron estimuladas con LPS presente en bacterias Gram-negativas, y se determinó la producción de la IL-8, principal quimiocina secretada por la activación

de las células epiteliales y responsable del reclutamiento de células inflamatorias. El tratamiento de las células HT-29 con diferentes concentraciones de butirato fue suficiente para bloquear completamente la secreción de IL-8 inducida por LPS en el cultivo no-diferenciado, pero no se observó efecto en el cultivo diferenciado de HT-29 (fig. 15).



**Figura 15.** Efecto de los AGCC sobre la secreción de IL-8 inducida por LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) en células HT-29 no-diferenciadas y diferenciadas.  $5 \cdot 10^5$  células (cultivo no-diferenciado) y  $15 \cdot 10^5$  células (cultivo diferenciado) fueron incubadas con diferentes concentraciones de AGCC durante 1 h, y después estimuladas con LPS durante 24 h. La determinación de IL-8 se realizó por ELISA y los resultados expresados como media  $\pm$  DE.

Sin embargo, a diferencia del butirato, el propionato inhibió la secreción de IL-8 inducida por LPS en los cultivos de células HT-29 diferenciadas y no diferenciadas (fig. 15). El acetato, por su parte, no afectó a la producción de IL-8, a ninguna de las concentraciones ensayadas (fig. 15).

Por tanto, estos resultados indican que el butirato y el propionato son capaces de inhibir la producción de IL-8 inducida por LPS en las células HT-29 no diferenciadas. Además, observamos que el propionato inhibe la producción de esta quimiocina en los cultivos de HT-29 diferenciados.

## **2. CAPACIDAD FERMENTATIVA DE DIFERENTES TIPOS DE FIBRA.**

Una vez analizado el efecto de los AGCC sobre el epitelio intestinal y su capacidad de inhibir la citocina proinflamatoria IL-8 nos planteamos evaluar la capacidad de diferentes tipos de fibra para producir AGCC tras su fermentación. Como se comentó anteriormente en el apartado 3.5.2 de la introducción, una de las principales funciones de la fibra es producir AGCC al ser fermentada en el colon. Sin embargo, es bien conocido que no todos los tipos de fibra tienen el mismo perfil de fermentación (Redondo.2002-B).

Por ello, se seleccionaron dos tipos de fibras que, en principio poseen características diferentes: (1) fructooligosacáridos (FOS) de cadena corta, considerados como fibra soluble y muy fermentable y (2) salvado de arroz, que es una mezcla de fibra soluble e insoluble con una proporción 1:7 y parcialmente fermentable.

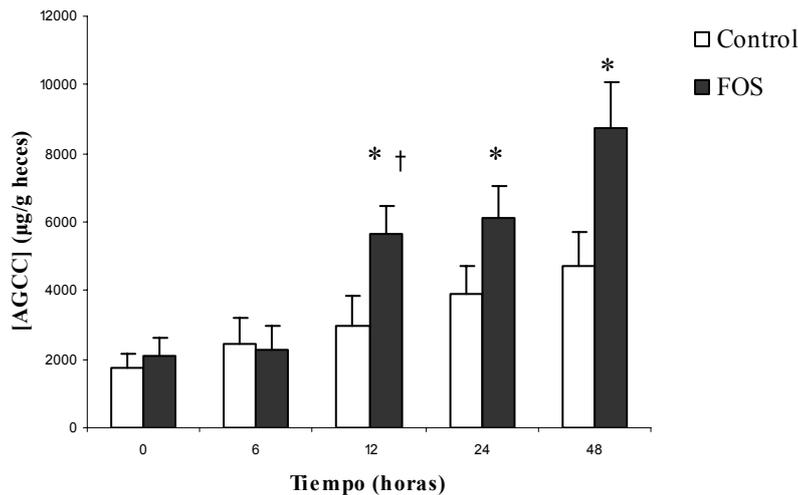
### **2.1. Capacidad fermentativa *in vitro* de las fibras.**

El objetivo de este primer ensayo fue cuantificar la producción de AGCC cuando estas fibras son fermentadas por las bacterias presentes en los contenidos colónicos y su evolución en el tiempo. Para esto, se incubaron *in vitro* los dos tipos de fibra, FOS y salvado de arroz, con contenidos colónicos recién obtenidos de ratas sanas (n=3), y se compararon con otras a las que no se les añadió ninguna fibra. Se

## Resultados

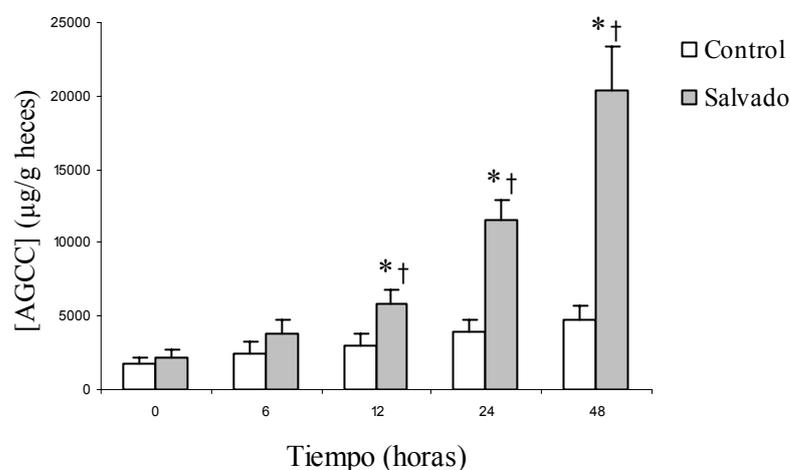
tomaron muestras a diferentes tiempos para la posterior cuantificación de los AGCC mediante cromatografía de gases.

Como se observa en la figura 16, la activación de la fermentación de los FOS tuvo lugar a partir de las 12 horas, con respecto al grupo control, al que no se añadió ninguna fibra, estabilizándose a partir de ese momento.



**Figura 16.** Producción de AGCC totales (mg/g heces) en heces incubadas con FOS (10 mg por mL de homogenado, n=3). \*  $p < 0,05$  vs. control. †  $p < 0,05$  vs. tiempo anterior. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.

En el salvado de arroz se obtienen diferencias con respecto al control a partir de las 12 horas y se produce un incremento en la producción de AGCC paulatino y continuado en el tiempo, obteniendo a partir de ese punto diferencias significativas con respecto a los valores de fermentación del tiempo anterior (fig. 17).



**Figura 17.** Producción de AGCC totales (mg/g heces) en heces incubadas con salvado de arroz (10 mg de fibra por ml de homogenado, n=3). \*  $p < 0,05$  vs. control. †  $p < 0,05$  vs. tiempo anterior. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.

## 2.2 Capacidad Fermentativa *in vivo* de las fibras.

Tras evaluar la fermentación *in vitro*, el siguiente objetivo consistió en comprobar si esta propiedad también se manifestaba *in vivo*, además de estudiar su posible actividad prebiótica.

### 2.2.1. Producción de AGCC en ratas.

Para comprobar el efecto que tiene la fermentación de la fibra presente en la dieta FOS (5% FOS) y S (5% salvado de arroz), con respecto a la fibra de la dieta control (5% de celulosa), se tomaron muestras de la luz del ciego y del colon de ratas sanas alimentadas con estas dietas durante 4 semanas y se cuantificaron los AGCC tras incubarlos durante 24 h a 37°C.

En las ratas tratadas con FOS se incrementó la producción de AGCC con respecto al grupo control (tabla VII), siendo del 13% en el ciego y del 63% en el

## Resultados

colon. Este incremento se asocio a una mayor cantidad de butirato en ambas zonas, mientras que el propionato aumento sólo en el ciego.

**Tabla VII.** Producción de AGCC en los contenidos intestinales obtenidos de ratas sanas alimentadas con la dieta control (5% celulosa, n=10), con la dieta FOS (5% FOS, n=10) o con la dieta S (5% salvado de arroz, n=10), durante cuatro semanas. \* p < 0,05 vs. control. † p < 0,05 vs. ciego. Resultado expresado como media ± ES

	Butirato (mg/g heces)	Propionato (mg/g heces)	Acetato (mg/g heces)	AGCC totales (mg/g heces)
<b>CIEGO</b>				
Control (n=10)	2,08 ± 0,04	7,93 ± 0,50	38,81 ± 1,15	48,82 ± 1,69
FOS (n=10)	4,78 ± 0,49 *	13,30 ± 0,88 *	37,05 ± 1,20	55,13 ± 2,57 *
S (n=10)	3,70 ± 0,34 *	7,81 ± 0,55	29,74 ± 2,10	41,25 ± 2,99
<b>COLON</b>				
Control (n=10)	2,17 ± 0,08	8,61 ± 0,55	33,30 ± 1,64	44,09 ± 2,24
FOS (n=10)	5,19 ± 0,27 *	18,79 ± 0,80 *†	47,76 ± 3,60 *†	71,74 ± 4,67 *†
S (n=10)	5,35 ± 0,06 *†	11,90 ± 0,35 *†	36,36 ± 2,56 †	53,61 ± 2,97 *†

Además, cuando se comparan las proporciones relativas con respecto al total, se observa una mayor proporción de butirato y propionato, a la vez que una menor proporción de acetato (tabla VIII), tanto en el ciego como en el colon, en comparación con los porcentajes obtenidos en la dieta control.

La incorporación del salvado de arroz en la dieta únicamente elevó la producción de AGCC en el colon (21% vs. control, tabla VII), y se asoció con

mayores valores de butirato y propionato. El butirato, además, se incrementó en las muestras obtenidas del ciego. Sumado a esto, se obtiene una mayor proporción de butirato en ciego y colon y de propionato en el ciego (tabla VIII).

Otro aspecto importante es la diferencia entre el ciego y el colon en la cantidad de AGCC producidos (tabla VII). En ambos grupos la producción total de AGCC es mayor en el colon que en el ciego, aunque individualmente en el grupo FOS se obtienen diferencias significativas en el propionato y en el acetato, y en el grupo S en el butirato y en el propionato.

<b>Tabla VIII.</b> Proporciones relativas de AGCC respecto al total en ratas sanas. * $p < 0,05$ vs. grupo control. Resultado expresado como media $\pm$ ES.			
	Butirato (%)	Propionato (%)	Acetato (%)
<b>CIEGO</b>			
Control (n=10)	4,3 $\pm$ 0,3	16,1 $\pm$ 1,0	79,6 $\pm$ 1,1
FOS (n=10)	8,6 $\pm$ 1,2 *	23,8 $\pm$ 1,5 *	67,6 $\pm$ 2,4 *
S (n=10)	8,9 $\pm$ 1,3 *	18,9 $\pm$ 1,0 *	72,2 $\pm$ 2,2 *
<b>COLON</b>			
Control (n=10)	3,6 $\pm$ 0,4	19,7 $\pm$ 1,8	75,2 $\pm$ 2,1
FOS (n=10)	7,4 $\pm$ 0,7 *	27,2 $\pm$ 2,5 *	65,4 $\pm$ 2,9 *
S (n=10)	10,4 $\pm$ 0,8 *	22,8 $\pm$ 1,1	66,8 $\pm$ 1,9 *

### 2.2.2. Modulación de la microbiota intestinal.

Una vez comprobada la capacidad de los dos tipos de fibra de modificar la producción de AGCC nos planteamos estudiar si la suplementación con estas fibras podía tener como resultado una modulación de la microbiota presente en el intestino

grosso. En este sentido, lactobacilos y bifidobacterias son dos géneros de bacterias beneficiosas por su papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Rastall, 2004; ver apartado 3.5.1 de la introducción). Para estudiar su presencia en el ambiente luminal intestinal se sembraron diluciones de contenidos colónicos y cecales en medios de cultivo específicos para el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias.

Así, el recuento de colonias en estos medios de cultivo específicos sembrados con muestras obtenidas de las ratas tratadas con FOS, pone de manifiesto una mayor presencia de lactobacilos y bifidobacterias que en las ratas alimentadas con la dieta estándar, y esto ocurre tanto en el ciego como en el colon ( $p < 0,05$  en todos los casos, tabla IX).

En el grupo S se observa aumentada la cantidad de bifidobacterias en el ciego ( $p < 0,05$ ) y en el colon ( $p < 0,05$ ), con respecto al grupo control (tabla IX). El recuento de lactobacilos únicamente se incrementa en las muestras obtenidas del ciego. En el colon de los animales de este grupo solamente se aprecia un incremento no significativo de lactobacilos, con respecto al grupo tratado con la dieta control.

**Tabla IX.** Recuento de colonias de Lactobacilos y Bifidobacterias en los contenidos intestinales de ratas sanas. \*  $p < 0,05$  vs. grupo Control. Resultado expresado como media del logaritmo de UFC  $\pm$  ES.

	Lactobacilos	Bifidobacterias
<b>CIEGO</b>		
Control	7,79 $\pm$ 0,09	7,44 $\pm$ 0,06
FOS	8,81 $\pm$ 0,16 *	7,97 $\pm$ 0,08 *
S	8,37 $\pm$ 0,21 *	7,98 $\pm$ 0,12 *
<b>COLON</b>		
Control	7,69 $\pm$ 0,05	7,99 $\pm$ 0,09
FOS	8,13 $\pm$ 0,09 *	8,43 $\pm$ 0,16 *
S	7,65 $\pm$ 0,18	8,67 $\pm$ 0,20 *

### 2.2.3. Modificación del pH de los contenidos intestinales.

Otro aspecto que se quiso estudiar es si la fermentación de la fibra era capaz de modular un importante aspecto en el ambiente presente en la luz intestinal, como es el pH, y para esto se midió en los contenidos colónicos y cecales.

El tratamiento con FOS en ratas sanas tuvo como resultado una acidificación de los contenidos intestinales con respecto al grupo control (tabla X), tanto en el ciego ( $p < 0,05$ ), como en el colon ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, el tratamiento con salvado de arroz sólo consigue disminuir significativamente el pH de los contenidos luminales con respecto a las del grupo control en el ciego ( $p < 0,05$ ; tabla X). Esta

## Resultados

acidificación, curiosamente, se corresponde con una menor concentración de AGCC y tal vez podría ser consecuencia de la mayor presencia de lactobacilos que se observa en el ciego de los animales tratados con esta fibra.

		pH
CIEGO		
Control		6,33 ± 0,13
FOS		5,56 ± 0,15 *
S		6,11 ± 0,17 *
COLON		
Control		6,26 ± 0,08
FOS		5,57 ± 0,12 *
S		6,65 ± 0,08

### 3. EFECTO DE LAS FIBRAS EN EL MODELO DE COLITIS POR TNBS.

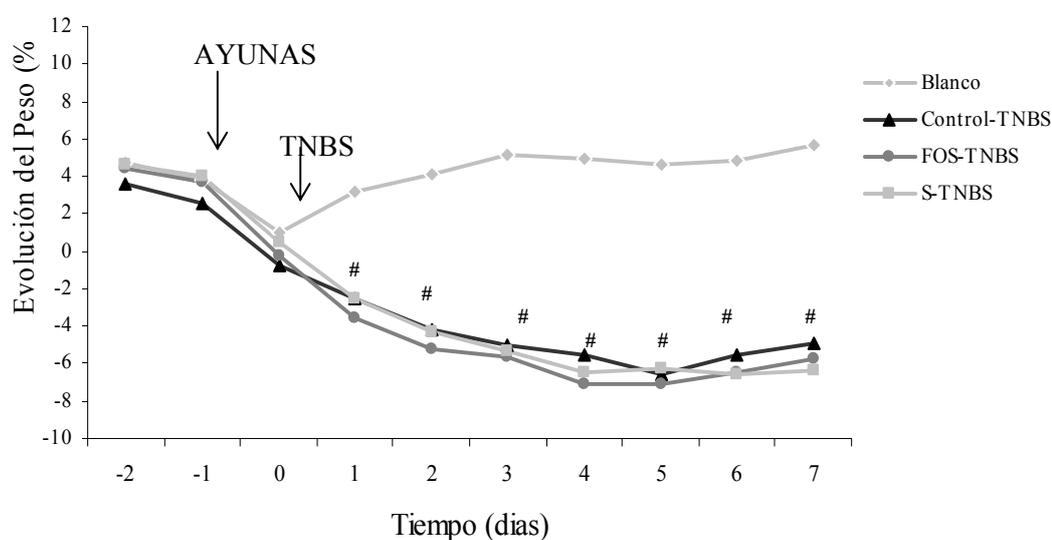
Los resultados obtenidos en los apartados anteriores indican que ambos tipos de fibras son capaces de ser fermentadas en la luz intestinal de los animales, y que esta fermentación estimula el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, a la vez que acidifica el medio. Esto las convierte en buenas candidatas para evaluar su posible actividad antiinflamatoria en un modelo de colitis experimental, como es el

de TNBS en rata, en el que se ha descrito un defecto en la producción y utilización de AGCC (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002).

Este modelo de colitis consiste en la inducción del daño colónico mediante la instilación intracolónica de 10 mg de TNBS en etanol al 50 % (v/v) (Cruz *et al.*, 1998).

Las fibras fueron incluidas en la dieta de los animales durante las cuatro semanas previas a la inducción del daño. Durante estas cuatro semanas no existió ninguna diferencia entre los cuatro grupos, en cuanto al consumo de comida o peso de los animales.

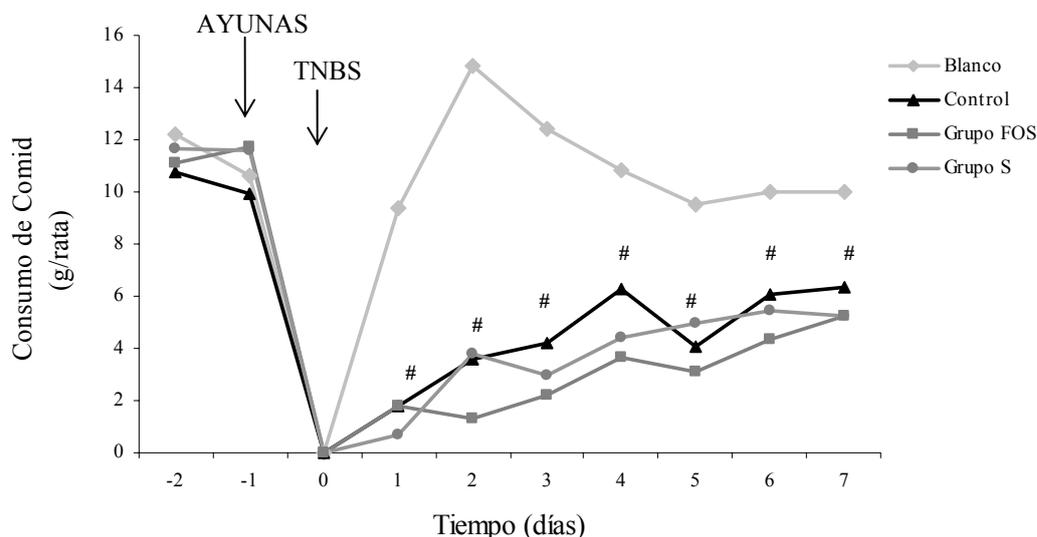
Tras la inducción de la colitis la evolución del proceso inflamatorio intestinal durante la semana siguiente a la inducción se caracterizó por la disminución del peso corporal en los animales colíticos en comparación con los que no recibieron TNBS (Fig. 18).



**Figura 18.** Evolución del peso corporal de los animales en el modelo de colitis inducida por TNBS, a partir del día 12. #  $p < 0.05$  vs. blanco.

Esta pérdida de peso se puede explicar, en parte, por la anorexia sufrida por los animales, que se manifestó por un descenso significativo en el consumo de comida en torno al 75% durante los días siguientes a la administración del TNBS, con respecto al de los animales normales (Fig. 19). Otro factor que también contribuyó en esta pérdida de peso fue la diarrea que presentaron y que se evidenció a partir del segundo día de la administración del TNBS en el 70% de los animales, mantenido hasta el fin del tratamiento (Tabla XI).

Ninguno de los tratamientos modificó el porcentaje de animales con diarrea o el consumo de comida y, en consecuencia, tampoco hubo diferencias en la pérdida de peso (fig. 18 y 19).



**Figura 19.** Evolución del consumo de comida de los animales tras la inducción del proceso inflamatorio con TNBS. #  $p < 0.05$  vs. blanco.

Transcurridos los 7 días se sacrificaron los animales y el estudio macroscópico del daño colónico generado en los animales del grupo control-TNBS reveló la existencia de áreas de inflamación y ulceración que se extendían

aproximadamente 4 cm a lo largo del colon distal, a los que se les asignó un IDM de 7 (Tabla XI), según el criterio descrito por Bell *et al.* (1995) (ver tabla VI, apartado 2.4 del material y métodos). Así mismo, y como consecuencia del proceso inflamatorio, se originó un engrosamiento de la pared intestinal y un acortamiento del colon. El peso del colon aumentó desde el grupo blanco hasta triplicarse en el grupo control-TNBS ( $p < 0.01$ ) y la longitud disminuyó 2,6 cm en el colon de las ratas control con respecto a las no colíticas ( $p = 0,14$ ). Además, como consecuencia del proceso inflamatorio se incrementó 3,7 veces la relación peso/longitud de este órgano en comparación con el grupo blanco ( $p < 0,01$ ; Tabla XII).

**Tabla XI.** Efecto de los tratamientos con fibra sobre la incidencia de diarrea, el índice de daño macroscópico colónico (IDM) y la longitud del daño en el colon en el modelo de colitis inducida por TNBS. <sup>##</sup>  $p < 0,01$  vs. grupo blanco, \*  $p < 0,05$  vs. grupo control. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.

	Longitud de daño (cm)	IDM (0-10)
Blanco (n=10)	0	0
Control-TNBS (n=10)	3,53 $\pm$ 0,44 <sup>##</sup>	7,0 $\pm$ 0,4 <sup>##</sup>
FOS-TNBS (n=10)	2,65 $\pm$ 0,24 <sup>##</sup> *	5,5 $\pm$ 0,2 <sup>##</sup> *
S-TNBS (n=10)	3,68 $\pm$ 0,21 <sup>##</sup>	7,0 $\pm$ 0,2 <sup>##</sup>

La valoración macroscópica del colon de las ratas del grupo FOS-TNBS reveló una mayor recuperación del tejido colónico, con una reducción de la zona inflamada de 1,5 cm en comparación con el grupo control ( $p < 0,01$ ) y, por tanto, con un menor valor de IDM ( $p < 0,01$ ; tabla XI). Esta mejoría en las ratas tratadas con

## Resultados

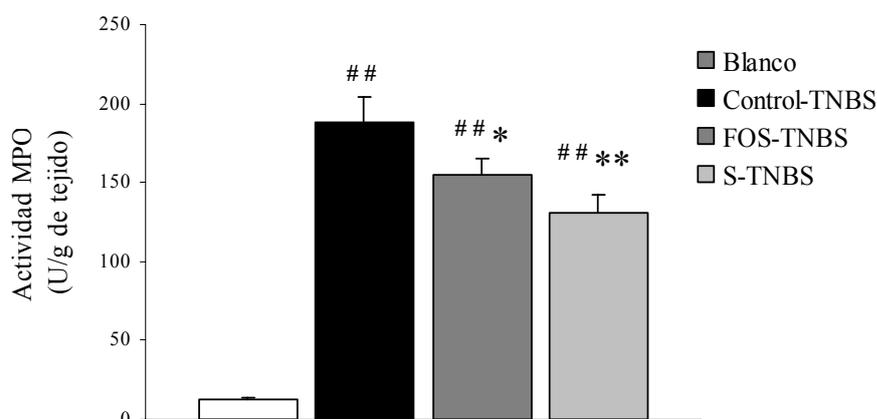
FOS se vio acompañada de una disminución de la relación peso/longitud del colon de un 30 % en comparación con los animales no tratados ( $p < 0,01$  vs. control-TNBS), debido a un menor edema en la pared colónica (Tabla XII).

En el tratamiento con salvado de arroz la única mejoría macroscópica se produjo en la relación peso/longitud ( $p < 0,01$  vs. control-TNBS), no obteniéndose diferencias en los otros parámetros macroscópicos valorados (tablas XI y XII).

**Tabla XII.** Efecto de los tratamientos con fibra sobre el peso, la longitud y la relación peso/longitud del colon en el modelo de colitis inducida por TNBS. <sup>###</sup>  $p < 0,01$  vs. grupo blanco, \*  $p < 0,05$  vs. grupo control. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.

	Peso (mg)	Longitud (cm)	Peso/Longitud (mg/cm)
Blanco (n=10)	1.047 $\pm$ 194	14,9 $\pm$ 1,7	70,32 $\pm$ 6,22
Control-TNBS (n=10)	3.223 $\pm$ 514 <sup>###</sup>	12,3 $\pm$ 0,6	258,87 $\pm$ 41,86 <sup>###</sup>
FOS-TNBS (n=10)	2.319 $\pm$ 363 <sup>###</sup>	13,5 $\pm$ 0,7	168,16 $\pm$ 17,79 <sup>###</sup> *
S-TNBS (n=10)	2.243 $\pm$ 234 <sup>###</sup>	12,3 $\pm$ 0,4	170,91 $\pm$ 12,35 <sup>###</sup> *

Desde el punto de vista bioquímico, el proceso inflamatorio intestinal se caracterizó por una actividad mieloperoxidasa colónica 15 veces superior a la de los animales sanos ( $p < 0,01$ ; Fig. 20), parámetro que refleja la existencia de una marcada infiltración leucocitaria (Bell *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1992). El efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por los FOS se asoció a un descenso de aproximadamente un 15 % de esta actividad ( $p < 0,05$  vs. control, Fig. 20). En el grupo S-TNBS la disminución de esta actividad alcanzó al 30 %, con respecto al grupo control-TNBS ( $p < 0,01$ , fig. 20).



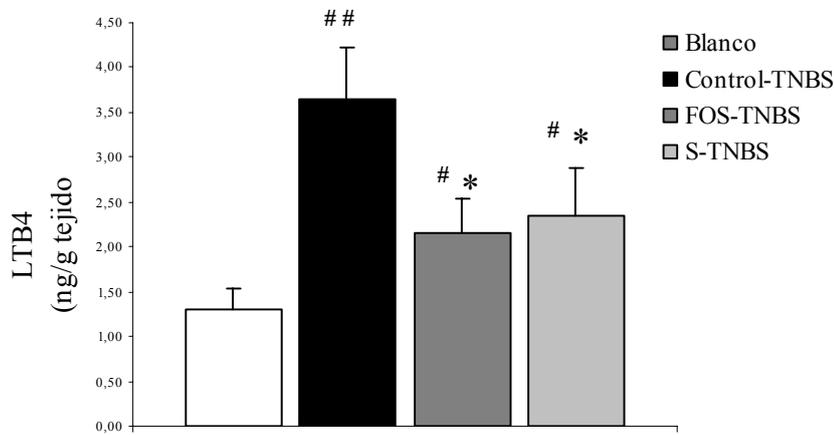
**Figura 20.** Actividad mieloperoxidasa colónica en la colitis inducida por TNBS. <sup>##</sup>  $p < 0,01$  vs. grupo blanco, <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$  vs. grupo control, <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  vs. grupo control.

La mayor infiltración leucocitaria suele asociarse con un incremento en la producción de compuestos con actividad quimiotáctica. Este puede ser el caso de eicosanoides como el  $LTB_4$ , eicosanoide que favorece el reclutamiento y posterior activación de células inmunitarias en la zona de inflamación (Kuves *et al.*, 1991), al que se le ha atribuido un importante papel en la patogénesis de la EII. La producción colónica de este mediador se triplicó en los animales colíticos con respecto a los normales ( $p < 0,01$ , Fig. 21). En el grupo FOS-TNBS, la expresión de  $LTB_4$  se redujo un 41 % con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ; Fig. 21), y en el grupo S-TNBS se redujo en un 36 % ( $p < 0,05$  vs. control), (Fig. 21).

La valoración del estado oxidativo del colon en los animales colíticos mostró que el contenido colónico de glutatión total, uno de los principales compuestos implicados en la respuesta antioxidante fisiológica (Grisham *et al.*, 1991), se redujo en un 52 % en el colon de las ratas del grupo Control-TNBS ( $p < 0,01$ ; fig. 22), lo que

## Resultados

indica la existencia de un daño de tipo oxidativo en el tejido colónico (Loguercio *et al.*, 1996).

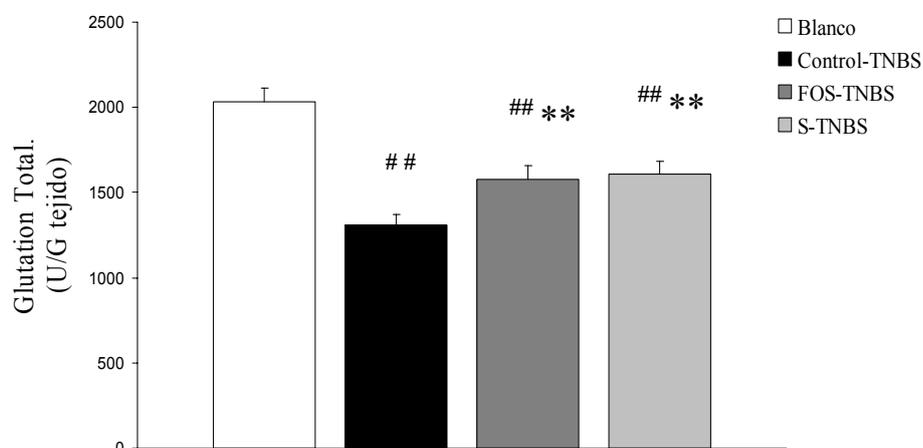


**Figura 21.** Síntesis colónica de LTB<sub>4</sub> en la colitis inducida por TNBS. ## p<0,01 vs. grupo blanco, # p<0,05 vs. grupo blanco, \* p<0,05 vs. grupo control.

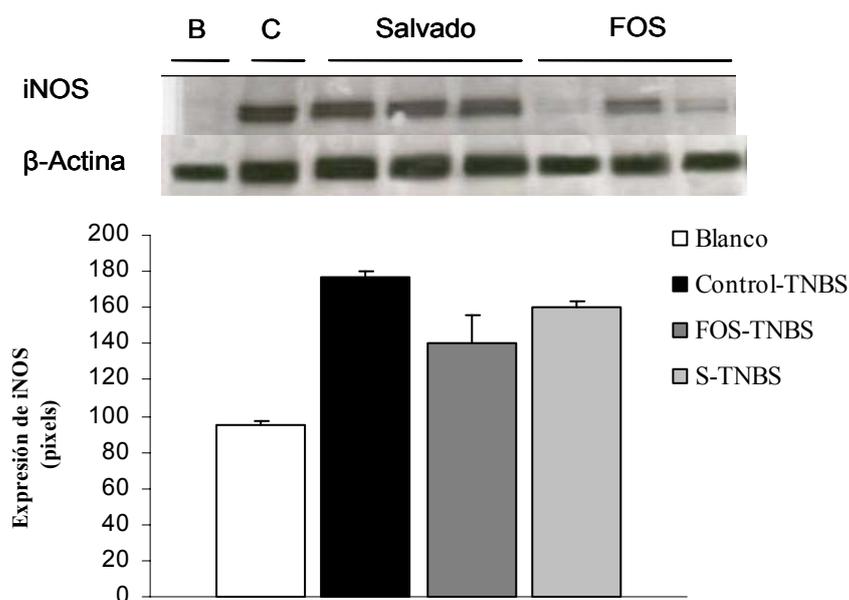
El efecto beneficioso manifestado por los dos tipos de fibra se acompañó de una mejora en el estado oxidativo colónico, ya que en ambos casos se obtienen diferencias significativas en el contenido de este tripéptido con respecto al grupo control ( $p < 0,01$ . Fig. 22).

Por último, diversos estudios llevados a cabo tanto en humanos como en animales de experimentación, han propuesto que un incremento de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) puede también contribuir al desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal (Jourdeuil *et al.*, 1999, Kimura *et al.*, 1997). Al analizar mediante la técnica de Western Blot la expresión de iNOS, se observó un incremento espectacular en el tejido colónico de las ratas tratadas con TNBS (fig. 23). La expresión de esta enzima se redujo con respecto al grupo control-TNBS en los segmentos intestinales procedentes de animales sometidos a tratamiento

con FOS, aunque no ocurrió igual en el caso del grupo S-TNBS, donde esta disminución fue más débil (fig. 23).



**Figura 22.** Contenido colónico de glutatión total en la colitis inducida por TNBS. ##  $p < 0,01$  vs. grupo blanco, \*\*  $p < 0,01$  vs. grupo control. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.



**Figura 23.** Expresión de iNOS colónica en la colitis inducida por TNBS y análisis densitométrico de las bandas. ##  $p < 0,01$  vs. grupo blanco, \*  $p < 0,05$  vs. grupo control. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.

### 3.2. Producción de AGCC por los contenidos colónicos en el modelo de TNBS.

En el modelo de colitis por TNBS el daño se localiza en la porción terminal del colon. Por este motivo se decidió tomar muestras de la zona adyacente a este daño y así, evaluar la alteración existente en la producción de AGCC.

En los animales colíticos del grupo control-TNBS, la producción colónica de los AGCC totales disminuyó un 17% con respecto al grupo sano ( $p < 0,05$ ; Tabla XIII). Además, en el grupo control, con respecto a las ratas no colíticas, se observó un trastorno en la producción colónica de butirato, que se redujo en un 61% ( $p < 0,05$ ), en la de propionato, que se redujo en un 41% ( $p < 0,05$ ) y en la de acetato, que se encontró un 9 % menor que en el grupo blanco.

**Tabla XIII.** Producción colónica de AGCC en el modelo de colitis inducida por TNBS. #  $p < 0,05$  vs. grupo blanco, \*  $p < 0,05$  vs. grupo control. Resultado expresado como media  $\pm$  ES

	Butirato (mg/g heces)	Propionato (mg/g heces)	Acetato (mg/g heces)	AGCC Totales (mg/g heces)
Blanco (n=10)	4,18 $\pm$ 0,95	8,09 $\pm$ 0,54	52,68 $\pm$ 3,90	64,95 $\pm$ 1,79
Control-TNBS (n=10)	1,65 $\pm$ 0,61 #	4,79 $\pm$ 0,86 #	47,72 $\pm$ 4,18	54,16 $\pm$ 1,88 #
FOS-TNBS (n=10)	2,80 $\pm$ 0,31 *	6,51 $\pm$ 0,64	48,55 $\pm$ 4,45	57,96 $\pm$ 1,92
S-TNBS (n=10)	2,60 $\pm$ 0,30	6,18 $\pm$ 0,64	46,79 $\pm$ 6,57	55,57 $\pm$ 2,50

Sumado a esto, se observó una alteración en las proporciones relativas de butirato, que se redujo desde un 6,1 % en el grupo sano hasta un 3,1 % en los animales con inflamación ( $p < 0,05$ ; Tabla XIV) y en propionato, que se redujo desde 12,6 % hasta 8,5 % entre esos mismos grupos ( $p < 0,05$ ; Tabla XIV). La disminución de las proporciones relativas de estos dos AGCC produce, consecuentemente, un

incremento en la del acetato, que pasa de un 81,3%, en el grupo sano, a un 88,5% en el grupo control-TNBS ( $p < 0,05$ ; Tabla XIV).

**Tabla XIV.** Proporciones relativas de AGCC respecto al total en el modelo de colitis inducida por TNBS. #  $p < 0,05$  vs. grupo blanco, \*  $p < 0,05$  vs. grupo control. Resultado expresado como media  $\pm$  ES

	Butirato (% del total)	Propionato (% del total)	Acetato (% del total)
Blanco (n=10)	6,08 $\pm$ 0,92	12,63 $\pm$ 0,76	81,29 $\pm$ 1,35
Control-TNBS (n=10)	3,05 $\pm$ 0,59 #	8,45 $\pm$ 0,91 #	88,48 $\pm$ 1,01 #
FOS-TNBS (n=10)	4,87 $\pm$ 0,46 *	11,29 $\pm$ 1,65	83,84 $\pm$ 1,76 *
S-TNBS (n=10)	4,84 $\pm$ 0,44 *	11,47 $\pm$ 0,96 *	83,69 $\pm$ 4,07 *

En los animales colíticos que fueron tratados con los diferentes tipos de fibra no se observa un incremento significativo de la concentración de AGCC totales en la muestras colónicas con respecto al grupo control (Tabla XIII). Sin embargo, cuando se analizan individualmente los AGCC, en las muestras colónicas del grupo FOS-TNBS sí se obtiene un incremento en la cantidad de butirato ( $p < 0,05$  vs. control-TNBS; Tabla XIII), que igualmente eleva su proporción con respecto al total de AGCC ( $p < 0,05$ ; Tabla XIV).

En los contenidos colónicos del grupo S-TNBS se observa una restauración en las proporciones relativas de los tres AGCC respecto al total, comparado con el grupo control ( $p < 0,05$ ; tabla XIV), pese a que no se observan diferencias significativas en ninguno de los valores absolutos (Tabla XIII).

### 3.3. Microflora intestinal en ratas colíticas.

En el apartado 2.1 de la introducción se comentó que en la etiología de la EII puede estar implicado el desequilibrio en la microbiota intestinal en la que predominan las bacterias potencialmente agresivas frente a una insuficiente cantidad de especies protectoras (Shanahan, 2000). Por este motivo se sembraron los contenidos colónicos en medios de cultivo específicos para: (1) lactobacilos y bifidobacterias, por su carácter protector y (2) enterobacterias y coliformes, por ser potencialmente patógenas.

En la tabla XV se muestran los recuentos de colonias realizados en los medios cultivados con muestras de contenidos colónicos obtenidos de los animales en el modelo de TNBS.

**Tabla XV.** Recuento de colonias de Lactobacilos y Bifidobacterias en los contenidos intestinales de ratas colíticas. #  $p < 0,05$  vs. grupo Blanco. \*  $p < 0,05$  vs. grupo Control-TNBS. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.

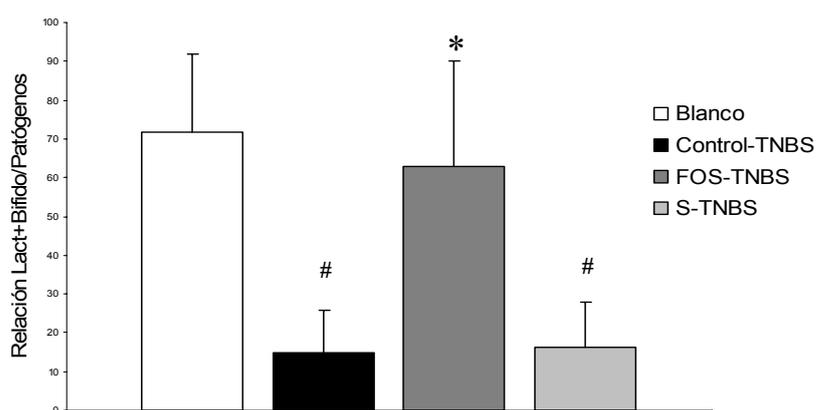
	Lactobacilos	Bifidobacterias	Enterobacterias	Coliformes
Blanco	8,30 $\pm$ 0,07	7,49 $\pm$ 0,32	7,82 $\pm$ 0,07	7,66 $\pm$ 0,04
Control-TNBS	7,69 $\pm$ 0,35	6,00 $\pm$ 0,27 #	7,86 $\pm$ 0,19	7,78 $\pm$ 0,20
FOS-TNBS	8,37 $\pm$ 0,32	6,94 $\pm$ 0,38	7,50 $\pm$ 0,28	7,23 $\pm$ 0,31
S-TNBS	8,11 $\pm$ 0,23	6,03 $\pm$ 0,18 #	7,79 $\pm$ 0,20	7,70 $\pm$ 0,08

Entre el grupo sano y el control-TNBS no se encuentran diferencias significativas en los diferentes microorganismos estudiados excepto en el recuento de bifidobacterias (tabla XV). Igualmente, los dos tratamientos estudiados tampoco se

diferencian del grupo blanco o control-TNBS (tabla XV), con la particularidad de las bifidobacterias en los animales tratados con salvado, cuyo valor es inferior al del grupo no colítico ( $p < 0,05$ ).

Pese a que se obtienen pocas diferencias en la flora colónica entre el grupo blanco y el control-TNBS, cuando se calcula la relación entre la suma de colonias de lactobacilos y bifidobacterias y la suma de colonias de enterobacterias y coliformes, sí se obtiene una gran diferencia ( $p < 0,05$ ; fig. 24).

Las muestras obtenidas del colon de las ratas tratadas con FOS muestran un incremento con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ; fig. 24), llegando a restaurar este valor, con respecto al grupo blanco. En cambio, en las muestras procedentes del grupo S-TNBS no se observa mejora alguna con respecto al control (Fig. 25).



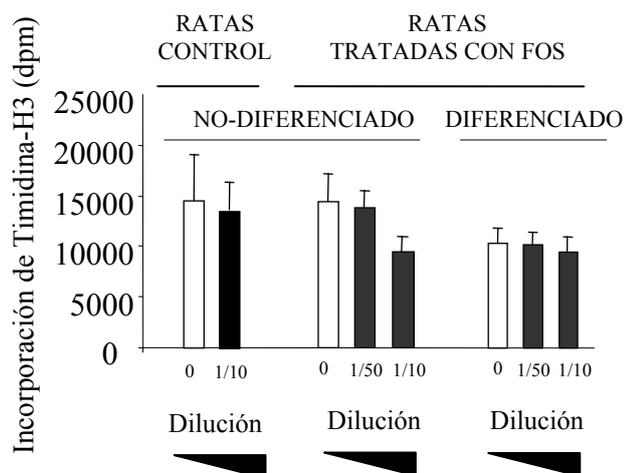
**Figura 24.** Relación entre bacterias beneficiosas y potencialmente dañinas en las muestras obtenidas del colon en el modelo de TNBS. #  $p < 0,05$  vs. grupo blanco, \*  $p < 0,05$  vs. grupo control. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.

En definitiva, el efecto antiinflamatorio intestinal de los FOS se correspondió con una mayor producción de butirato y la menor actividad presentada por el salvado de arroz se acompaña de un cambio en las proporciones de los AGCC.

#### **4. Efecto diferencial sobre la proliferación de CEI de una mezcla de AGCC producidos *in vivo* tras la fermentación colónica de fibra.**

En el primer apartado vimos el efecto de los AGCC sobre la proliferación celular es diferente en función del grado de diferenciación. Por esto quisimos estudiar si se ratificaban estos resultados en los AGCC producidos *in vivo* por la fermentación colónica de la fibra, tras incubarlos con células HT-29. Para este propósito, se incubaron estas células con los contenidos colónicos obtenidos de ratas alimentadas durante 4 semanas con una dieta cuya fuente de fibra era un 5% de FOS (dieta FOS) o un 5% de celulosa (dieta Control).

La mayor cantidad de AGCC producidos por la fermentación de los FOS redujo el nivel de proliferación en las células HT-29 no diferenciadas y, en cambio, no mostró ningún efecto en los cultivos diferenciados (Fig. 25). Este efecto inhibitorio se observó a la dilución 1/10 del homogenado fecal que, en función de las cantidades de AGCC detectados en el mismo, correspondía a unas concentraciones de  $0.47 \pm 0.13$  mM de butirato,  $1.96 \pm 0.42$  mM de propionato y  $5.81 \pm 2.2$  mM de acetato. En cambio, los homogenados fecales de ratas alimentadas con celulosa o los de las ratas tratadas con FOS tras una mayor dilución (1/50), al encontrarse una menor concentración de AGCC, no consiguieron modificar la proliferación de las células HT-29. Todos estos datos concuerdan con los resultados previos obtenidos en los ensayos *in vitro*, tanto en células epiteliales diferenciadas como no diferenciadas.



**Figura 25.** Ensayo de proliferación en células HT-29 incubadas con contenidos fecales de ratas tratadas con la dieta estándar (5% de fibra en forma de celulosa) o la dieta FOS (5% de fibra en forma de FOS).  $5 \cdot 10^5$  (no-diferenciadas) y  $15 \cdot 10^5$  (diferenciadas) células/ml incubadas con las diluciones indicadas de los AGCC obtenidos de los contenidos fecales durante 24h.

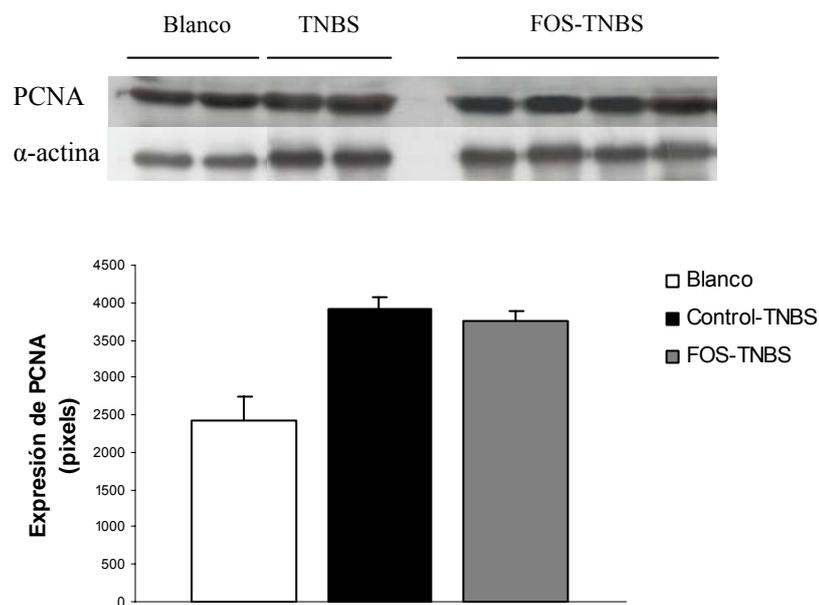
Por ultimo, se quiso comprobar si este efecto antiproliferativo *in vitro* ocurría también *in vivo*, en una situación en la que existe un incremento en la proliferación celular para conseguir la regeneración del tejido dañado, como ocurre en la colitis inducida por TNBS. Para ello, se comparo el grado de proliferación en los tejidos colónicos obtenidos de ratas tratadas con FOS (FOS-TNBS) con el de ratas cuya fuente de fibra era celulosa (Control), en el modelo de TNBS.

En este caso, la proliferación celular de los homogenizados de colon fue determinada mediante la expresión de PCNA. El PCNA (*Antígeno Nuclear de Proliferación Celular*) es una proteína no-histona de 36 Kd y de 261 aminoácidos con alto contenido en ácido glutámico y aspártico. La acción del PCNA en la proliferación celular se basa en la función que esta proteína ejerce sobre algunas formas de ADN polimerasa. (Kubben *et al.*, 1994; Mata *et al.*, 1993). Por tanto, la

## Resultados

determinación de la expresión de PCNA mediante la técnica de Western Blot es un buen marcador de proliferación celular y un indicador de regeneración intestinal (Waseem y Lane, 1990).

En la figura 26 se observa que este marcador se incrementa en las ratas colíticas, pero no se aprecia una modificación significativa entre las ratas del grupo FOS-TNBS y las del grupo control-TNBS.



**Figura 26.** Expresión de PCNA en el modelo de colitis por TNBS en rata. #  $p < 0,05$  vs. blanco. Resultado expresado como media  $\pm$  ES.

Estos resultados nos sugieren que la mayor expresión de PCNA observada en las ratas colíticas se debe a un incremento en la proliferación celular asociado a la regeneración de la mucosa y que este efecto se mantiene a pesar de la mayor producción de butirato en las ratas tratadas con FOS.

## **DISCUSIÓN**

---



Nuestro grupo de investigación lleva varios años tratando de encontrar nuevas terapias para la EII que supongan una alternativa al arsenal terapéutico disponible actualmente, en el que no existe un tratamiento con un perfil adecuado de eficacia, seguridad y coste. Se han estudiado diferentes estrategias como la administración de flavonoides (Sánchez de Medina *et al.*, 1996, 2002; Gálvez *et al.*, 1997, 2000, 2001; Cruz *et al.*, 1998, 2001; Ocete *et al.*, 1998; Crespo *et al.*, 1999, Camuesco *et al.*, 2004; Comalada *et al.*, 2005), ácidos grasos omega-3 (Camuesco *et al.*, 2005a, 2006), probióticos (Perán *et al.*, 2005, 2006) y prebióticos (Camuesco *et al.*, 2005b), incluyendo la fibra dietética (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002, 2003). En esta Tesis doctoral decidimos seguir esta última línea de actuación, dado que la fibra ha demostrado tener un papel beneficioso en pacientes de EII (Hallert *et al.*, 2003, Kanauchi *et al.*, 2001, Lindsay *et al.*, 2006).

La fermentación de la fibra por la microbiota intestinal produce AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato. De ellos, el butirato es considerado como el sustrato energético de las células epiteliales y parece ser que protege de la carcinogénesis colónica en ratas (Young *et al.*, 1996), probablemente por su habilidad de inhibir la proliferación de las células epiteliales tumorales. Sin embargo, también hay diferentes estudios que sugieren el efecto beneficioso del butirato sobre la reparación/regeneración producida después de un daño colónico (Breuer *et al.*, 1991). Sin embargo, no hay estudios acerca del efecto del propionato y el acetato sobre la fisiología de las células epiteliales.

Las células epiteliales intestinales (CEI) constituyen una barrera epitelial simple formada por un número de invaginaciones, o criptas, las cuales se encuentran

incrustadas en el tejido conectivo. Las células pluripotenciales intestinales (*stem cells*), residentes en la base de las criptas se encargan de la regeneración del epitelio y se caracterizan por una continua proliferación. Las células derivadas de las pluripotenciales experimentan un proceso de diferenciación a medida que van migrando desde la base de la cripta hasta la superficie epitelial. Durante los últimos estadios del proceso de diferenciación, estas células epiteliales maduras se vuelven senescentes (dejan de proliferar) y acaban por desprenderse del epitelio. Este proceso de regeneración se produce constantemente en el epitelio intestinal y es muy importante en el mantenimiento de la homeostasis del tejido epitelial.

Sin embargo, este equilibrio de regeneración-diferenciación de las células epiteliales se encuentra alterado en procesos donde se produce un daño en el epitelio, como puede ser el caso de la EII, donde se ha observado un aumento en la regeneración epitelial. En consecuencia, el incremento de la proliferación en las criptas puede ser la respuesta compensatoria para reemplazar la pérdida de células epiteliales muertas por apoptosis o necrosis. Sin embargo, el aumento del proceso de regeneración epitelial puede potenciar el riesgo de mutaciones conduciendo a un fenotipo carcinogénico derivando a cáncer de colon (Volgstein *et al.*, 1998).

Por otro lado, se ha descrito que los AGCC pueden presentar un efecto antiinflamatorio intestinal (Kanauchi *et al.*, 2003b). Así, los ensayos clínicos realizados con enemas de butirato han mostrado eficacia en pacientes de EII (Patz *et al.*, 1996, Steihart *et al.*, 1994). No obstante, este tratamiento puede presentar problemas de cumplimiento, debido al rechazo que tienen las formas de administración rectal (cita libro de galénica) y a las características organolépticas desagradables que caracterizan a los AGCC.

Los AGCC presentan, además de su actividad antiinflamatoria intestinal, otros efectos beneficiosos para la salud, que abarcan desde efectos de tipo metabólico (Venter *et al.*, 1980) o estimular la absorción de minerales (Wargovich *et al.*, 1984), hasta la prevención del cáncer de colon (Scheppach, 1995). Esta última actividad es de gran importancia, dado que este tipo de cáncer es la segunda causa de muerte en los países occidentales (Parker *et al.*, 1996), con especial interés en los pacientes de EII, donde la incidencia de este cáncer se encuentra incrementada con respecto al resto de la población (Krok y Lichtenstein, 2004). En estos pacientes la incidencia de cáncer colorrectal es del 2% con 10 años de evolución de la enfermedad, del 9% en pacientes con 20 años de evolución y alcanza el 19% tras 30 años.

Las células epiteliales colónicas tumorales se caracterizan por una elevada tasa de proliferación, que se asocia con una menor diferenciación en comparación con los colonocitos normales maduros (Cordon-Cardo y Prives, 1999). En diferentes líneas celulares de origen tumoral de epitelio colónico el butirato ha sido capaz de inhibir la proliferación e inducir su apoptosis (Hinnebusch *et al.*, 2002; Hague y Paraskeva, 1995), sin embargo, también se ha propuesto que aumenta la proliferación del epitelio normal colónico (Gibson *et al.*, 1992). Esta diferente actividad, inhibidora o estimulante de la proliferación celular, según se trate de células neoplásicas o sanas, ha sido definida como “efecto paradójico del butirato” (Redondo, 2002b).

Considerando toda esta información no planteamos una serie de cuestiones:

- ¿Que función ejercen realmente el butirato y los otros AGCC en la homeostasis del epitelio intestinal?
- ¿Están realmente los AGCC involucrados en la protección contra el cáncer de colon?

- ¿Participan los AGCC en la regeneración epitelial durante la recuperación del tejido en la inflamación?
- ¿Cual es el efecto de los AGCC durante la proliferación normal de las células epiteliales?
- ¿Que papel antiinflamatorio podría jugar el butirato y los otros AGCC sobre las células epiteliales activadas durante el daño colónico?

## **1. PAPEL DE LOS AGCC EN LA HOMEOSTASIS DEL EPITELIO INTESTINAL COLÓNICO.**

*La proliferación de HT-29 está inversamente relacionada con la confluencia y la diferenciación celular.*

Teniendo en cuenta todo lo anterior, nuestro primer objetivo fue evaluar el efecto de los AGCC en células epiteliales intestinales, cuando estas presentan características diferentes, en parámetros como la proliferación o la diferenciación, y para ello decidimos recurrir a dos líneas celulares de epitelio colónico: (1) la línea de adenocarcinoma humano HT-29, que ha sido empleada como modelo, tanto de cáncer colónico (Marchetti *et al.*, 1997; Milovic *et al.*, 2000), como de epitelio intestinal normal (Andoh *et al.*, 2001; Kalina *et al.*, 2002), y (2) la línea celular colónica normal fetal humana FHC, que no es tumoral.

En estas líneas celulares estudiamos varios parámetros, que nos permitieron describir un fenotipo de célula cancerosa o epitelial normal:

a) **Diferenciación celular**, mediante la actividad FA. Esta actividad aumenta en las células en función de su grado de madurez (Lee *et al.*, 2005).

b) **Proliferación celular**, mediante la incorporación de H<sup>3</sup>-timidina. En este caso, al contrario que en el anterior, la incorporación de H<sup>3</sup>-timidina está en relación inversa a su estado de crecimiento (Xaus *et al.* 2001).

c) **Viabilidad celular**, mediante recuento tras tinción con azul tripan o mediante cuantificación espectrofotométrica del cristal violeta incorporado por las células vivas (Xaus *et al.* 2001).

La controversia sobre la capacidad de las células HT-29 de ser un modelo de células neoplásicas y normales se resolvió al estudiar la diferenciación y proliferación en función del grado de confluencia. Nuestros resultados muestran que el cultivo confluyente y el cultivo diferenciado (mantenido durante 18 días a partir de confluencia) de HT-29, al igual que las células epiteliales no tumorales normales FHC, presentan características de células epiteliales normales, esto es que, aunque pueden proliferar, lo hacen con menos intensidad que las células no confluentes, a la vez que manifiestan marcadores de diferenciación como una alta actividad FA (Siavoshian *et al.* 1997a, b). En contraposición, los cultivos de HT-29 subconfluentes, con un alto índice de proliferación y baja actividad FA, presentan características de células de colon no diferenciadas (Marchetti *et al.* 1997). Aunque nuestros resultados no explican el mecanismo por el que se producen estas dos acciones diferentes, sí explican las discrepancias observadas en los diferentes estudios que han usado HT-29 en sus diferentes estados fenotípicos, neoplásico o normal.

***El butirato presenta diferente comportamiento según la célula presente diferente fenotipo tumoral o normal.***

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, consideramos que estos modelos celulares son ideales para nuestro trabajo, dado que en caso de existir un

tumor, es tan interesante conocer la acción de los AGCC sobre las células neoplásicas como sobre las células normales.

El presente trabajo revela que el butirato es el más potente y eficaz de los tres AGCC estudiados como inhibidor de proliferación y viabilidad celular, al mismo tiempo con mayor potencia y es capaz de inducir diferenciación en células HT-29 no diferenciadas. El propionato, por su parte, posee un menor efecto antiproliferativo, mientras que el acetato no tiene efecto. Estos datos concuerdan con los resultados publicados anteriormente por otros autores (Milovic *et al.*, 2000), que comprobaron que la inhibición en la viabilidad celular se produce mediante la inducción de apoptosis. En nuestros ensayos, el propionato no ha mostrado, a las concentraciones probadas, efecto sobre la viabilidad o la diferenciación de las células HT-29 en ninguno de los estados de diferenciación, a diferencia de lo observado por otros investigadores (Gryfe *et al.*, 1997). Estas discrepancias pueden estar asociadas a las diferencias en los protocolos experimentales, ya que estos autores evaluaron el estado de diferenciación de las HT-29 tras 9 días de incubación con propionato, mientras que nuestros resultados están expresados tras 24-72 horas.

En diferentes líneas celulares de cáncer de colon humano el butirato ha demostrado ser capaz de inhibir el crecimiento y favorecer la diferenciación (Augeron y Laboisse, 1984; Whitehead *et al.*, 1986). El mecanismo por el cual el butirato y otros AGCC regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis celular aun no se conoce del todo. La producción de los AGCC y su absorción están íntimamente relacionadas con la homeostasis de la mucosa colónica (D'Argenio y Mazzacca, 1999). De hecho, el “efecto paradójico del butirato” al que antes hacíamos referencia ha sido atribuido a un defecto en la oxidación en las células neoplásicas, donde el metabolismo es fundamentalmente anaerobio (Velázquez *et al.*, 1996). El butirato es totalmente oxidado por parte de los colonocitos y ha sido propuesto como

su principal fuente de energía para su actividad normal y crecimiento. Uno de los metabolitos producidos en esta oxidación es el mevalonato, que es capaz de estimular la proliferación mediante su unión a una proteína G de pequeño tamaño, presente en el citoplasma. En las células neoplásicas el metabolismo aerobio se transforma en anaerobio por la alta actividad que existe en estas células. Debido a esto, se plantea la hipótesis de que al no producirse correctamente la oxidación del butirato y disminuir la presencia de mevalonato, se impide la activación de la proteína G y no se puede iniciar el circuito de proliferación celular (Velázquez *et al.*, 1996).

Otro mecanismo antineoplásico descrito para el butirato es su capacidad de bloquear la proliferación celular principalmente en la fase G1 del ciclo (Darzynkiewicz *et al.*, 1981). Este efecto puede ser mediado por la inhibición de la actividad histona desacetilasa (Whitlock *et al.*, 1980), por el incremento de la expresión de la expresión de los genes cyclin D y p21<sup>Waf1</sup> (Siavoshian *et al.*, 1997a, b) o por la menor expresión de los proto-oncogenes (genes celulares que controlan los procesos de proliferación y diferenciación) c-src y c-myc (Foss *et al.*, 1989; Souleimani y Asselin, 1993). También se ha demostrado la acción del butirato en reducir los niveles de inhibidores de la apoptosis como Bcl-2 y Bc-XL, a la vez que de estimular la expresión de los genes proapoptóticos Bak y Bax, o inducir la actividad proteasa caspasa 3 en determinadas líneas celulares (Mandal *et al.*, 2001; Ruemmele *et al.*, 1999).

***Los AGCC no afectan a la proliferación ni a la viabilidad en células epiteliales normales.***

Tras observar el efecto de los AGCC sobre la proliferación y la apoptosis en las células HT-29 diferenciadas, decidimos estudiar si esos efectos se mantenían en una línea celular no tumoral, como es la FHC. En este cultivo, efectivamente, se

confirman los resultados obtenidos en las células HT-29, ya que ninguno de los AGCC modificó la proliferación o la viabilidad de estas células.

Por tanto, nuestros resultados *in vitro* justificarían el efecto antitumoral propuesto para el butirato, teniendo en cuenta su capacidad para inhibir la proliferación e inducir apoptosis en células intestinales no diferenciadas con un alto grado de proliferación, típicas de progresión tumoral. Al mismo tiempo, respetaría la proliferación y viabilidad de células epiteliales maduras presentes en la mucosa intestinal, ya que el butirato no ejerce ningún efecto antiproliferativo sobre las células epiteliales diferenciadas normales.

***El butirato puede ejercer un efecto antiinflamatorio en células HT-29 no diferenciadas.***

Cambiando de estrategia, el siguiente objetivo que nos fijamos fue el de evaluar los posibles efectos antiinflamatorios de los AGCC en el epitelio intestinal. Es bien conocido que la respuesta inmunitaria mucosal frente a patógenos bacterianos es crucial para nuestro bienestar. La superficie de la mucosa representa un gran área y, en ausencia de un mecanismo de defensa inmune específica, seríamos rápidamente invadidos por patógenos intestinales. Incluso en presencia de unos mecanismos inmunes efectivos, las infecciones bacterianas de la mucosa gastrointestinal son suficientemente comunes, lo que representa un problema sanitario importante. La colonización bacteriana o la invasión del tejido mucosal pueden además inducir la producción de un número de sustancias proinflamatorias y quimiotácticas, que pueden reclutar a diferentes células inmunitarias. Entre las quimiocinas se encuentra la IL-8, que es producida por los colonocitos y otras células de la mucosa, y que es un importante agente quimiotáctico para neutrófilos y linfocitos T (Godaly *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2000). Por este motivo, decimos

evaluar la acción de los AGCC sobre la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales.

En las células HT-29 se incrementa la expresión de IL-8 tras estimularlas con LPS, un componente bacteriano que es reconocido por el receptor TLR-4 (Beutler, 2000) en las células epiteliales intestinales. Nuestros resultados indican que, en las células no diferenciadas, el butirato fue capaz de inhibir la secreción de IL-8 de forma dosis dependiente hasta llegar a bloquearla completamente, sin mostrar efecto en las diferenciadas. El propionato, curiosamente, inhibe la secreción de la IL-8 inducida por LPS en ambos cultivos de HT-29, diferenciado y no diferenciado. El efecto del butirato se corresponde con la disminución de la viabilidad celular observada anteriormente al tratar las HT-29 con las mismas dosis. Por esto, la menor cantidad de IL-8 se podría atribuir, en parte, a una menor cantidad de células en el cultivo. Otro posible mecanismo de acción sería la inhibición de la actividad histona acetilasa (Hinnebusch *et al.*, 2002), que en otras líneas celulares epiteliales como la CACO-2 mostró ser la responsable de la inhibición de IL-8 (Huang *et al.*, 1997). En cambio esta explicación no justifica la reducción en la secreción de esta quimiocina por parte del propionato en el cultivo diferenciado, por lo que es posible que en células diferenciadas su secreción se produzca por otras vías.

## **2- PRODUCCION DE AGCC POR LAS FIBRAS SELECCIONADAS.**

Como se ha visto, puede ser interesante la utilización de butirato y propionato en la prevención de la inflamación y del cáncer. Para obtener una liberación continuada de estos AGCC en la mucosa del intestino grueso una buena opción es la inclusión en la dieta de fibra. Diferentes carbohidratos presentes en la fibra son capaces de alcanzar el colon inalterados y, una vez allí, fermentarse liberando AGCC y otros ácidos orgánicos localmente en la mucosa. En el intestino grueso, la

estructura química de estos carbohidratos condicionará su perfil fermentativo. Los diferentes tipos de fibra no sólo generan desiguales cantidades de AGCC, sino que las proporciones de los mismos y la velocidad con que se producen puede también variar. Así, algunos tipos de fibras son rápidamente degradadas por la microbiota intestinal en el ciego, mientras que otras, mezcla de fibra soluble y no soluble, son fermentadas de una forma más paulatina a lo largo del colon. En este sentido, nos planteamos el objetivo de evaluar la capacidad fermentativa de dos tipos de fibras suministradas por Puleva Biotech S.A., con diferentes propiedades tanto fermentativas como de naturaleza química, los fructooligosacáridos (FOS) y el salvado de arroz.

***La microbiota presente en el colon es capaz de fermentar a los FOS y al salvado de arroz.***

Los FOS se clasifican como fibra soluble y muy fermentable. Las bacterias presentes en el intestino grueso tienen especial afinidad por oligosacáridos de cadena corta. En este ensayo utilizamos FOS con un bajo grado de polimerización (n), compuestos por kestosa (GF<sub>2</sub>, n=2) en un 53%, nistosa (GF<sub>3</sub>, n=3) en un 37% y fructosilnistosa (GF<sub>4</sub>, n=4) en un 10,5 %. Este bajo grado de polimerización la convierte en un sustrato preferencial para las bacterias cecales.

El salvado de arroz, por otro lado, es una mezcla de fibra soluble e insoluble en una proporción 1:7 y parcialmente fermentable, conteniendo almidón, hemicelulosa y celulosa (Tanaka *et al.*, 2006). En función de esto, es de esperar que libere butirato a lo largo de todo el intestino grueso.

Para estudiar el perfil de fermentación realizamos dos tipos de ensayos. En primer lugar, una incubación *in vitro*, utilizando contenidos intestinales de rata como fuente de microorganismos que ataquen a los carbohidratos presentes en las

muestras; y un segundo ensayo *in vivo*, en el que se alimentó a ratas con dietas en las que un 5% era fibra compuesta por FOS, salvado de arroz o fibra no fermentable, la celulosa.

En el estudio *in vitro* se observan diferentes perfiles de producción de AGCC en los FOS y en el salvado. Los resultados muestran que los FOS son fermentados rápidamente, ya que desde las 12 h los valores de concentración de AGCC producidos son significativamente superiores a los de las muestras basales, valores que se mantienen constantes hasta las 48 h. En el caso del salvado de arroz se produce un incremento paulatino a partir de las 12 horas hasta el final del ensayo. Estos datos sugieren que los FOS serían fermentados en poco tiempo en contacto con la microbiota del intestino grueso, y por tanto su producción de AGCC se centrará en el ciego, mientras que el salvado de arroz, al requerir un mayor tiempo de fermentación, puede liberar AGCC a lo largo de todo el colon.

Nuestros resultados en la fermentación *in vitro* de FOS concuerdan con los obtenidos cuando la fuente de bacterias eran heces humanas (Flickinger *et al.*, 2002). La importancia del tamaño molecular en la fermentación de los fructanos ha sido establecida en trabajos previos, que demostraron que GF<sub>2</sub> y GF<sub>3</sub> son fermentados preferentemente por *Lactobacillus paracasei* y que GF<sub>4</sub> no era consumido hasta que la fracción de GF<sub>2</sub> y GF<sub>3</sub> no desaparecía completamente (Kaplan y Hutkins, 2000; 2003). Con estos datos se puede suponer que una preparación rica en GF<sub>2</sub>, como la del presente estudio, sería más fácil de degradar por parte de la microflora que otra preparación con compuestos de cadena más larga. Nuestros resultados son similares a los existentes en la literatura científica (Mikkelsen *et al.*, 2004), que indican que los FOS pueden ser degradados por la microbiota del íleon terminal de lechones.

No existen, en cambio, trabajos sobre la producción *in vitro* de AGCC del salvado de arroz, aunque si de su fermentación. Este salvado es utilizado en la industria para obtención de ácido láctico, gracias a la acción de bacterias como *Lactobacillus delbrueckii* (Tanaka *et al.*, 2006).

***Los FOS y el salvado de arroz estimulan la producción de butirato en el ciego y en el colon.***

Una vez comprobada *in vitro* la capacidad de fermentación de nuestras fibras, el siguiente objetivo que nos planteamos fue estudiar si se mantenía *in vivo* esta propiedad. Para esto, se alimentó a ratas con dietas en la que la fuente de fibra eran los FOS o el salvado de arroz, y se comparó con un tipo de fibra poco fermentable, como es la celulosa. Como era de esperar, vistos los datos *in vitro* anteriores, los FOS comienzan a fermentarse en ciego, aunque en el colon se obtienen concentraciones de AGCC aún mayores. El salvado de arroz, debido a sus diferentes componentes, fermenta más lentamente y no consigue diferencias en la producción de AGCC totales hasta alcanzar el colon. En este caso los datos no coinciden con los de la fermentación *in vitro* del salvado de arroz. Esto es debido, probablemente, a que en el salvado de arroz se encuentran otros compuestos capaces de fermentar, pero que no escapan de la digestión en el tracto gastrointestinal.

Es de especial interés que ambas fibras incrementen la concentración de butirato a partir del ciego, tanto en valores absolutos como en el ratio molar, lo que indica que estas fibras pueden ser adecuadas para liberar este AGCC en las inmediaciones del epitelio intestinal. Nuestros datos concuerdan con anteriores estudios en animales de experimentación, en los que se observó que la fermentación de FOS incrementa el porcentaje de butirato en ratas (Campbell *et al.*, 1997; Le Blay *et al.*, 1999) y en cerdos (Houdijk *et al.*, 1999). Efectos similares se encontraron en

ratas mantenidas desde su nacimiento en ambiente estéril (germ-free) a las que se les introdujo microbiota humana fecal (Kleessen *et al.*, 2001). En estas ratas, igualmente, la fermentación de los FOS incrementó las concentraciones cecales y colónicas de butirato y su proporción molar relativa. En humanos, en cambio, los estudios existentes no han mostrado un cambio en este aspecto (Gibson *et al.*, 1995; Alles *et al.*, Kleessen *et al.*, 1999), aunque cabe señalar que esa diferencia se puede deber a que la medición de los AGCC no se realizó en contenidos intestinales, sino en muestras de heces.

Además, ambos tratamientos son capaces de estimular la producción de propionato en el colon, siendo los FOS capaces de hacerlo incluso en el ciego. Los valores de propionato y las proporciones moleculares obtenidos por esta última fibra en ambas zonas son muy superiores a los del grupo control, lo cual concuerda con un estudio en humanos sanos de FOS de cadena corta, similares a los empleados en nuestro estudio, donde se obtienen igualmente mayores proporciones de propionato con respecto al resto de AGCC (Luo *et al.*, 1996).

También existen estudios sobre la fermentabilidad *in vivo* del salvado de arroz (Folino *et al.*, 1995; Fukushima *et al.*, 1999a). En estos trabajos se observó que la liberación de AGCC comienza en el ciego y se mantiene a lo largo del colon, incrementando progresivamente, desde las primeras secciones, las concentraciones de butirato y propionato.

Por tanto, nuestros datos confirman que los FOS son un tipo de fibra con gran capacidad fermentativa, incluso a partir de las porciones más proximales del intestino grueso y que el salvado de arroz, aunque comienza a estimular la producción de butirato en el ciego, fermenta más lentamente, consiguiendo incrementar la concentración de los AGCC totales en las muestras obtenidas del colon.

***Los FOS y el salvado de arroz favorecen el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos.***

Diferentes especies bacterianas intestinales son capaces de actuar sobre la fibra y metabolizarla para obtener energía, lo que favorecería su desarrollo. Sin embargo, eso no implica que estas bacterias sean las únicas en proliferar, ya que la modificación resultante del ambiente luminal puede estimular o inhibir el crecimiento de otras bacterias luminales diferentes. La modulación de la flora colónica para obtener una mejora en la salud es lo que se define como efecto prebiótico (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). Existe un consenso general en considerar que diferentes especies pertenecientes a los géneros de lactobacilos y bifidobacterias pueden aportar efectos beneficiosos al hospedador (Kaplan y Hutkins, 2000), razón por la cual decidimos estudiar su presencia en los contenidos intestinales de los animales tratados con fibra.

Los resultados indican que los dos tratamientos estimulan la presencia de lactobacilos y bifidobacterias. Los FOS favorecen el crecimiento de ambos géneros bacterianos, tanto en el ciego como en el colon. El salvado de arroz consigue estimular el crecimiento de las bifidobacterias en ambas zonas, pero el de los lactobacilos únicamente en el ciego. Al comparar los recuentos bacterianos entre el ciego y el colon, en ambos grupos se aprecia mayor presencia de lactobacilos en la región cecal, donde el ambiente es menos anaerobio que en el colon, donde predominan las bifidobacterias.

Estos datos de microbiota intestinal en el grupo FOS concuerdan con los de AGCC. Se sabe que muchas especies de lactobacilos y bifidobacterias poseen la enzima  $\beta$ -fructosidasa capaz de metabolizar los FOS (Kaplan y Hutkins, 2000). Por

tanto es plausible pensar que el crecimiento de estos dos géneros se debe a su capacidad metabolizadora de esta fibra.

En el caso del salvado de arroz esta asociación no es fácil de justificar. En las muestras procedentes de la luz cecal se encuentra incrementado el número de bifidobacterias y lactobacilos, pero no la concentración de AGCC, con respecto al grupo control con celulosa. En el colon sí existe una mayor producción de AGCC pero sólo relacionada a un incremento en bifidobacterias, y no de lactobacilos. Al analizar individualmente los AGCC, el butirato es el único que se eleva en el ciego, y además su valor es aun más alto en el colon, donde también se observa un incremento en la concentración de propionato. Por tanto, este aumento en la fermentación se encuentra relacionado con la mayor presencia de Bifidobacterias. Teniendo en cuenta que los lactobacilos, en su fermentación intestinal, no producen butirato (Morrison *et al.*, 2006), podemos pensar que el crecimiento de las bifidobacterias se debe a que son capaces de fermentar la fibra del salvado de arroz, aunque otros géneros bacterianos pueden disponer también de las enzimas necesarias para metabolizarla.

Cabe señalar que tanto el butirato como el propionato no se producen directamente en la luz colónica. En un primer paso, los carbohidratos son metabolizados a moléculas sencillas como lactato o acetato, y posteriormente, en un segundo paso, otras bacterias transforman estas moléculas sencillas en butirato y propionato (Louis *et al.*, 2007). Diferentes especies bacterianas denominadas butirogénicas, entre las que se incluyen *Eubacterium hallii* y *Anaerostipes caccae*, son capaces de convertir lactato y acetato en butirato (Duncan *et al.*, 2004). La presencia de estas bacterias puede ayudar a explicar el hecho de que, aunque exista un gran número de bacterias colónicas que pueden producir lactato, este ácido no se acumula en el colon de individuos sanos (Louis *et al.*, 2007). Sumado a esto, en

pacientes de CU se observó una alta concentración de lactato (Vernia *et al.* 1988), lo cual podría indicar un defecto en la utilización de este ácido orgánico por parte de la microbiota intestinal, en estas condiciones.

Al valorar el pH de los contenidos lumbales, se comprueba que se produce una acidificación de los mismos tras el tratamiento de los animales con los dos tipos de fibra, si bien los FOS consiguen que este cambio se produzca tanto en el ciego como en el colon, y el salvado únicamente en el ciego.

Estos datos de pH no se pueden correlacionar con los de los AGCC en los animales tratados con FOS o salvado de arroz. En primer lugar, aunque la fermentación de FOS incrementa la cantidad de AGCC, no se encuentran diferencias de pH entre el ciego y el colon. En segundo lugar, en los animales tratados con salvado de arroz, la mayor cantidad de AGCC observados en el colon se relaciona con un pH menos ácido aún que en el ciego, dato que coincide con el observado por Bird *et al.* (2000) para esta misma fibra. En cambio, sí se observa una coincidencia en ambas fibras con un mayor número de lactobacilos. Se conoce que entre los productos de fermentación de estas bacterias se encuentran, además de los AGCC, otros ácidos orgánicos, cuyo principal representante es el lactato (Le Blay *et al.*, 1999). El ácido láctico es un ácido más fuerte ( $pK_a = 3.86$ ) que los ácidos butírico ( $pK_a = 4.82$ ), propiónico ( $pK_a = 4.87$ ) o acético ( $pK_a = 4.76$ ) (Andresen, 2001). Teniendo en cuenta que los lactobacilos producen en su fermentación gran cantidad de lactato y que no disponen de los mecanismos enzimáticos necesarios para producir butirato (Morrison *et al.*, 2006), el lactato parece ser el responsable de la acidificación de los contenidos intestinales cuando existe una mayor presencia de lactobacilos.

---

### **3- EFECTO ANTINFLAMATORIO INTESTINAL DE LAS FIBRAS ESTUDIADAS: FOS Y SALVADO DE ARROZ.**

*El salvado de arroz y los FOS reducen la infiltración leucocitaria y el estrés oxidativo en el modelo de colitis por TNBS en rata.*

La producción de AGCC y la capacidad de modular la microbiota colónica observadas en los dos tratamientos estudiados puede ser de gran utilidad para el tratamiento de diferentes patologías intestinales. En este sentido, se ha implicado en gran medida a la microbiota intestinal y al butirato en la fisiopatología de la EII (Shanahan, 2000). Los tratamientos con probióticos y con enemas de butirato han sido capaces de obtener una mejoría en pacientes de EII (Tamboli, 2003; Scheppach, 1996). Por este motivo, decidimos evaluar la actividad que presentan los FOS y el salvado de arroz en un modelo de colitis experimental. Seleccionamos la colitis experimental por TNBS en rata, que es un modelo ampliamente utilizado por sus similitudes histológicas e inmunológicas con la EC (Mañé, 2007). Fue descrito inicialmente por Morris *et al.* (1989), que administraban 30 mg del hapteno TNBS, pero en nuestro grupo de investigación reducimos esa dosis a 10 mg, consiguiendo un proceso intestinal con un mayor margen de manejabilidad. Este modelo experimental se basa en la hipótesis de que en la EC se produce un aumento en la permeabilidad de la mucosa que facilitaría el contacto de la lámina propia con antígenos presentes en la luz intestinal. El TNBS es un hapteno que, al unirse a sustancias de suficiente tamaño molecular, adquiere la capacidad de inducir una respuesta inmune (Aceituno y Panés, 2005). El etanol actúa como destructor de la barrera mucosa, facilitando que el TNBS penetre en la pared del colon y origine una respuesta inflamatoria.

Este modelo está especialmente indicado en nuestro caso ya que en el desarrollo de la inflamación que se produce tras la instilación intracolónica de TNBS están implicados en gran medida los microorganismos presentes en la luz intestinal, porque se comprobó que la administración de TNBS a animales libres de gérmenes presenta una respuesta inflamatoria atenuada (García-Lafuente *et al.*, 1997). Además, una de las consecuencias observadas en esta colitis es el descenso en la producción de AGCC en los contenidos lumbinales (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002).

Diferentes autores defienden la hipótesis de que para conseguir el efecto antiinflamatorio es preferible la elección de un tipo de fibra parcialmente fermentable, que libere butirato a lo largo de todo el colon y no sólo en la región proximal (Redondo, 2002a). Hemos visto que el perfil de fermentación de las fibras permite que se incremente la concentración de AGCC en el intestino grueso, pero en el caso del salvado de arroz más lentamente que en los FOS. Por esto, otro de los aspectos interesantes es comprobar si se obtiene un efecto antiinflamatorio en este modelo, en el que el daño se localiza en la parte distal del colon.

La inflamación en la mucosa se caracteriza por una acumulación de líquido y células inflamatorias, que son reclutadas gracias a ciertas sustancias liberadas desde el foco inflamatorio. Para evaluar el estado inflamatorio de nuestros animales utilizamos datos macroscópicos como la longitud del daño o el engrosamiento del colon. Posteriormente, para profundizar en este proceso inflamatorio empleamos diferentes marcadores bioquímicos:

a) Actividad MPO: es una enzima localizada en los neutrófilos polimorfonucleares (Kruidenier *et al.*, 2003) y su actividad nos indica la presencia de estas células en la mucosa.

b) LTB<sub>4</sub>: es un eicosanoide con capacidad para reclutar y activar leucocitos al foco inflamatorio (Lobos *et al.*, 1987) y tiene un importante papel en la amplificación y desarrollo de la colitis.

c) Glutacion total: es un tripéptido con función antioxidante, cuyo valor no informa sobre el estado oxidativo del tejido (Gálvez *et al.*, 2000).

d) iNOS: es la enzima responsable de la sobreproducción de NO observada en la inflamación intestinal (Pavlick *et al.*, 2002) y su inhibición se ha descrito como beneficiosa para el estado inflamatorio (Hogaboam *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la eficacia terapéutica de la fibra en la inflamación intestinal, demostrada tanto en humanos (Fernández-Bañares *et al.*, 1999; Hallert *et al.*, 1991; Mitsuyama *et al.*, 1998), como en animales (Kanauchi *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2004). Así, los dos tratamientos ensayados, FOS y salvado de arroz, lograron un efecto antiinflamatorio intestinal, evidenciado por la reducción en la relación peso/longitud del colon. En el caso de los FOS, su suplementación dietética consiguió, además, reducir la extensión de la longitud del daño y el índice de daño macroscópico.

En cuanto a los parámetros bioquímicos evaluados, ambos tratamientos obtienen resultados positivos en cuanto a la actividad MPO, expresión de LTB<sub>4</sub> y contenido en glutacion. En el caso de los FOS, a todas estas acciones hay que sumar una reducción en la expresión de la enzima iNOS.

La presencia en la mucosa de la enzima MPO es un indicio de la existencia de neutrófilos infiltrados. Estas células son reclutadas al foco inflamatorio, desde las primeras fases del proceso inflamatorio, por la acción de sustancias quimiotácticas como el LTB<sub>4</sub>. Este eicosanoide incrementó su expresión en las ratas colíticas con respecto al blanco, y esto se relacionó con la mayor actividad MPO, debido a los

neutrófilos infiltrados en la mucosa. El hecho de que nuestros dos tratamientos consiguieran reducir los valores de MPO y LTB<sub>4</sub> indica que intervienen desde los procesos iniciales, previniendo la infiltración leucocitaria y actuando, por tanto, en la fase aguda de la inflamación.

Existe una amplia evidencia experimental y clínica que postula que en el intestino inflamado los neutrófilos tienen un importante papel en el desencadenamiento del estrés oxidativo. Estas células sintetizan MPO para producir ácido hipocloroso con función defensiva. Esta enzima contribuye intensamente al daño tisular durante la inflamación intestinal (Krudernier *et al.*, 2003). El presente estudio muestra que el daño oxidativo resulta en una depleción de glutatión, al igual que ocurre en la IBD humana (Holmes *et al.*, 1998; Miralles-Barrachina *et al.*, 1999) y en otros modelos animales de colitis (Damiani *et al.*, 2007; Cetinkaya *et al.*, 2005). Teniendo esto en cuenta, una reducción en la actividad MPO junto con una restauración de los niveles de glutatión puede ser interpretado como una manifestación del efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por las fibras estudiadas en este modelo de colitis experimental.

El proceso de cronicación se caracteriza por la infiltración de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Los macrófagos desempeñan un papel clave en este proceso por la cantidad de sustancias biológicamente activas que pueden producir, y que pueden resultar destructivas si se producen de modo descontrolado. Los linfocitos también migran al tejido, atraídos por sustancias quimiotácticas producidas por los macrófagos. A su vez secretan citocinas y cronifican la reacción inflamatoria (Sartor, 1997).

De las dos fibras ensayadas, sólo el tratamiento con FOS fue capaz de inhibir la expresión de iNOS. Esta enzima se encuentra inducida en la inflamación y es

producida fundamentalmente por los macrófagos presentes en la mucosa colónica como mecanismo defensivo (Camuesco *et al.*, 2004). Este dato indica que los FOS al reducir la activación de estas células, pueden también tener acción en el proceso crónico de la inflamación, y no sólo en la fase aguda. El NO, producido en grandes cantidades, tiene un efecto perjudicial para el tejido. Este compuesto reacciona con radicales superóxido ( $O_2^-$ ) para dar peroxinitrilo ( $ONOO^-$ ), que es el oxidante más potente conocido (Alderton *et al.*, 2000). Por tanto, la menor expresión de iNOS puede ser una explicación a la reducción en el estrés oxidativo observado en las ratas tratadas con FOS.

La inhibición de la expresión de iNOS observada en los animales tratados con FOS puede deberse a la reducción observada en el infiltrado celular, ya que se obtienen menores concentraciones de MPO y  $LTB_4$ . Esto podría tener como consecuencia una menor presencia de macrófagos en el tejido inflamado. Otra posible explicación a la acción de los FOS sobre la expresión de iNOS es una actuación directa sobre los macrófagos. Esta parece una explicación más plausible, teniendo en cuenta que el salvado de arroz no presentó actividad en este parámetro, pero si tuvo similar efecto en cuanto a los otros parámetros bioquímicos, como son la concentración de MPO o  $LTB_4$ .

***Sólo los FOS incrementan la producción de butirato y restauran el equilibrio en la microbiota colónica de las ratas tratadas con TNBS.***

La instilación intracolónica de TNBS produjo también un deterioro en la producción intestinal de AGCC, de forma similar a lo observado en trabajos anteriores (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002; Perán *et al.*, 2006). Los dos tratamientos estudiados estimulan la producción de butirato y propionato, aunque sólo se obtienen diferencias significativas con respecto al control en el caso de los FOS. Cabe

destacar que, al igual que se observó en la ratas sanas, ambas fibras elevaron la proporción relativa de butirato, en detrimento de la de acetato.

Sumado a esto, se observa que el proceso inflamatorio generado por el TNBS se asocia con la modificación de la microbiota colónica. Este es un aspecto de la fisiopatología de este modelo de TNBS que no estaba aún descrito en la literatura científica. En los animales colíticos se obtienen valores inferiores de recuento de lactobacilos ( $p \approx 0,1$  vs. blanco) y de bifidobacterias ( $p < 0,05$  vs. blanco), mientras que los valores de enterobacterias y coliformes se mantienen. Los dos primeros géneros se consideran como beneficiosos para el hospedador, a la vez que los otros dos se consideran como potencialmente perjudiciales en la inflamación intestinal (Gibson y Wang, 1994; Campbell, 1997). Nuestros resultados indican que la acción del TNBS tiene como consecuencia que la relación entre bacterias beneficiosas y potencialmente patógenas decrezca hasta 7 veces con respecto a los animales no colíticos.

El papel prebiótico de los FOS parece claro, dado que su administración restaura el equilibrio en la microbiota colónica y que el descenso de lactobacilos y bifidobacterias causado por el tratamiento con TNBS no se observa en las ratas alimentadas con estas fibras. En el caso de los FOS esta actividad ya fue puesta de manifiesto por Cherbut *et al.* (2003), en cuyo trabajo en el modelo de TNBS en rata se observó que el efecto antiinflamatorio de la administración oral de FOS era superior a la de la administración directa en el colon de AGCC. Esta fermentación colónica parece ser también necesaria para conseguir actividad antiinflamatoria. La falta de esta fermentación es, probablemente, la causa por la que los FOS no mostraran actividad en el modelo de DSS en rata (Moreau *et al.*, 2003). El tratamiento con FOS sí obtuvo un efecto positivo cuando se probó este modelo de colitis en ratones (Winkler *et al.*, 2007). Este trabajo, además, es el primero en el que

se observa que los FOS pueden ejercer su efecto beneficioso tras la instauración del daño.

El salvado de arroz no muestra tan claramente su efecto prebiótico. Aunque la suplementación de esta fibra en animales sanos consiguió estimular el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias, en los animales colíticos sólo presenta cierta actividad en el crecimiento de lactobacilos, sin modificar las bifidobacterias o la relación bacterias beneficiosas/potencialmente patógenas.

El mayor efecto prebiótico observado en los animales tratados con FOS puede justificar su mayor actividad antiinflamatoria intestinal. Esto puede deberse a diferentes causas:

a) Existe una mayor producción de butirato, que puede tener un efecto antiinflamatorio mediante la inhibición de quimiocinas y citocinas. En este sentido hemos observado *in vitro* su capacidad para inhibir la liberación de IL-8 por parte de los colonocitos. Diferentes estudios han profundizado en el mecanismo de acción del butirato. Por un lado, se ha visto que este AGCC inhibe la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en diferentes células inmunitarias, siendo de gran importancia dado su papel en la transcripción de numerosos genes de citocinas y enzimas inducibles, como iNOS, COX-2 y algunas metaloproteínas (Comalada et al., 2005; Rogler *et al.*, 1998). Por otro lado, el butirato refuerza la función barrera del epitelio mediante el incremento en la producción de moco (Finnie *et al.*, 1995) y la estabilización de las uniones entre los colonocitos (Bordin *et al.*, 2004).

b) Son capaces de inducir una modulación de la flora bacteriana. Diferentes especies de lactobacilos y bifidobacterias han descrito su efecto beneficioso en la inflamación intestinal por diferentes mecanismos independientes de la fermentación de fibra, como la competición con bacterias patógenas por la colonización de la luz

intestinal o la optimización de la respuesta inmunitaria, mediante la acción directa sobre las células implicadas en el proceso inflamatorio (Kleesen *et al.*, 2001).

***Los AGCC producidos in vivo por los FOS inhiben la proliferación en cultivos no diferenciados de HT-29, sin afectar a la regeneración del tejido inflamado de ratas colíticas.***

Una vez comprobada la capacidad fermentativa de los FOS, tanto en ratas sanas como en colíticas, y el papel de los AGCC sobre la proliferación en la línea de adenocarcinoma HT-29, parece claro que la inclusión de una fibra fermentable en la dieta puede conseguir un efecto preventivo en la progresión de EII a cáncer de colon. Este fue el motivo por el que nos planteamos evaluar la capacidad antiproliferativa de los AGCC, producidos *in vivo*, sobre las células HT-29. Los resultados corroboraron que estos AGCC, resultantes de la fermentación bacteriana de los FOS, inhiben la proliferación en los cultivos no diferenciados. Esta actividad es análoga a que observamos en los AGCC obtenidos comercialmente sobre esas células. En cambio la menor producción de AGCC en las ratas tratadas con celulosa no fue capaz de obtener este efecto. Por último, en los cultivos diferenciados se obtuvo también el mismo resultado que con el butirato y el propionato comerciales, y los productos de la fermentación de los FOS no alteraron la proliferación en estas células.

Puede plantearse la duda sobre si la fermentación colónica de la fibra puede generar otros compuestos capaces de actuar sobre la proliferación celular. Sin embargo, al coincidir los resultados en los ensayos *in vitro*, sobre células HT-29, de los homogenados obtenidos de la luz intestinal de ratas alimentadas con FOS con los AGCC obtenidos de una casa comercial, podemos extrapolar que los AGCC son los

responsables de la inhibición de la proliferación, y no otros compuestos presentes en los contenidos colónicos.

Una vez visto su efecto antiproliferativo, se plantea la pregunta de si los AGCC producidos en la fermentación de los FOS pueden perjudicar la proliferación de las células encargadas de regenerar el epitelio intestinal dañado. Por otra parte, dado que el butirato es la principal fuente de energía de los colonocitos para crecer y proliferar, y se ha postulado que el defecto en su metabolización puede estar implicado en la patogénesis de CU (Chapman *et al.*, 1994; 1995). Diferentes estudios han mostrado que el incremento en los niveles de butirato puede mantener en remisión a pacientes de EII al promover la proliferación celular en la mucosa y acelerar su proceso de regeneración en modelos animales (Tuohy *et al.*, 2003).

En la EII se observa un incremento en la proliferación celular para restablecer la integridad de mucosa perdida y una inhibición de esta función celular dificultará la recuperación del tejido. Para resolver esta duda estudiamos la expresión, mediante Western Blot, de PCNA, que es una proteína no-histona de 36 Kd y de 261 aminoácidos con alto contenido en ácido glutámico y aspártico. La acción del PCNA en la proliferación celular se basa en la función que esta proteína ejerce sobre algunas formas de ADN polimerasa. (Kubben *et al.*, 1994; Mata *et al.*, 1993). Por tanto, la determinación de la expresión de PCNA es un buen marcador de proliferación celular y un indicador de regeneración intestinal (Waseem y Lane, 1990).

Nuestros resultados indicaron que en el colon de los animales colíticos controles se incrementó la expresión de PCNA, como consecuencia del proceso de regeneración tisular. Por su parte, los AGCC producidos *in vivo* por la fermentación de los FOS no impiden la regeneración epitelial, ya que la expresión de PCNA se

mantiene constante, con respecto a los animales tratados con fibra no fermentable. Esto confirma los resultados obtenidos sobre la línea epitelial colónica no tumoral FHC y sugiere que la acción del butirato y del propionato sobre la proliferación celular se dirige específicamente a los colonocitos neoplásicos.

Analizando todos los datos, la administración de FOS podría ser una buena estrategia que complementara el arsenal terapéutico disponible para la EII. Presenta un efecto sobre los procesos agudo y crónico de la inflamación, debido posiblemente a su capacidad de fermentación, que produce en la luz intestinal un incremento en la concentración de butirato y un restablecimiento de la microbiota.

## **CONCLUSIONES**

---



### **Conclusiones**

- 1- El butirato inhibe la proliferación y la viabilidad celular in vitro en células tumorales HT-29 sin afectar a estas células cuando están diferenciadas ni a células epiteliales normales.
- 2- Fibras fermentables como FOS y salvado de arroz presentan actividad antiinflamatoria intestinal.
- 3- Los FOS presentan un mejor perfil antiinflamatorio como consecuencia de su mejor fermentabilidad, que lleva a una mayor producción de butirato y una mejora en la microbiota saprofitica intestinal.
- 4- El tratamiento con FOS no modifica la capacidad regenerativa del epitelio intestinal inflamado.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



**Referencias bibliográficas**

- AACC Dietary Fiber Technical Committee. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* 2001, 46, 112-126.
- Abreu, M.T. Immunologic regulation of toll-like receptors in gut epithelium. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2003, 19, 559-564.
- Aceituno, M., Panés, J., Patogenia e inmunoterapia en la EII: lecciones de los modelos animales. *Gastroenterol. Hepatol.* 2005, 28, 576-579.
- Aiko, S., Grisham, M. B., Spontaneous intestinal inflammation and nitric oxide metabolism in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology* 1995, 109, 142–150.
- Aiko, S., Fuseler, J., Grisham, M. B., Effect of nitric oxide synthase inhibition of sulfasalazine on the spontaneous colitis observed in HLA-B27 transgenic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998, 284, 722–727.
- Akira, S.H., Takeda, K., Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. immunol.* 2001, 16, 277-309.
- Alberts, D.S., Martinez, M.E., Roe, D.J., *et al.*, Lack of effect of a high fibre cereal supplementation on recurrence of colorectal adenomas: Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians Network. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, 1156–1162.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001, 357, 593-615.
- Allan, E. S., Winter, S., Light, A. M., Allan, A., Mucosal enzyme activity for butyrate oxidation; no defect in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1996, 38, 886–893.
- Anderson, M. E., Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth. Enzimol.* 1985, 113, 548-555.
- Andoh, A., Fujiyama, Y., Hata, K., Araki, Y., *et al.*, Counterregulatory effect of sodium butyrate on tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1999, 118, 23–29.
- Andresen, H. Vacas secas y en Transición. *Rev. investig. vet. Perú* 2001, 12, 36-48.
- Andus, T., Gross, V., Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors. *Hepatogastroenterology* 2000, 47, 29–43.

- Augeron, C., Laboisse, C.L. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* 1984, 44, 3961–3969.
- Bach Knudsen, S.E., Serena, A., Canibe, N., Juntunen, K.S. New insight into butyrate metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 2003, 62, 81-86.
- Bañuelos, O., Ronchel, M.C., Adrio, J.L., Velasco, J. Screening of microorganism for enzymatic biosynthesis of nondigestible oligosaccharides. En: Barredo, J.L. (ed) *Methods in Biotechnology*. Vol. 17: *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Humana Press Inc. 2003 Tokowa N.J.(EEUU)
- Bassaganya-Riera, J., Reynolds, K., Martino-Catt, S., Cui, Y., *et al.*, Activation of PPAR- $\alpha$  and - $\delta$  by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004, 127, 777–791.
- Bell, C.J., Gall, D.G., Wallace, J.L., Disruption in colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am. J. Physiol.* 1995, 268, G622-G630.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brook, M.J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *J. Biol. Chem.* 1946; 164, 321–329.
- Beutler, B., TLR4: Central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, 12, 20-26.
- Bingham, S.A., Day, N.E., Luben, R., *et al.*, Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003, 361, 1496–1501.
- Bird, A.R., Hayakawa, T., Marsono Y., Gooden J. M., *et al.* Coarse Brown Rice Increases Fecal and Large Bowel Short-Chain Fatty Acids and Starch but Lowers Calcium in the Large Bowel of Pigs. *J. Nutr.* 2000, 130, 1780–1787.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2003, 54, 519-546.
- Boffa, L. C., Lupton, J. R., Mariani, M. R., Ceppi, M., *et al.*, Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. *Cancer Res.* 1992, 52, 5906–5912.
- Bordin, M., D'Atri, F., Guillemot, L., Citi, S. Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins. *Mol. Cancer Res.* 2004, 12, 692-701.

- Borrueal, N., Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: Inmunomodulación. *Gastroenterol. Hepatol.* 2003, 26, 13-22.
- Breuer, R. I., Soergel, K. H., Lashner, B. A., Christ, M. L., *et al.*, Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomized, placebo controlled trial. *Gut* 1991, 40, 485–491.
- Brew, R., Erikson, J.S., West, D.C., Flanagan, B.F., Christmas, S.E. Interleukin-8 as a growth factor for human colorectal carcinoma cells in vitro. *Biochem. Soc. Trans.* 1997, 25, 264S.
- Brew, R., Erikson, J.S., West, D.C., Kinsella AR, *et al.* Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 2000, 12, 78-85.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M, *et al.* The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 2003, 278, 11312-11319.
- Brown, G.D., Gordon, S. A new receptor for  $\beta$ -glucans. *Nature* 2001, 413, 36-37.
- Burkitt, D.P., Trowell, H. *Some implications of dietary fibre.* Academic, London 1975.
- Camuesco, D., Comalada, M., Concha, A., Nieto, A., *et al.* Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin. Nutr.* 2006, 25, 466-476.
- Camuesco, D., Comalada, M., Rodríguez-Cabezas, M. E., Nieto, A., *et al.* The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br. J. Pharmacol.* 2004, 143, 908 –918.
- Camuesco, D., Gálvez, J., Nieto, A., Comalada, M., *et al.* Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. *J. Nutr.* 2005(a), 135, 687-694.
- Camuesco D, Peran L, Comalada M, Nieto A, *et al.* Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2005(b), 11, 265-271.
- Campbell, J.M., Fahey, G.C., Wolf, B.W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.* 1997, 127, 130-136.

- Cavaglieri, C. R., Nishiyama, A., Fernandes, L. C., Curi, R., *et al.*, Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci.* 2003, 73, 1683 – 1690.
- Cetinkaya, A., Bulbuloglu, E., Kurutas, E.B., Ciralik, H., *et al.* Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 2005, 206, 131-139.
- Chapman, M. A., Grahn, M. F., Boyle, M. A., Hutton, M., *et al.*, Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut* 1994, 35, 73–76.
- Chapman, M. A., Grahn, M. F., Hutton, M., Williams, N. S., Butyrate metabolism in the terminal ileal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Br. J. Surg.* 1995, 82, 36–38.
- Cherbut, C., Michel, C., Lecannu, G., The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J. Nutr.* 2003, 133, 21-27.
- Cherayil, B.J. How not to get bugged by bugs: mechanism of cellular tolerance to microorganisms. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2003, 19, 849-855.
- Chey, W. Y., Infliximab for patients with refractory ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2001, 7, S30–S33.
- Clausen, M. R., Mortensen, P. B., Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut* 1995, 34, 684–689.
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., *et al.* *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005, 35, 584-592.
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., Sedergran, D. J., Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 1993, 69, 238–249.
- Cosgrove, D.J., Growth of the plant cell wall. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6, 850-861.
- Cordon-Cardo, C., Prives, C., At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1397-1402.

- Crespo, M.E., Galvez, J., Cruz, T., Ocete, M.A., Zarzuelo, A. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med.* 1999, 65, 651-653.
- Cruz, T., Gálvez, J., Crespo, E., Ocete, M.A., Zarzuelo, A. Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med.* 2001, 67, 94-96.
- Cruz, T., Gálvez, J., Ocete, M.A., Crespo, M.E., *et al.*, Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowell disease in rats, *Life Sci.* 1998, 62, 687-695.
- Cruz-Bustillo, C., Molecular genetics of colorectal cancer, *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2004, 96, 48-59.
- Cummings, J.H., Branch, W.J., Fermentation and the production of short-chain fatty acids in the human intestine. En: *Dietary fiber: Basic and clinical aspects.* Vahouny, G.V., Kritchevsky, D. (eds.) pp. 131-152. New York: Plenum, 1986.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Xue, S.B., Melamed, M.R. Effect of n-butyrate on cell cycle progression and in situ chromatin structure of L1210 cells. *Exp. Cell. Res.* 1981, 136, 279–293.
- Damiani, C.R., Benetton, C.A., Stoffel, C., Bardini, K.C., Cardoso, V.H., Di Giunta, G., Pinho, R.A., Dal-Pizzol, F., Streck, E.L. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007
- Davies, P. S., Rhodes, J., Maintenance of remission in ulcerative colitis with sulphasalazine or a high-fibre diet: a clinical trial. *Br. Med. J.* 1978, 1, 1524 – 1525.
- Deis, C. D., Functional ingrediets from rice. *Food Prod. Desing* 1997, 1, 45-56.
- Den Hond, E., Hiele, M., Evenepoel, P., Peeters, M., *et al.*, In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998, 115, 584 – 590.
- Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J. Lactate-utilising bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 5810–5817.
- Engelhardt, W., Busche, R., Gross, G., Recchkemmer, G. Absortion of short chain fatty acids. mechanism and regional differences in the large intestine. En:

- Cummings, J.H. *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids* 1991, 60-62. Cambridge university press. Cambridge (UK).
- El Oufir, L., Barry, J.L., Flourié, B., Cherbut, C., et al., Relationship between transit time and in vitro fermentation of dietary fiber by fecal bacteria. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2000, 54, 603-609.
- Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S., Riddell, R. H., Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995, 109, 1344–1367.
- Farrell, R. J., Peppercorn, M. A., Ulcerative colitis. *Lancet* 2002, 359, 331–340.
- Fernandez-Bañares, F., Hinojosa, J. L., Sanchez-Lombrana, J. L., Navarro, E., et al., Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 1999, 94, 427–433.
- Field, C.J., McBurney, M.I., Massimino, S., Hayek, M.G., Sunvold G.D. The fermentable fiber content of the diet alters the function and the composition of canine gut associated lymphoid tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, 72, 325-341.
- Finnie, I.A., Dwarakanath, A.D., Taylor B.A., Rhodes, J.M. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* 1995, 36, 93-99.
- Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease pathogenesis: therapeutic implications *Chin. J. Dig. Dis.* 2005, 6, 6-9.
- Flickinger, E.A., Hatch, T.F., Wofford, R.C., Grieshop, C.M., et al. *In vitro* fermentation properties of selected fructooligosaccharide-containing vegetables and *in vivo* colonic microbial populations are affected by the diets of healthy human infants. *J. Nutr.* 2002, 132, 2188-2194.
- Flickinger, E.A., Van Loo, J., Fahey, G.C., nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domestic animals: a review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 2003, 43, 19-60.
- Folino, M., McIntyre, A., Young, G.P., Dietary fiber differ in their effects on large bowel epithelial proliferation and fecal fermentation-dependent events in rats. *J. Nutr.* 1995, 125, 1521-1528.
- Foss, F.M., Veillette, A., Sartor, O., Rosen, N., Bolen, J.B., Alterations in the expression of pp60c-src and p56lck associated with butyrate-induced differentiation of human colon carcinoma cells. *Oncogene Res.* 1989, 5, 13–23.

- Fukushima M., Fujii, S., Yoshimura, Y., Endo T., Nakano M. Effect of rice bran on intestinal fermentation and cholesterol metabolism in cecectomized rats. *Nutr. Research* 1999-A, 19, 235-245.
- Fukushima, Y., Kawata, Y., Mizumachi, K., Kurisaki, J., Mitsuoka, T. Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. *Int. J. Food Microbiol.* 1999-B, 46, 193-197.
- Gálvez, J., de Souza, J., Camuesco, D., Vilegas, W., *et al.* Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. *Fitoterapia* 2006, 77, 515-520.
- Galvez J, Coelho G, Crespo ME, Cruz T, *et al.* Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2001, 15, 2027-2039.
- Gálvez, J., Cruz, T., Crespo, E., Ocete, M.A., *et al.* Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Med.* 1997, 63, 409-414.
- Gálvez, J., Garrido, M., Merlos, M., Torres, M.I., Zarzuelo, A. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 2000, 130, 1949-1959.
- García-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F., Crespo, E., *et al.* Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am. J. Physiol.* 1997, 272, G10–G15.
- García-Peris, P., *La fibra en la alimentación: Ámbito hospitalario.* Edikamed. Barcelona, 2004.
- Gibson, G., Wang, X., Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bifidobacteria. *L. Nutr.* 1994, 129, 113-116.
- Gibson, P.R., Moeller, I., Kagelari, O., *et al.* Contrasting effects of butyrate on differentiation of neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1992, 7, 165-172.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., *et al.*, Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000, 119, 305 –309.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., *et al.*, Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a doubleblind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003, 124, 1202–1209.

- Godaly, G., Bergsten, G., Hang, L., Fischer, H. *et al.* Neutrophil recruitment, chemokine receptors, and resistance to mucosal infection. *J. Leukoc. Biol.* 2001, 69, 899-906.
- Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, *et al.* Molecular biology of colorectal cancer. *Curr. Probl. Cancer* 1997 21, 233–300.
- Griffiths, S.D., Clarke, A.R., Healy, L.E., Ross, G., Absence of p53 permits propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene* 1997, 14, 523-531.
- Grisham, M.B., Olkmer, C., Tso, P., Yamada, T., Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by rat colon produces reactive oxygen species. *gastroenterology* 1991, 101, 540-547.
- Guarner, F., Malagelada, J. R., Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512–519.
- Hague, A., Paraskeva, C., The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *Eur. J. Cancer Prev.* 1995, 4, 359–364.
- Hallert, C., Kaldma, M., Petersson, B. G., Ispaghula husk may relieve gastrointestinal symptoms in ulcerative colitis in remission. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991, 26, 747–750.
- Hallert, C., Bjorck, I., Nyman, M., Pousette, A., *et al.*, Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflamm. Bowel Dis.* 2003, 9, 116 – 121.
- Hammer, R. E., Maika, S. D., Richardson, J. A., Tang, J. P., *et al.*, Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human b2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990, 63, 1099–1112.
- Hanai, H., Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Andoh, A., *et al.*, Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. *Int. J. Mol. Med.* 2004, 13, 643–647.
- Hart, A. L., Stagg, A. J., Kamm, M. A., Use of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2003, 36, 111–119.
- Haza, A.I., Glinghammar, B., Grandien, A., Rafter, J. Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr. Cancer* 2000, 36, 79-89.

- Heredia, A., Jimenez, A., Guillen, R. Z. Composition of plant cell walls. *Lebensm. Unters. Forsch.* 1995, 200, 24-31.
- Herre, J., Gordon, S., Brown, G.D. Dectin-1 and its role in recognition of  $\beta$ -glucans by macrophages. *Mol. Immunol.* 2004, 40, 869-876.
- Higa, A., McKnight, W., Wallace, J.L., Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators. *Eur. J. Pharmacol.* 1993, 239, 171-176.
- Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. K. T., Archer, S. Y., *et al.* The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J. Nutr.* 2002, 132, 1012-1017.
- Hipsley, E. H. Dietary "fibre" and pregnancy toxemia. *Brit. Med. J.* 1953, 2, 420-425.
- Ho, G.T., Chiam, P., Drummond, H., Loane, J., *et al.* The efficacy of corticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: analysis of a 5-year UK inception cohort. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2006, 24, 319-330.
- Hoentjen, F., Welling, G. W., Harmsen, H. J., Zhang, X., *et al.*, Reduction of Colitis by Prebiotics in HLA-B27 Transgenic Rats Is Associated with Microflora Changes and Immunomodulation. *Inflamm. Bowel Dis.* 2005, 11, 977-985.
- Hogaboam, C.M., Jacobson, K., Collins, S.M., Blennerhassett, M.G. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am. J. Physiol.* 1995, 268, G673-684.
- Holma, R., Juvonen, P., Asmawi, M. Z., Vapaatalo, H., *et al.*, Galacto-oligosaccharides Stimulate the Growth of Bifidobacteria but Fail to Attenuate Inflammation in Experimental Colitis in Rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 2002, 37, 1042-1047.
- Holmes, E.W., Yong, S.L., Eiznhamer, D., Keshavarzian, A. Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 1998, 43, 1088-1095.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 41, 85-101.
- Houdijk, J.G., Bosch, M.W., Tamminga, S., Verstegen, M.W., *et al.* Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. *J. Anim. Sci.* 1999, 77, 148-158.

- Huang, N., Katz, J. P., Martin, D. R., Wu, G. D., Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine* 1997, 9, 27–36.
- Ichikawa, H., Shineba, R., satomi, S., sakata, T. Gastric or rectal instillation of short-chain fatty acids stimulates epithelial cell proliferation of small and large intestine in rats. *Dig. Dis. Sci.* 2002, 47, 1141-1146.
- Inan, M. S., Rasoulpour, R. J., Yin, L., Hubbard, A. K., *et al.*, The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF- $\kappa$ B activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 2000, 118, 724–734.
- ILSI (International Life Sciences Institute). FUFUSE: scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus Document. *Br. J. Nutr.* 1999, 81, 1-27.
- James, S. L., Muir, J. G., Curtis, S. L., Gibson, P. R., Dietary fiber: a roughage guide. *Int. Med. J.* 2003, 33, 291–296.
- Jacobasch, G., Schmiedl, D., Kruschewski, M., Schmehl, K., Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases. *Int. J. Colorectal. Dis.* 1999, 14, 201-211.
- Jourd'heuil, D., Grisham, M.B., Granger, D.N. Nitric oxide and the gut. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 1999, 1, 384-388.
- Kanauchi, O., Andoh, A., Iwanaga, T., Fujiyama, Y., *et al.*, Germinated barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1999, 14, 1173–1179.
- Kanuchi, O., Iwanaga, T., Andoh, A., Araki, Y., *et al.*, Dietary fiber fraction of germinated barley foodsuff attenuated mucosal damage and diarrhea, and accelerated the repair of the colonic mucosa in experimental colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001 a , 16, 160-168.
- Kanauchi, O., Iwanaga, T., Mitsuyama, K., Germinated barley foodstuff feeding. A novel nutraceutical therapeutic strategy for ulcerative colitis. *Digestion* 2001 b, 63 (Suppl. 1), 60–67.
- Kanauchi, O., Suga, T., Tochihara, M., Hibi, T., *et al.*, Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial. *J. Gastroenterol.* 2002, 37 (Suppl. 14), 67–72.

- Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Homma, T., Takahama, K., *et al.*, Treatment of ulcerative colitis patients by long-term administration of germinated barley foodstuff: multi-center open trial. *Int. J. Mol. Med.* 2003 a, 12, 701–704.
- Kanauchi, O., Serizawa, I., Araki, Y., Suzuki, A., *et al.*, Germinated barley foodstuff, a prebiotic product, ameliorates inflammation of colitis through modulation of the enteric environment. *J. Gastroenterol.* 2003 b, 38, 134–141.
- Kaplan, H., Hutkins, R.W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 2682–2684.
- Kaplan H, Hutkins RW (2003) Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69,2217–2222
- Karaki, S.I., Mitsui, R., Hayashi, H., Kato, I., *et al.* Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell. Tissue. Res.* 2006, 1, 1-8.
- Katayama, K., Wada, K., Nakajima, A., Mizuguchi, H., *et al.* A novel PPAR-c gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 2003, 124, 1315–1324.
- Kim, Y.I. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 2000,118:1235-1257.
- Kimura, H., Miura, S., Shigematsu, T., Ohkubo, N., *et al.*, Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 1997, 42, 1047–1054.
- Kleessen, B., Hartmann, L., Blaut, M. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.* 2001, 86, 291-300.
- Kripke, S.A., Fox, A.D., Berman, J.M., Settle, R.G., *et al.*, Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short chain fatty acids. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 1989, 13, 109-116.
- Krok, K.L., Lichtenstein, G.R., Colorectal cancer in inflammatory bowel disease *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2004, 20, 43-48.
- Kruidenier, L., Kuiper, I., Van Duijn, W., Mieremet-Ooms, *et al.* Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* 2003, 201, 17-27.

- Kubben, F.J., Peeters-Haesevoets, A., Engels, L.G., Baeten, C.G., *et al.* Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut* 1994, 35, 530–535.
- Kurtovic, J., Segal, I., Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. *Trop. Gastroenterol.* 2004, 25, 9-14
- Kuves, P., Grisham, M.B., Barrowman, J.A., Gaginella, T., Granger, D.N., Leukocyte- induced vascular protein leakage in cat mesentery. *Am. J. Physiol.* 1991, 261, H1872-H1879.
- Lacatos, P.L., Fischer, S., Lakatos, L., Gal, I., Papp, J., Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take “toll” ? *World J. Gastroenterol.* 2006, 12, 1829-1841.
- Laroux, F. S., Pavlick, K. P., Wolf, R. E., Grisham, M. B., Dysregulation of intestinal mucosal immunity: implications in inflammatory bowel disease. *News Physiol. Sci.* 2001, 16, 272–277.
- Lee, S.K., Il Kim, T., Kim, Y.K., Choi, C.H., *et al.* Cellular differentiation-induced attenuation of LPS response in HT-29 cells is related to the down-regulation of TLR4 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 337, 457-463.
- Le Blay, G., Michel, C., Blottiere, H.M., Cherbut, C. Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J. Nutr.* 1999, 129, 2231-2235.
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.Y., *et al.*, Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol. Chem.* 2003, 278, 25481-25489.
- Leng-Peschlow, E. Plantago ovata seeds as dietary fibre supplement: physiological and metabolic effects in rats. *Br. J. Nutr.* 1991, 66, 331-349.
- Lin SY, Lin IS. Lignin. En: *Ullmann's encyclopaedia of industrial chemistry.* Weinheim (Alemania). 1990. Vol. A 15: 305-315.
- Lindsay, J.O., Whelan, K., Stagg, A.J., Gobin, P., *et al.*, Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut* 2006, 55, 348-355.
- Lim, C. C., Lynnette R. Ferguson, L. R., Tannock, G. W., Dietary fibres as “prebiotics”: Implications for colorectal cancer, *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 609–619.

- Liu S.C., Klein-Szanto A.J. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol.* 2000, 36:145-151.
- Lobos, E.A., Sharon, P., Stenson, W.F. Chemotactic activity in inflammatory bowel disease. Role of leukotriene B4. *Dig. Dis. Sci.* 1987, 32, 1380-1388.
- Loguercio, C., D'Argenio, G., Delle Cave, M., Costanza, V., *et al.*, direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 1996, 41, 1204-1211.
- Louis, P., Scott, K.P., Duncan S.H., Flint, H.J. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 102, 1197-1208.
- Luhrs, H., Gerke, T., Boxberger, F., Backhaus, K., *et al.*, Butyrate inhibits interleukin-1-mediated nuclear factor- $\kappa$ B activation in human epithelial cells. *Dig. Dis. Sci.* 2001-A, 46, 1968–1973.
- Luhrs, H., Gerke, T., Schaubert, J., Dusel, G., *et al.*, Cytokine-activated degradation of inhibitory kappaB protein alpha is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate. *Int. J. Colorectal Dis.* 2001-B, 16, 195–201.
- Luhrs, H., Gerke, T., Muller, J. G., Melcher, R., *et al.*, Butyrate inhibits NF- $\kappa$ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 2002, 37, 458–466.
- Luo, J., Rizkalla, S.W., Alamowitch, C., Boussairi, A., *et al.* Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996, 63, 939-945.
- MacDermott, R. P., Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 1996, 31, 907–916.
- MacDermott, R. P., Sanderson, I. R., Reinecker, H. C., The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 1998, 4, 54–67.
- Macfarlane, G.T., Cummings, J.H. Probiotics, infection and immunity. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002, 15, 501-506.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., *et al.*, Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001, 121, 580–591.

- Mañé, J. Modelos experimentales *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutr. Hosp.* 2007, 22, 178-189.
- Marchetti, C., Migliorati, G., Moraca, R., Riccardi, C., *et al.* Deoxycholic acid and SCFA-induced apoptosis in the human tumor cell-line HT-29 and possible mechanisms. *Cancer Lett.* 1997;114:97-99
- Martínez-Montiel, M. P., Muñoz-Yagüe, M. T., Tratamientos biológicos en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2006, 98, 265-291.
- Mata, A., Gomez de Segura, I.A., Diaz, J., Santamaria, L., *et al.* Importance of the colon in intestinal adaptation. Study with the proliferating cell nuclear antigen. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 1993, 84, 149-152.
- Mateu, X., *La fibra en la alimentación. Farmacia hospitalaria.* Edikamed. Barcelona. 2004.
- McCafferty, D.M., Rioux, K.J., Wallace, J.L. Granulocyte infiltration in experimental colitis in the rat is interleukin-1 dependent and leukotriene independent. *Eicosanoids* 1992, 5, 121-125.
- McCay, D.M., Good bug, bad bug: in the case of enteric inflammatory disease does the epithelium decide? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005, 100, Suppl 1, 205-210.
- McKevith, B., Inulin and oligofructose: feelgood factors for health and well-being. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin* 2004, 29, 164-167.
- Mikkelsen, L.L., Bach-Knudsen K.E., Jensen, B.B. *In vitro* fermentation of fructo-oligosaccharides and trans-galactooligosaccharides by adapted and unadapted bacterial populations from the gastrointestinal tract of piglets. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 2004, 116, 225-238.
- Milovic, V., Teller, I.C., Turchanowa, L., Caspary, W.F., Stein, J. Effect of structural analogues of propionate and butyrate on colon cancer cell growth. *Int. J. Colorectal Dis.* 2000, 15, 264-270.
- Miralles-Barrachina, O., Savoye, G., Belmonte-Zalar, L., Hochain, P., *et al.* Low levels of glutathione in endoscopic biopsies of patients with Crohn's colitis: the role of malnutrition. *Clin. Nutr.* 1999, 18, 313-317.
- Mitsuyama, K., Saiki, T., Kanauchi, O., Iwanaga, T., *et al.*, Treatment of ulcerative colitis with germinated barley foodstuff feeding: a pilot study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1998, 12, 1225-1230.

- Montagna, M. C., Riesco Eiguizaguirre, G., Villarroel Bajo, A., de Cos Blanco, A.I., *et al.* Alimentos Funcionales. En: Vázquez, C., de Cos, A.I., López-Nomdedeu, C. (Eds). *Alimentación y Nutrición* (2ª ed.) Ed. Díaz de Santos. Madrid. 2005.
- Monteleone, I., Vavassori, P., Biancone, L., Monteleone, G., Pallone, F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002, 50,60–64.
- Moore, W.E., Holdeman, L.V. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* 1974, 27, 961-979.
- Moreau, N. M., Martin, L. J., Toquet, C. S., Laboisie, C. L., *et al.*, Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructooligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Br. J. Nutr.* 2003, 90, 75–85.
- Moreau, N. M., Martin, L. J., Goupry, S. M., Le Bizec, B. J., *et al.*, Resistant starch modulates in vivo colonic butyrate uptake and its oxidation in rats with dextran sulfate sodium- induced colitis. *J. Nutr.* 2004, 134, 493-500.
- Morita, T., Tanabe, H., Sugiyama, K., Kasaoka, S, *et al.*, Dietary resistant starch alters the characteristics of colonic mucosa and exerts a protective effect on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004, 68, 2155-2164.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, W., Depew, W., *et al.*, Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989, 96, 795–803. *Br. J. Nutr.* 2006, 96, 570-577.
- Morrison, D.J., MacKay W.G., Edwards, C.A., Preston, T., *et al.* Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate?
- Mortensen, P. B., Clausen, M. R., Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 1996, 31, 132S–148S.
- Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., Kusaka, H., *et al.* Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T helper 1-like immune response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999, 63, 373-378.
- Nomura, A.M., Hankin, J.H., Henderson, B.E., Wilkens, L.R., *et al.* Dietary fiber and colorectal cancer risk: the multiethnic cohort study. *Cancer Causes Control* 2007.

- Nord, C.E., Kager, L. The normal flora of the gastrointestinal tract. *Neth. J. Med.* 1984, 27, 249-252.
- Ocete, M.A., Gálvez, J., Crespo, M.E., Cruz, T., *et al.* Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. *Pharmacology* 1998, 57, 261-270.
- Olano-Martín, E., Gibson, G.R., Rastall, R.A. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 93, 505-511.
- O'Mahony, L., Feeney, M., O'Halloran, S., Murphy, L., *et al.*, Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2001, 15, 1219–1225.
- Panja, A. A novel method for the establishment of a pure population of nontransformed human intestinal primary epithelial cell (HIPEC) lines in long term culture. *Lab. Invest.* 2000, 80, 1473-1475.
- Patz, J., Jacobsohn, W. Z., Gottschalk-Sabag, S., Zeides, S., *et al.*, Treatment of refractory distal ulcerative colitis with short chain fatty acid enemas. *Am. J. Gastroenterol.* 1996, 91, 731–734.
- Pavlick, K. P., Laroux, F. S., Fuseler, J., Wolf, R. E., *et al.* Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 33, 311–322.
- Perán, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., *et al.* Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J. Gastroenterol.* 2005, 11, 5185-5192.
- Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, *et al.* *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int. J. Colorectal Dis.* 2006, 21, 737-746.
- Peters U, Sinha R, Chatterjee N, *et al.*, Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* 2003, 361, 1491–1495.
- Podolsky, D. K., Fiocchi, C., Cytokines, chemokines, growth factors, eicosanoides and other bioactive molecules in inflammatory bowel disease, in: Kirsner, J. B. (Ed.), *Inflammatory Bowel Disease*, 5th Ed., W. B. Saunders, Philadelphia 2000, pp. 191–207.
- Potter, JD. Colorectal cancer: Molecules and population. *J. Nat. Cancer. Inst.* 1999; 91; 916-932.

- Present, D. H., Review article: the efficacy of infliximab in Crohn's disease-healing of fistulae. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1999, 13, 23–28.
- Qiao, H., Duffy, L.C., Griffiths, E., Dryja, D., *et al.* immune responses in rhesus rotavirus-challenged Balb/c mice treated with bifidobacteria and prebiotics supplements. *Pediatr. Res.* 2002, 51, 750-755.
- Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Okon, E., Bursztyn, M., Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut* 1995, 37, 247 – 255.
- Rastall, R.A., Bacteria in the Gut: Friends and Foes and How to Alter the Balance. *J. Nutr.* 2004, 134, 2022S–2026S.
- Rastall, R.A., Maitin, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr. Op. Biotech.* 2002, 13, 490–496.
- Raul, F., Simon, P.M., Kedinger, M., Grenier, J.F., Haffen, K., Separation and characterization of intestinal brush border enzymes in adult rats and in suckling rats under normal conditions and after hydrocortisone injections. *Enzyme* 1978, 23, 89-97.
- Reddy, N., Yang, Y., Properties of high-quality long natural cellulose fibers from rice straw. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 8077-8081.
- Redondo, L. Principales fuentes de fibra dietética de especial interés profiláctico y terapéutico. En: *La fibra terapéutica* Ed. Glosa. Barcelona. 2002-A, pp. 89-112.
- Redondo, L. Propiedades de la fibra dietética. En: *La fibra terapéutica* Ed. Glosa. Barcelona. 2002-B, pp. 29-51.
- Redgwell, R. J., Fischer, M., Dietary fiber as a versatile food component: An industrial perspective. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 421– 535.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 2001, 57, 929-967.
- Roediger, W. E.W., The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet* 1980, 2, 712–715.
- Roediger, W. E.W., Nance, S., Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. *Br. J. Exp. Pathol.* 1986, 67, 773 –782.
- Rodriguez-Cabezas, M. E., Galvez, J., Lorente, M. D., Concha, A., *et al.*, Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide

- production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *J. Nutr.* 2002, 132, 3263–3271.
- Rodriguez-Cabezas, M. E., Galvez, J., Camuesco, D., Lorente, M. D., *et al.*, Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (*Plantago ovata* seeds) in HLA-B27 transgenic rats. *Clin. Nutr.* 2003, 22, 463–471.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., *et al.* Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998, 115, 357–369.
- Ross, G.D., Vetvicka, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp. Immuno.* 1993, 92, 931-938.
- Rousset, M., The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie.* 1986, 68, 1035-1040.
- Ruemmele, F.M., Dionne, S., Qureshi, I., Sarma, D.S., *et al.* Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via upregulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Cell. Death. Differ.* 1999, 6, 729–735.
- Rutgeerts, P., D’Haens, G., Targan, S., Vasiliauskas, E., *et al.*, Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn’s disease. *Gastroenterology* 1999, 117, 761 –769.
- Rutgeerts, P., Van Deventer, S., Schreiber, S., Review article: the expanding role of biological agents in the treatment of inflammatory bowel disease – focus on selective adhesion molecule inhibition. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2003, 17, 1435–1450.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., *et al.* The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell. Biol. Toxicol.* 2005, 21, 1-26.
- Sánchez de Medina, F., Gálvez, J. Romero, J.A., Zarzuelo, A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 278, 771-779.
- Sanchez de Medina, F., Vera, B., Galvez, J., Zarzuelo, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci.* 2002, 70, 3097-3108.

- Sartor, R. B., Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 1997, 92, 5S–11S.
- Schley, PD., Field, CJ., The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br. J. Nutr.* 2002, 87, suppl. 2, S221-S230.
- Scheppach W, Bartram HP, Richter F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 1995, 31, 1077–1080.
- Scheppach, W., Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo controlled trial. *Dig. Dis. Sci.* 1996, 41, 2254 –2259.
- Schrezenmeir, J., de Vrese, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73, 361S-364S.
- Schultz, M., Veltkamp, C., Dieleman, L. A., Grenther, W. B., *et al.*, Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 2002, 8, 71 –80.
- Segain, J. P., Raingeard de la Bletiere, D., Bourreille, A., Leray, V., *et al.*, Butyrate inhibits inflammatory responses through NFjB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000, 47, 397–403.
- Sehgal, G., Zhang, K., Todd, R.F., Boxer, L.A., Petty, H.R. Lectin-like inhibition of immune complex receptor –mediated stimulation of neutrophils. Effects on cytosolic calcium release and superoxide production. *J. Immunol.* 1993, 150, 4571-4580.
- Shanahan, F., Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm. Bowel Dis.* 2000, 6, 107–115.
- Sharan, R., Schoen, RE., Cancer in inflammatory bowel disease: an evidence-based analysis and guide for physicians and patients. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 2002, 31, 237-254.
- Sharon, P., Stenson, W.F. Enhanced synthesis of leukotriene B<sub>4</sub> by colonic mucosa in inflammatory bowell disease. *Gastroenterology* 1984, 86, 453-460.
- Schatzkin A, Lanza E, Corle D, *et al.* Lack of effect of a low fat, high fibre diet on the recurrence of colorectal adenomas: Polyp Prevention Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* 2000;342:1149–1155.
- Siavoshian, S., Blottiere, H.M., Cherbut, C., Galmiche, J.P. Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclindependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997A, 232, 169–172.

- Siavoshian, S., Blottiere, H.M., Le Foll, E., Kaeffer, B., *et al.* Comparison of the effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines in vitro. *Cell. Biol. Int.* 1997B, 21, 281–287.
- Simpson, E. J., Chapman, M. A. S., Dawson, J., Berry, D., *et al.*, In vivo measurement of colonic butyrate metabolism in patients with quiescent ulcerative colitis. *Gut* 2000, 46, 73–77.
- Singer, I.I., Kawka, D.W., Schloemann, S., Tessner, T., *et al.* Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998, 115, 207–306.
- Sjoquist, U., Ost, A., Lofberg, R., Increased expression of proliferative Ki-67 nuclear antigen is correlated with dysplastic colorectal epithelium in ulcerative colitis. *Int. J. Colorectal Dis.* 1999, 14, 107-115.
- Souleimani, A., Asselin, C. Regulation of c-myc expression by sodium butyrate in the colon carcinoma cell line Caco-2. *FEBS Lett.* 1993, 326, 45–50.
- Southgate, DAT., Hudson GJ., Englyst H., The analysis of dietary fiber, the choices for the analyst. *J. Sci. Food Agric.* 1978, 29, 978 – 988.
- Speert, D.P., Eftekhari, H., Puterman, M.L. Nonopsonic phagocytosis of strain of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Infect. immunol.* 1984, 43, 1006-1011.
- Stagg, A. J., Hart, A. L., Knight, S. C., Kamm, M. A., The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 2003, 52, 1522 – 1529.
- Steihart, A. H., Brzezinski, A., Baker, J. P., Treatment of refractory ulcerative proctosigmoiditis with butyrate enemas. *Am. J. Gastroenterol.* 1994, 89, 179–183.
- Stonerook, M. J., Tefend, K. S., Sharma, U. M., Peck, O. C., *et al.*, Faecal short-chain fatty acids associated with inflammation in cotton-top tamarin model for idiopathic colitis. *Dig. Dis. Sci.* 1996, 41, 618 –624.
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., *et al.*, Supplemental fructooligosaccharides and mannanooligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J. Nutr.* 2002, 132, 980-989.
- Swennen, K., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Non-digestible Oligosaccharides with Prebiotic Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006, 46, 459-471.

- Takahasi, T., Nakagawa, E., Nara, T., Yajima, T., Kuwata, T. effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62, 10-15.
- Tanaka, T., Hoshina, M., Tanabe, S., Sakai, K. *et al.* Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour. Technol.* 2006, 97, 211-217.
- Tamboli, C.P. Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2003, 17, 805-820.
- Tangerman, A., Nagengast, F.M., A gas chromatographic analysis of faecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. *Anal. Biochem.* 1996, 236, 1-8.
- Tannock, G.W. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002, 56 Suppl 4, 44-49.
- Tharanathan, R.N. Starch- value addition by modification. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, 45, 371-384
- Topping, D.L., Clifton, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 2001, 81, 1031–1064.
- Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W., Gibson, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug. Discov. Today* 2003, 8, 692-700.
- Van Deventer, S. J. Review article: Chemokine production by intestinal epithelial cells: a therapeutic target in inflammatory bowel disease? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1997, 11, 116–120.
- Velázquez, O. C., Ledeler, H. M., Rombeau, J. L. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig. Dis. Sci.* 1996, 41, 727-739.
- Venter CS, Vorster HH, Cummings JH. Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. *Am. J. Gastroenterol.* 1990, 85, 549–553.
- Verbeken, D., Dierckx, S., Dewettinck, K. Exudate gums: occurrence, production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 63, 10-21.
- Vernia, P., Caprilli, R., Latella, G., Barbetti, F., *et al.* Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1988a, 95, 1564–1568.

- Vernia, P., Gnaerdinger, A., Haunch, W., Breuer, R. I. Organic anions and the diarrhoea of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 1988b, 33, 1353–1358.
- Videla, S., Vilaseca, J., Antolin, M., Garcia-Lafuente, A., *et al.*, Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am. J. Gastroenterol.* 2001, 96, 1486–1493.
- Wachtershauser, A., Loitsch, S. M., Stein, J. PPAR-c is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 272, 380–385.
- Wargovich MJ, Eng VW, Newmark HL. Calcium inhibits the damaging and compensatory proliferative effects of fatty acids on mouse colon epithelium. *Cancer Lett.* 1984, 23, 253–258.
- Watzl, B., Girrback, S., Roller, M. Inulin, oligofructose and immunomodulation. *Br. J. Nutr.* 2005, 93, Suppl. 1, S49-S55.
- Williams, E.J., Haque, S., Banks, C., Johnson, P., *et al.* Distribution of the interleukin-8 receptors, CXCR1 and CXCR2, in inflamed gut tissue. *J. Pathol.* 2000, 192, 533-539.
- Wills-Karp, M., Santeliz, J., Karp, C.L., The germless theory of allergic diseases: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature rev.* 2001, 1, 69-75.
- Wilson, A.J., Byron, K., Gibson, P.R. Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. *Clin. Sci.* 1999, 97, 385-390.
- Whitehead, R.H., Young, G.P., Bhathal, P.S. Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM 1215). *Gut* 1986, 27, 1457–1463.
- Whitlock, J.P., Augustine, R., Schulman, H. Calciumdependent phosphorylation of histone H3 in butyrate-treated HeLa cells. *Nature* 1980, 287, 74–76.
- Wong, J.M., Souza, R., Kendall, C., Emam, A., Jenkins, D.J. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006, 3, 235-243.
- Xaus, J., Comalada, M., Cardo, M., Villedor, A.F., Celada, A., Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27<sup>kip1</sup> and p21<sup>Waf1</sup>. *Blood* 2001, 98, 2124-2133.
- Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C., Role of transcription factor NF-κB/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 4705–4708.

- Yamada, T., Fujimoto, K., Tso, P., Fujimoto, T., *et al.*, Misoprostol accelerates colonic mucosal repair in acetic acid-induced colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992, 260, 313–318.
- Young, G. P., McIntyre, A., Albert, V., Folino, M., *et al.* Wheat bran suppresses potato starch-potentiated colorectal tumorigenesis at the aberrant crypt stage in a rat model. *Gastroenterology* 1996, 110, 508–514.
- Zapolska-Downar, D., Siennicka, A., Kaczmarczyk, M., Kolodziej, B., *et al.*, Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF- $\kappa$ B and PPAR $\alpha$ . *J. Nutr. Biochem.* 2004, 15, 220–228.