

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



**EFFECTO DE LA QUERCITRINA ASOCIADA A ÁCIDOS  
GRASOS POLIINSATURADOS DE LA SERIE  $\omega$ 3 EN EL  
MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR  
SULFATO DE DEXTRANO SÓDICO EN RATAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Deseada Camuesco Pérez**

**2006**

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



**EFFECTO DE LA QUERCITRINA ASOCIADA A ÁCIDOS  
GRASOS POLIINSATURADOS DE LA SERIE  $\omega$ 3 EN EL  
MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR  
SULFATO DE DEXTRANO SÓDICO EN RATAS**

**Tesis doctoral para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia que  
presenta la  
Licenciada Dña. Deseada Camuesco Pérez  
2006**



## **ÍNDICE**

---

---

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
1. Enfermedad inflamatoria crónica del intestino .....	3
1.1. Aspectos generales .....	3
1.2. Epidemiología .....	5
1.3. Etiología .....	6
1.3.1. Factores genéticos .....	6
1.3.2. Factores ambientales .....	9
1.3.2.1. Tabaco .....	10
1.3.2.2. Factores dietéticos .....	11
1.3.2.3. Fármacos .....	12
1.3.2.4. Situación geográfica, social, económica, educativa y ocupacional ..	13
1.3.2.5. Estrés .....	14
1.3.2.6. Factores microbianos .....	15
Agentes infecciosos específicos .....	15
Flora intestinal comensal .....	16
1.4. Fisiopatología .....	17
1.4.1. Células implicadas en la respuesta inmune intestinal .....	18
Células epiteliales .....	18
Células dendríticas .....	20
Células T .....	22
1.4.2. Tolerancia oral .....	25
Anergia clonal .....	25
Deleción clonal .....	25
Inducción de células reguladoras .....	27
1.4.3. Producción de citocinas .....	28
1.4.4. Reclutamiento celular .....	29
Migración de células vírgenes .....	31
Reclutamiento de células T activadas .....	31
1.4.5. Mecanismos moduladores de la expresión de genes proinflamatorios .....	32
Factor nuclear $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) .....	32

Vía de las proteín kinasas activadas por mitógenos (MAPK) .....	34
2. Ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPI $\omega$ 3) .....	36
2.1. Estructura, nomenclatura y biosíntesis de ácidos grasos .....	36
2.2. Mecanismos inmunomoduladores de los AGPI .....	39
2.2.1. Modulación de la síntesis de eicosanoides .....	39
2.2.2. Componentes de balsas lipídicas ( <i>rafts</i> ) .....	41
2.2.3. Transducción de señal .....	43
2.2.4. Regulación de la expresión de genes .....	43
2.2.5. Modulación de la flora intestinal .....	45
2.3. AGPI $\omega$ 3 y enfermedad inflamatoria intestinal .....	45
2.3.1. Modelos animales de EII y AGPI $\omega$ 3 .....	47
2.3.2. Ensayos clínicos de AGPI $\omega$ 3 en la EII .....	48
3. Flavonoides .....	55
3.1. Aspectos generales .....	55
3.2. Actividad antiinflamatoria de los flavonoides .....	57
3.2.1. Flavonoides y EII .....	57
3.2.2. Mecanismos de la actividad antiinflamatoria intestinal de los flavonoides....	59
3.2.2.1. Propiedades antioxidantes y/o antiradicalarias .....	59
3.2.2.2. Actuación sobre el metabolismo del óxido nítrico .....	60
3.2.2.3. Inhibición de la actividad lipooxigenasa y reducción en la producción de leucotrieno B <sub>4</sub> .....	61
3.2.2.4. Inhibición de la actividad ciclooxigenasa y reducción en la producción de prostaglandina E <sub>2</sub> .....	62
3.2.2.5. Modulación de la expresión de genes proinflamatorios .....	62
3.2.2.6. Preservación de la función absortiva colónica .....	65
<b>Objetivos .....</b>	<b>67</b>
<b>Material y métodos .....</b>	<b>71</b>
1. Reactivos y composición de dietas .....	73
2. Ensayos <i>in vivo</i> .....	73

---

2.1. Animales de experimentación .....	74
2.2. Inducción de la colitis experimental .....	75
2.3. Diseño experimental .....	75
2.4. Valoración del proceso inflamatorio intestinal .....	77
2.4.1. Determinación de la actividad mieloperoxidasa colónica .....	78
2.4.2. Determinación del contenido colónico de glutation total .....	79
2.4.3. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina colónica .....	80
2.4.4. Determinación de la biosíntesis colónica de LTB <sub>4</sub> , TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	81
2.4.5. Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa colónica .....	81
2.4.6. Determinación de la expresión de iNOS, eNOS y COX-2 en tejido colónico .....	83
2.4.7. Determinación de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B en tejido colónico .....	84
2.4.8. Determinación del contenido de proteínas: Método del ácido bicinchonínico (BCA) .....	84
2.4.9. Estudio histológico .....	85
2.4.10. Determinación de ácidos grasos en plasma, hígado, colon y dietas .....	87
3. Ensayos <i>in vitro</i> .....	88
3.1. Obtención del factor estimulador de colonias (M-CSF) .....	88
3.2. Obtención y cultivo de macrófagos murinos derivados de médula ósea .....	89
3.3. Determinación de efecto de los inhibidores sobre la viabilidad celular .....	89
3.4. Determinación de la expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e iNOS en BMDM .....	90
3.5. Determinación de la secreción de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en BMDM .....	91
3.6. Determinación de la actividad JNK en BMDM .....	91
3.7. Determinación de los niveles de I $\kappa$ B fosforilado en BMDM .....	92
4. Estudio estadístico .....	92
<b>Resultados .....</b>	<b>93</b>
1. Caracterización del modelo de colitis experimental inducida por DSS en ratas .....	95
1.1. Evolución del proceso colítico .....	95
1.2. Estudio macroscópico y microscópico .....	97

1.3. Estudios bioquímicos .....	100
2. Estudio del efecto de la suplementación dietética con aceite de oliva y de pescado en la colitis experimental inducida por DSS en ratas .....	107
2.1. Valoración de la actividad antiinflamatoria intestinal .....	108
2.1.1. Efecto de la dieta enriquecida en aceite de oliva .....	108
2.1.2. Efecto de la dieta enriquecida en aceite de pescado .....	112
2.2. Perfil lipídico tisular .....	115
3. Estudio del efecto del tratamiento con el flavonoide quercitrina en la colitis experimental inducida por DSS en ratas .....	118
Ensayos <i>in vitro</i> .....	130
4. Estudio del efecto de la asociación de la suplementación dietética con AGPI $\omega$ 3 y quercitrina en la colitis experimental inducida por DSS en ratas .....	135
<b>Discusión .....</b>	<b>143</b>
1. Efecto de la suplementación dietética con aceite de oliva y de pescado en la colitis experimental inducida por DSS en ratas .....	152
1.1. Efecto antiinflamatorio de la dieta enriquecida en aceite de oliva: dieta O (relación AGPI $\omega$ 6/ $\omega$ 9 baja) .....	155
1.2. Efecto antiinflamatorio de la dieta enriquecida en aceite de pescado: dieta $\omega$ (relación AGPI $\omega$ 6/ $\omega$ 9 y $\omega$ 6/ $\omega$ 3 baja) .....	157
2. Efecto del tratamiento con el flavonoide quercitrina en la colitis experimental inducida por DSS en ratas .....	163
Ensayos <i>in vitro</i> .....	169
3. Efecto de la asociación de la suplementación dietética con AGPI $\omega$ 3 y quercitrina en la colitis experimental inducida por DSS en ratas .....	175
<b>Conclusiones .....</b>	<b>183</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>187</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>241</b>
Abreviaturas .....	243



Índice de tablas..... 247  
Índice de figuras..... 249

# **INTRODUCCIÓN**

---

## **1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA DEL INTESTINO.**

### **1.1. ASPECTOS GENERALES.**

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) son enfermedades inflamatorias intestinales (EII) de etiología desconocida y de curso crónico y recurrente, con períodos de exacerbación de los síntomas seguidos de intervalos más o menos prolongados de remisión de los mismos.

Aunque se ha progresado en la caracterización de la patogenia de estas enfermedades, su causa primaria sigue siendo desconocida. La hipótesis genérica actual es que la EII engloba a un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen una manifestación final común: la presencia de inflamación, y que varios factores genéticos, ambientales e inmunológicos están implicados en la fisiopatología de estas enfermedades (Podolsky, 2002).

Tanto la EC como la CU se caracterizan por tratarse de trastornos inflamatorios del intestino pero presentan diferencias en cuanto a lo que anatomía patológica y manifestaciones clínicas se refiere (Tabla 1).

La EC puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, si bien es más frecuente en la región ileocecal (Gassull y Cabre, 1994). La inflamación, de carácter transmural, se propaga a través de toda la pared intestinal, favoreciendo la aparición de perforaciones, estenosis y fístulas con órganos adyacentes (Levine, 1994; Gasche, 2000). Las lesiones pueden ser focales (ulceras aftoides), segmentarias o difusas (Levine, 1994) y con frecuencia afecta de forma discontinua y simultánea a distintas zonas del aparato digestivo, separadas entre sí por segmentos intactos.

En contraste a la EC, la afectación de la CU se limita al colon, fundamentalmente a la región distal (recto/ano), y se extiende progresivamente en dirección proximal. La inflamación afecta predominantemente a las capas superficiales de la pared intestinal, normalmente mucosa y submucosa, y se caracteriza por infiltración de neutrófilos,

eosinófilos y células plasmáticas, con formación frecuente de abscesos de las criptas (Obrador y Riera, 1994; Stenson y McDermott, 1991), consistentes en un acúmulo de neutrófilos adyacentes a las criptas, la necrosis del epitelio, y la presencia de edema y hemorragia. La mucosa tiene un aspecto granuloso, consecuencia de la irregularidad de la inflamación, y con frecuencia aparecen pólipos inflamatorios (Geller, 1994). La enfermedad suele manifestarse con diarrea, generalmente sanguinolenta, acompañada o no de síntomas sistémicos: fiebre, malestar general, pérdida de peso, etc. (Sutherland, 1994).

---

**Tabla 1.** Características diferenciales entre la EC y la CU

---

<b>Enfermedad de Crohn (EC)</b>	<b>Colitis ulcerosa (CU)</b>
Desde la boca hasta el ano	Recto +/- colon
Afectación discontinua	Afectación continua
Transmural (afecta a todas las capas del intestino)	Implica sólo la mucosa
Diarrea pastosa	Diarrea líquida con sangre, moco y pus
Fístulas y estenosis intestinal frecuentes	Fístulas y estenosis intestinal infrecuentes
Anatomía patológica: Granulomas	Anatomía patológica: Abscesos de criptas
Agregados linfoides	Depleción de mucina
Fibrosis	Distorsión glandular

---

En un 10-15% de los pacientes con EII es imposible poder establecer un diagnóstico definitivo de CU o EC de colon. La presencia de granulomas constituye el único carácter patognomónico frente a la CU, pero tan sólo se detectan en un 25% de las biopsias y no son específicos de la EC, ya que se han observado también en enfermedades como la tuberculosis colónica y la esquistosomiasis (Geboes, 1994).

En ambas entidades patológicas pueden aparecer complicaciones de tipo autoinmune que afecten a órganos extraintestinales como las articulaciones, el ojo o la piel, que se presentan hasta en un 40% de los casos (Lichtman y Balfour Sartor, 1994). Entre las complicaciones no autoinmunes cabe destacar la aparición de episodios tromboembólicos,

anemia y osteoporosis (Gasche, 2000; Szulc y Meunier, 2001). Además, el riesgo de cáncer se incrementa de modo acumulativo en los pacientes de EII, siendo factores predisponentes la duración de la enfermedad, extensión de la misma, complicaciones extraintestinales y aparición de la enfermedad a edades tempranas. El riesgo de cáncer es superior en pacientes de CU que en EC (Pohl *et al.*, 2000).

## **1.2. EPIDEMIOLOGÍA.**

A pesar de que la incidencia y prevalencia de la EC y la CU comienzan a estabilizarse en áreas de alta incidencia, son 2,2 y 1,4 millones de personas, en Europa y Estados Unidos respectivamente, los que sufren estas enfermedades (Loftus, 2004).

En general, las tasas más altas de incidencia y prevalencia tanto para la EC como la CU se han descrito en el norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica, que son regiones geográficas asociadas históricamente con la EII. Sin embargo, existe una incidencia y prevalencia crecientes en otras áreas como el sur y centro de Europa, Asia, África y Latinoamérica, indicando que la EII es un proceso dinámico (Loftus, 2004).

La frecuencia de la enfermedad se encuentra influenciada por una serie de factores demográficos como son el género, la edad o las diferencias étnicas.

En la incidencia de la EII parece existir una leve diferencia entre géneros. En general, se encuentra un ligero predominio de la EC en la mujer, aunque en ciertas áreas de baja incidencia es más frecuente en el varón. Este predominio, especialmente entre mujeres en la adolescencia tardía y la edad adulta temprana, sugiere que los factores hormonales pueden jugar un papel importante en la expresión de la enfermedad. Por otra parte, si existe algún tipo de influencia del sexo en la CU, parece ser que afecta al varón (Loftus *et al.*, 2000).

Clásicamente se ha mostrado una distribución bimodal de la incidencia de la EII en cuanto a la edad (es decir, un primer pico de incidencia aparece entre la segunda y tercera décadas de la vida, seguido por un segundo pico menor en décadas posteriores). La EC y la

CU normalmente son diagnosticadas en la adolescencia tardía y la edad adulta temprana, aunque el diagnóstico puede realizarse a todas las edades. Así, el pico de incidencia máximo para la EC se encuentra entre los 15-30 años, mientras que para la CU es, en general, de 5 a 10 años más tardío que el asociado a la EC (Bjornsson y Johannsson, 2000; Loftus *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta que hay que interpretar con mucha cautela los datos epidemiológicos de que se dispone, parece claro que la EII es más frecuente en individuos de raza blanca. Así, la EII es inusual en los individuos de raza negra, así como en los hispanos y asiáticos. Los datos obtenidos respecto a la influencia de la raza indican que esta enfermedad es poco frecuente entre la población no blanca de áreas subdesarrolladas, aunque es previsible que con la progresiva culturización y adquisición de hábitos occidentales por parte de estos grupos de población, las cifras de incidencia de EII se aproximen, en algunos casos, a las de los individuos de raza blanca. Finalmente, numerosos estudios reflejan un aumento en el riesgo de padecer EII en sujetos de etnia judía. Así, la CU es tres veces y la EC hasta seis veces más frecuente en judíos que en el resto de la población en sus mismas áreas (Roth *et al.*, 1989).

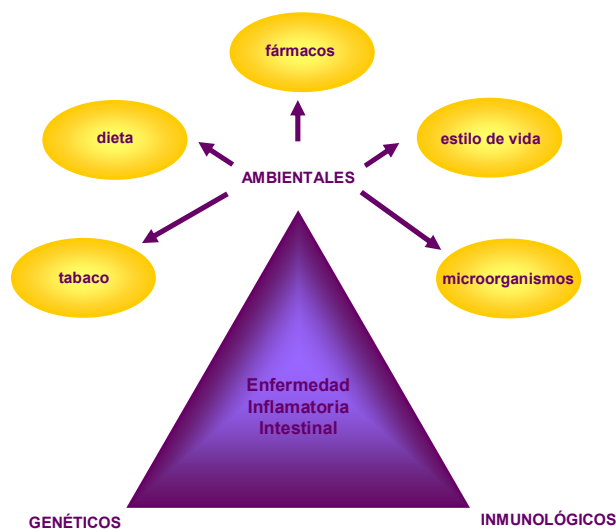
### **1.3. ETIOLOGÍA.**

La etiología de estas enfermedades continúa siendo desconocida, aunque se propone que se trataría de una respuesta inmune incontrolada frente a bacterias de la flora que se desarrolla en un individuo genéticamente predisuesto (Figura 1).

#### **1.3.1. Factores genéticos.**

Son muchas las evidencias de la contribución de los genes en la EII. Así, los familiares en primer grado de individuos afectados por EII muestran un riesgo 25-50 y 10-20 veces mayor de desarrollar EC y CU respectivamente, comparados con la población general. Además, los parientes afectados de una misma familia presentan proporciones de concordancia del 80% a edades similares para el sitio específico de afectación, comportamiento y manifestaciones extraintestinales (Zheng *et al.*, 2003). Estudios

realizados en gemelos muestran una concordancia de un 20-44% en univitelinos y 3,8-6,5% en bivitelinos para la EC; el porcentaje de concordancia para la CU es de 6-16% y 3%, respectivamente (Thompson *et al.*, 1996).

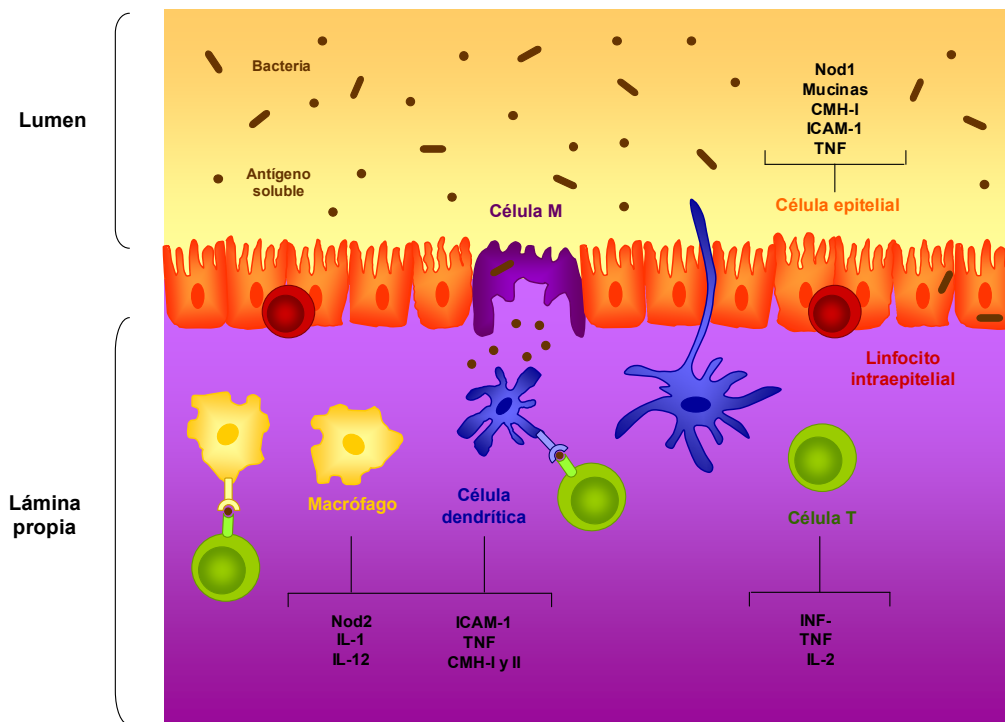


**Figura 1.** Componentes implicados en la etiopatogénesis de la EII.

En consecuencia, varios grupos de investigadores han identificado al menos 7 loci (*inflammatory bowel disease 1-7*, IBD1-7) en los cromosomas que se relacionen con genes de susceptibilidad, centrándose en las mutaciones de los genes NOD2/CARD15, del CMH-II (complejo mayor de histocompatibilidad-II), de citocinas, de receptores de citocinas y de moléculas de adhesión (Duerr, 2003; Sartor, 2003; Zheng *et al.*, 2003) (Figura 2). Algunos loci han mostrado ser específicos para la CU (como IBD2) (Bonen y Cho, 2003) o para EC (como IBD1) (Cho, 2001; Cho, 2003), mientras que otros confieren una susceptibilidad común a ambas.

El gen NOD2/CARD15 se encuentra localizado en el cromosoma 16q12 (IBD1) (Hugot *et al.*, 1996), y tres de sus variantes confieren 15-20% de riesgo para la EC (Cho, 2001; Cho, 2003). Además, la presencia de un alelo de riesgo NOD2 se asocia con el

fenotipo fibrosante obstructivo de la EC (Sartor, 2003), con la enfermedad ileal y con un debut temprano de la enfermedad (Cho, 2003; Gasche *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Microambiente intestinal y genes involucrados en el sistema inmune de la mucosa cuya mutación se intenta relacionar con la EII. CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; ICAM, molécula de adhesión intercelular 1; TNF $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; IL, interleucina; INF- $\gamma$ , interferón-

La proteína NOD2/CARD15, es una proteína citosólica (Berrebi *et al.*, 2003; Ogura *et al.* 2001) cuya activación por componentes bacterianos produce un cambio conformacional, haciendo exponer ciertos dominios que se asociarían a proteínas kinasas específicas (Chamaillard *et al.*, 2003; Rosenstiel *et al.*, 2003). Este complejo proteico, a su vez, activaría también al factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*, NF $\kappa$ B) (Inohara *et al.*, 1999; Inohara *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2001).

Este gen se expresa principalmente en las células inmunes de la línea monocítica (monocitos, macrófagos y células dendríticas), pero también, aunque en niveles bajos, en



los granulocitos y algunos linfocitos (Gutierrez *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2001) tanto de la lámina propia intestinal como de sangre periférica (Berrebi *et al.*, 2003). Existen evidencias de su expresión, en bajas cantidades, en células epiteliales, siendo fuertemente inducida por estímulos inflamatorios, incluidos algunos componentes bacterianos (Berrebi *et al.*, 2003, Rosenstiel *et al.*, 2003). De hecho, su expresión epitelial es más marcada en las células de Paneth, células epiteliales intestinales con funciones de defensa frente a patógenos entéricos (Lala *et al.*, 2003).

Muy recientemente, han sido identificados dos nuevos genes asociados con la EC. El primero de ellos se encuentra localizado en el cromosoma 5 y codifica para el transportador de cationes orgánicos, OCTN, y sus mutaciones afectan a la capacidad de los transportadores para bombear xenobióticos y aminoácidos a través de las membranas celulares (Peltekova *et al.*, 2004). En el cromosoma 10 se encuentra el segundo gen, el de un miembro de la familia de la guanilato kinasa, DLG5, cuya mutación dificulta la capacidad de DLG5 para mantener la polaridad en la célula epitelial (Stoll *et al.*, 2004). Ambos genes pueden ser importantes en la permeabilidad epitelial, y un fallo en su función podría provocar una exposición inapropiada del sistema inmune de la mucosa a productos bacterianos.

### **1.3.2. Factores ambientales.**

Es evidente la influencia de factores ambientales en el desarrollo de la EII dado el dramático incremento de la incidencia, tanto de la EC como de la CU, durante la segunda mitad del siglo XX como consecuencia de profundos cambios en el estilo de vida en países desarrollados. Este hecho se ve reforzado por el aumento de estas patologías en los países en vías de desarrollo que han adquirido hábitos occidentales. De acuerdo con la llamada "hipótesis de la higiene", se ha producido un cambio fundamental desde un estilo de vida "sucio" con una alta exposición a microbios, a un estilo de vida "limpio" con una exposición baja a éstos (Wills-Karp *et al.*, 2001). Cambios ambientales tales como una mejor vivienda y nutrición, alimentos y agua más seguros, una mejora en la higiene y la sanidad, y el uso extendido de antibióticos, han conducido a un descenso progresivo de las enfermedades

infecciosas, aunque a expensas de un aumento paralelo de las enfermedades alérgicas y autoinmunes, incluidas la EC y CU, como resultado de un desarrollo reducido del sistema inmune en edades tempranas (Bach, 2002).

El hecho de que se hayan observado cambios en la incidencia de la EII en las poblaciones con idéntica etnia que viven en lugares diferentes, junto con la falta de concordancia absoluta existente entre gemelos monozigóticos respecto a la enfermedad, refuerza la importancia de los factores ambientales en la patogenia de la EII crónica.

Son numerosos los factores ambientales reconocidos como de riesgo para la EII: tabaco, dieta, fármacos, la situación geográfica y social, el estrés y microorganismos (Danese *et al.*, 2004).

#### **1.3.2.1. Tabaco.**

El mejor ejemplo de la influencia del ambiente en la EII es el consumo de tabaco. El tabaco presenta un llamativo efecto contrario en la EC y la CU, apoyando la idea de que son distintos mecanismos los implicados en la patogénesis de cada forma de EII (Thomas *et al.*, 1998a). Es un importante factor de riesgo para la EC, aumentando la frecuencia de recidivas y la necesidad de cirugía, y cuya interrupción en su consumo mejora el curso de la enfermedad (Rubin y Hanauer, 2000). Por el contrario, el hecho de que los pacientes de CU son con frecuencia no fumadores, y que el dejar de fumar aumenta el riesgo de desarrollo de CU, sugiere su papel protector en esta enfermedad (Bridger *et al.*, 2002).

Los mecanismos de este efecto diferencial del tabaco en la EC y la CU aún no son claros, aunque sí se ha comprobado que el tabaco afecta tanto a la inmunidad sistémica como a la de la mucosa intestinal, alterando numerosas funciones inmunes tanto innatas como adquiridas (Sopori, 2002): altera la relación entre células T colaboradoras (Th, *helper*) y T supresoras, reduce la proliferación de células T, modula la apoptosis, y disminuye significativamente los niveles de inmunoglobulinas en suero y mucosas. Además, provoca un incremento en la producción colónica de moco (Cope *et al.*, 1986), alteraciones en el

flujo sanguíneo (Srivastava *et al.*, 1990) y, al igual que la nicotina, una reducción de la motilidad colónica (Coulie *et al.*, 2001).

Es sabido que el consumo de tabaco puede generar aproximadamente unos 4.000 compuestos; cualquiera de ellos podría tener acciones biológicas responsables de su acción en la génesis o el mantenimiento de enfermedad, aunque es probable que la nicotina sea el agente activo más importante. A este respecto, la nicotina transdérmica muestra un efecto beneficioso en pacientes con CU (Guslandi y Tittobello, 1996; Pullan *et al.*, 1994). En distintos modelos experimentales de colitis, se observa cómo tras la administración de nicotina la colitis mejora, coincidiendo con una disminución local de la concentración de varias de las citocinas proinflamatorias (Agrawal y Rhodes, 2003). Por otra parte, la nicotina podría ser perjudicial en la EC a través de la contribución al estado de hipercoagulación presente en esta condición.

### **1.3.2.2. Factores dietéticos.**

Dado que la EII se trata de una patología digestiva, es lógica la posibilidad de que pudiera haber productos de la dieta implicados en su patogenia. Sin embargo, son pocos los datos objetivos contundentes, principalmente porque proporcionan sólo una evidencia indirecta de la posible relación causa-efecto entre factores dietéticos específicos y EII. Se ha sugerido que, en la EC, ciertos alimentos podrían actuar como antígenos, con un efecto desencadenante de la sintomatología. En este sentido, se han utilizado con fines terapéuticos dietas de exclusión en las que los pacientes evitan comer los alimentos supuestamente culpables. Esta maniobra terapéutica tiene efectos positivos en un pequeño porcentaje de enfermos (Jones *et al.*, 1985); sin embargo, no se ha demostrado que, después de lograda la remisión de la enfermedad mediante este planteamiento, la reintroducción de los alimentos excluidos induzca una recaída. No obstante, teniendo en cuenta que la mayor incidencia de EII se puede asociar con los cambios en los hábitos de vida (incluidos los dietéticos) que conlleva el bienestar económico de los países occidentales, y que el intestino es la principal localización del proceso inflamatorio, sería muy probable que algunos nutrientes presentes en la luz intestinal pudieran actuar como

antígenos, o que incluso pudieran influir en los mecanismos inmunitarios y reparadores de la mucosa intestinal. Un estudio en el cual se determinó el flujo de sangre rectal y la proliferación de linfocitos tras la exposición a productos alimenticios específicos demostró sensibilización a algunos antígenos dietéticos en pacientes con EC (Van Den Bogaerde *et al.*, 2002).

Estudios dirigidos a establecer una relación causal entre dieta y EII hacen frente a dificultades importantes, como definir la verdadera composición de cada dieta. A pesar de todo ello, se ha sugerido que el consumo de azúcar refinado puede ser un factor de riesgo para la EC, pero no para la CU (Sonnenberg, 1988). El consumo de grasa ha sido asociado positivamente con la CU, mientras que el consumo de fruta, vegetales y fibra parece descender el riesgo de EII (Reif *et al.*, 1997). Además esta relación entre dieta y EII está apoyada por el beneficio en la EC de dietas elementales tanto como terapia primaria como adyuvante, aunque en algunos estudios este planteamiento fue menos efectivo que las terapias convencionales, como esteroides o aminosalicilatos (Lochs *et al.*, 1991). Finalmente, algunas deficiencias nutricionales pueden estar ligadas a una disfunción del sistema inmunitario, hecho que favorecería la aparición o incluso agravaría la EII.

### **1.3.2.3. Fármacos.**

Los anticonceptivos orales y los fármacos antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs) son los dos principales grupos de fármacos que han sido muy estudiados para una posible relación etiológica entre su uso y el mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

En un meta-análisis realizado por Godet *et al.* (1995) parecía confirmarse una asociación epidemiológica entre el uso de anticonceptivos orales y la EII, algo más intensa en la EC (riesgo relativo de 1,44) que en la CU (riesgo relativo de 1,29). Las conclusiones de este estudio se vieron reforzadas en un trabajo multicéntrico italiano publicado posteriormente (Corrao *et al.* 1998), demostrando además que el riesgo era significativamente mayor en las pacientes que los continuaban utilizando frente a las que ya habían abandonado su uso.

Ha sido motivo de controversia el hecho de si las mujeres que usan anticonceptivos orales presentan una peor evolución clínica de la EII. Los anticonceptivos orales a bajas dosis no afectan significativamente a la actividad clínica de la enfermedad, al menos en EC. Sin embargo, considerando el estado de hipercoagulación presente en la EII activa, el uso concomitante de anticonceptivos orales puede agravar el riesgo de procesos tromboembólicos, aunque son necesarios datos definitivos relacionando estos factores (Alstead, 1999). Por otra parte, si bien se había sugerido que los anticonceptivos podrían afectar a la evolución de la EII a través de estos mecanismos trombogénicos, no se pueden descartar otros efectos inmunomoduladores, como algunos relacionados con la supresión del factor de transcripción NFκB que están empezando a describirse recientemente (Evans *et al.*, 2001), que podrían variar según el tipo y dosificación del fármaco. Estos efectos inmunomoduladores podrían producirse, además, con dosis inferiores o ser específicos de determinadas formas moleculares.

La situación es menos ambigua en el caso de los AINEs, porque su uso está claramente asociado con un mayor riesgo de EII. Pacientes de EII en remisión clínica pueden recaer tras la administración de AINEs (Evans *et al.*, 1997; Hanauer y Sandborn, 2001). Sin embargo, recientemente se ha publicado un estudio retrospectivo en el cual se sugiere que, en general, los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) son seguros en los pacientes con EII (Mahadevan *et al.*, 2002).

#### **1.3.2.4. Situación geográfica, social, económica, educacional y ocupacional.**

El proceso de occidentalización está íntimamente relacionado con la aparición de la EII en el último medio siglo. Existe un gradiente "Norte-Sur" en la incidencia de EII en Europa y Norteamérica, tanto en la EC como en la CU, siendo más común en latitudes más altas. Aunque este gradiente existe, recientemente se está reduciendo, debido aparentemente a un incremento en las regiones del sur y una estabilización en áreas del norte (Sonnenberg *et al.*, 1991).

Tradicionalmente, la EII ha sido más común entre grupos socioeconómicamente más altos, sin distinción entre CU y EC. Resulta un hecho interesante el que trabajadores al aire libre presentan menor riesgo de desarrollar EII, mientras que individuos con ocupaciones interiores son más susceptibles a la EC y la CU (Cucino y Sonnenberg, 2001). Así, trabajadores sedentarios muestran mayores riesgos para EII probablemente asociado con el sedentarismo y al mayor tiempo de contacto de antígenos de la comida con la pared intestinal, resultando en una estimulación inapropiada y en una reacción inflamatoria.

#### **1.3.2.5. Estrés.**

El estrés se ha considerado como un desencadenante potencial en alrededor del 40% de pacientes con CU (Theis y Boyko, 1994). Importantes evidencias relacionan el estrés con la enfermedad y, probablemente, con el aumento en la susceptibilidad a la infección como consecuencia del deterioro de las respuestas inmunes funcionales debido a éste (Herbert y Cohen, 1993). A pesar de que esta creencia es popular entre aquellos que padecen EC y CU, es más probable que el estrés module las manifestaciones de la enfermedad más que ser un factor iniciador. Observaciones clínicas, modelos experimentales de colitis, y estudios de interacciones neuroinmunes en animales de laboratorio han demostrado que el estrés puede agravar el curso de la EII (Collins, 2001).

La duración del estrés puede también ser importante, ya que el riesgo de exacerbación de la actividad clínica de la enfermedad parece estar asociado con un estado de estrés prolongado (Levenstein *et al.*, 2000). Esta relación presenta semejanzas con los titís cabeza de algodón, primates que viven en la jungla tropical de Sudamérica y que desarrollan colitis espontánea tipo CU sólo cuando se mantienen en cautividad en climas más fríos a largo plazo (Maunder *et al.*, 2000). Aún son desconocidos los mecanismos específicos que expliquen la exacerbación de la enfermedad inducida por estrés, aunque probablemente esté implicada una compleja interacción entre factores nerviosos, endocrinos e inmunes (Hart y Kamm, 2002).

### 1.3.2.6. Factores microbianos.

Durante muchos años se ha tratado de establecer una relación entre un agente infeccioso específico y la EII sin obtener resultados concluyentes. Sin embargo, actualmente se considera que la flora intestinal es fundamental en el desarrollo de este tipo de patologías.

#### *Agentes infecciosos específicos*

Son muy variados los agentes infecciosos específicos de tipo microbiano que se han propuesto como responsables de la EC y la CU como *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*. Entre ellos, el papel etiológico de *Mycobacterium paratuberculosis* en la EC ha sido centro de gran controversia, ya que esta bacteria es el agente causante de la enfermedad de Johne, una ileítis granulomatosa crónica en rumiantes que se asemeja mucho a la EC. *M. paratuberculosis* fue inicialmente aislado de varios tejidos con EC (Chiodini *et al.*, 1984), sin embargo en estudios posteriores se intentó cultivar *M. paratuberculosis*, buscar secuencias específicas de ADN en tejidos intestinales o medir anticuerpos en suero frente a este microorganismo, alcanzando resultados conflictivos o no concluyentes. Además, distintos ensayos han determinado una falta de efecto terapéutico de la terapia antituberculosa en pacientes con EC (Thomas *et al.*, 1998b).

Una etiología viral también ha sido propuesta como la causa de EII, en particular para la EC. La presencia de partículas semejantes a paramixovirus en granolomas endoteliales de EC sugiere que esta enfermedad podría ser una debida a una vasculitis crónica causada por la persistencia del virus del sarampión en la mucosa (Wakefield *et al.*, 1993). Como apoyo a esta hipótesis, algunos datos epidemiológicos y serológicos establecieron una asociación entre el sarampión perinatal y la predisposición a la EC (Ekbon *et al.*, 1996); sin embargo estos encuentros preliminares no fueron confirmados por estudios posteriores (Fisher *et al.*, 1997). El descenso progresivo de la infección por el virus del sarampión en las últimas décadas con el incremento de EC durante el mismo período de tiempo, habla en contra de un papel etiológico del sarampión en la EC. La hipótesis de que

la vacunación del sarampión, más que la propia infección, puede ser un factor de riesgo para la EC también ha aumentado, pero de nuevo estudios posteriores no logran confirmar esta asociación (Ghosh *et al.*, 2001).

#### *Flora intestinal comensal*

En la última década el pensamiento de una etiología microbiana ha cambiado desde agentes infecciosos a comensales. Numerosos datos concluyentes sugieren que la flora entérica normal juega un papel clave en el desarrollo de EII (Guarner y Malagelada; 2003). Esta relación comenzó a establecerse a través de observaciones clínicas. El efecto beneficioso de los antibióticos en el tratamiento de la EC, y en menor medida de la CU, ha sido apreciado durante años (Isaacs y Sartor, 2004). La desviación quirúrgica de la corriente fecal de los bucles intestinales inflamados provoca una mejora sintomática en pacientes con EC, mientras que la restauración del flujo fecal induce recaída en la EC (Janowitz *et al.*, 1998).

El intestino humano presenta un complejo ecosistema continuo con el ambiente externo, donde hay más de 10 veces más bacterias que células hay en el cuerpo humano ( $10^{12}$  bacterias  $g^{-1}$  de heces en el colon, de 400 especies diferentes, con anaerobios predominantemente). Diversos autores han puesto de manifiesto una alteración en la ecología microbiana en pacientes con EII activa, encontrándose un descenso significativo en el número de bacterias anaeróbicas y lactobacilos (Fabia *et al.*, 1993). Además, el epitelio de estos enfermos presenta un mayor número y concentración de bacterias, tanto intracelulares como en los biofilms que lo cubren, que en el epitelio de sujetos sanos (Swidsinski *et al.*, 2002). La demostración más reciente de que los probióticos, definidos como microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades adecuadas, producen efectos beneficiosos para la salud añadidos a su valor puramente nutricional (Guarner y Schaafsma, 1998), pueden mejorar tanto la EII humana como la colitis experimental, aumenta la importancia del papel de la flora intestinal en la EII (Campieri y Gionchetti, 1999, Sartor *et al.*, 2005).



Es probable que productos de la flora comensal promuevan la inflamación de la mucosa (Berg, 1996; Gordon *et al.* 1997; Shanahan, 2000). La hipótesis de que la flora normal de algún modo funcione como un modulador de la "inflamación fisiológica" ha sido consolidada por las observaciones de Duchmann *et al.* (Duchmann *et al.*, 1995; 1999) que han demostrado que las células mononucleares de la mucosa de pacientes con EII, pero no de la sangre periférica, proliferan cuando son expuestas a bacterias intestinales autólogas. Por el contrario, células de mucosa no afectada de estos mismos pacientes o de pacientes en remisión no proliferan frente a la flora EII autóloga. Esto indica que existe una pérdida de tolerancia durante la inflamación (Duchmann *et al.*, 1995).

Probablemente el hecho más convincente es que en la mayoría de los modelos animales de EII la inflamación intestinal no se desarrolla cuando son mantenidos en un ambiente libre de gérmenes, como fue demostrado inicialmente en ratas transgénicas HLA-B27 (Taurog *et al.*, 1994). Esta observación ha conducido al ampliamente aceptado paradigma "no bacteria, no colitis". La causa de una respuesta "anormal" a bacterias intestinales "normales" endógenas en la EII no está clara, pero el descubrimiento reciente de que la EC está asociada genéticamente con mutaciones del gen NOD2, cuyo producto son proteínas reconocedoras de bacterias, apunta a una unión entre la inflamación intestinal y el reconocimiento bacteriano (Girardin *et al.*, 2003).

#### **1.4. FISIOPATOLOGÍA.**

El intestino, al constituir una barrera en contacto con el exterior, es particularmente propenso a la inflamación y, bajo circunstancias normales, manifiesta una "inflamación fisiológica" representada por una gran infiltración de leucocitos que se encuentran normalmente en la mucosa en respuesta a antígenos microbianos y de la dieta (Fiocchi, 2003). Este proceso inflamatorio fisiológico ocurre de forma satisfactoria cuando es autolimitado y desaparece una vez el agente inductor ha sido eliminado gracias a una respuesta inmune apropiada. Sin embargo, cuando esta respuesta inmune se prolonga, origina un estado inflamatorio crónico. Tanto la EC como la CU son un claro ejemplo de esta situación, y se cree que son el resultado de una respuesta inapropiada y mantenida del

sistema inmune de la mucosa a la flora entérica normal en un individuo genéticamente susceptible, probablemente facilitada por alteraciones en la barrera epitelial intestinal y mediada principalmente por células T de la mucosa, con pérdida de la tolerancia frente a esta flora endógena. (Bouma y Strober, 2003; Podolsky, 2002).

La inmunoregulación en el intestino es un proceso muy complejo mediado por una variedad de células inmunes que están constantemente haciendo frente a la enorme carga antigénica presente en el lumen. En condiciones fisiológicas existe una respuesta inmune nula o muy baja frente a estos antígenos de procedencia oral, proceso denominado inducción de tolerancia oral, cuya alteración puede conducir a la aparición de EII. El tipo de antígenos localmente presentes y la reacción inmune frente a ellos determinan el resultado de la respuesta adaptativa. Además de las células inmunes clásicas, otros tipos celulares participan en la respuesta crónica inflamatoria de la EII, como las células epiteliales, endoteliales y nerviosas. Existe una comunicación entre ellas y, como resultado de esta interacción y de diferentes procesos de señalización intracelular, una secreción de numerosos productos como anticuerpos, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, eicosanoides, metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno, enzimas proteolíticas y neuropéptidos, así como la expresión en superficie de moléculas de adhesión que facilitan y amplifican la interacción celular y la inflamación (Fiocchi, 1998). A todo este estado contribuye el reclutamiento de nuevas células inmunes al foco inflamatorio intestinal, induciendo una respuesta inflamatoria mantenida.

#### **1.4.1. Células implicadas en la respuesta inmune intestinal.**

##### **Células epiteliales**

La monocapa epitelial y el revestimiento de moco que lo recubre, junto con las uniones estrechas (del inglés *tight junction*) que mantienen unidos a los enterocitos, forman una barrera física que previene a los patógenos potenciales y a antígenos lumináres de pasar libremente a la lámina propia. Además, la inmunoglobulina (Ig) A bloquea sus uniones al epitelio y previene la internalización; también es capaz de aglutinar bacterias y

virus en unos grandes complejos que son atrapados en la barrera de moco y eliminados en las heces.

En la EII, la integridad de la barrera epitelial está comprometida, lo que permite el paso de antígenos lumenales a la lámina propia, y contribuye a la perpetuación del proceso inflamatorio (Plevy, 2002). Así, se ha demostrado la existencia de una permeabilidad intestinal incrementada en pacientes con EC (Teahon *et al.*, 1992), y se ha descrito como un factor temprano predisponente a la patogénesis de esta enfermedad.

Es bastante probable que muchos de los mecanismos implicados en la alteración de la permeabilidad de esta barrera asociada con la EII sean consecuencia de modificaciones en los procesos que suceden normalmente de una forma regular, aunque controlada, en las uniones estrechas entre las células epiteliales. Éstas pueden ser debidas a los niveles aumentados de proteinasas, que interrumpen tales uniones (Chin *et al.*, 2003), a citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF) y el interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), que aumentan la permeabilidad paracelular de la mucosa intestinal (Madara y Stafford, 1989; Mullin y Snock, 1990) o interacciones de microorganismos con células epiteliales intestinales alterando las propiedades de permeabilidad (Johansen *et al.*, 1989).

Por otra parte, alteraciones de la capa de moco (Corfield *et al.*, 2001; Shirazi *et al.*, 2000), de la matriz extracelular (McAlindon *et al.*, 1998) o del funcionamiento de ciertos transportadores de células epiteliales intestinales (Merlin *et al.*, 2001), han sido relacionadas con la EII.

El epitelio intestinal puede participar en la iniciación de la respuesta inmune por medio de al menos tres mecanismos:

1) un aumento de la permeabilidad, intensificando la absorción de antígenos, lo que comportaría una exagerada estimulación del sistema inmune intestinal (Wyatt *et al.*, 1993).

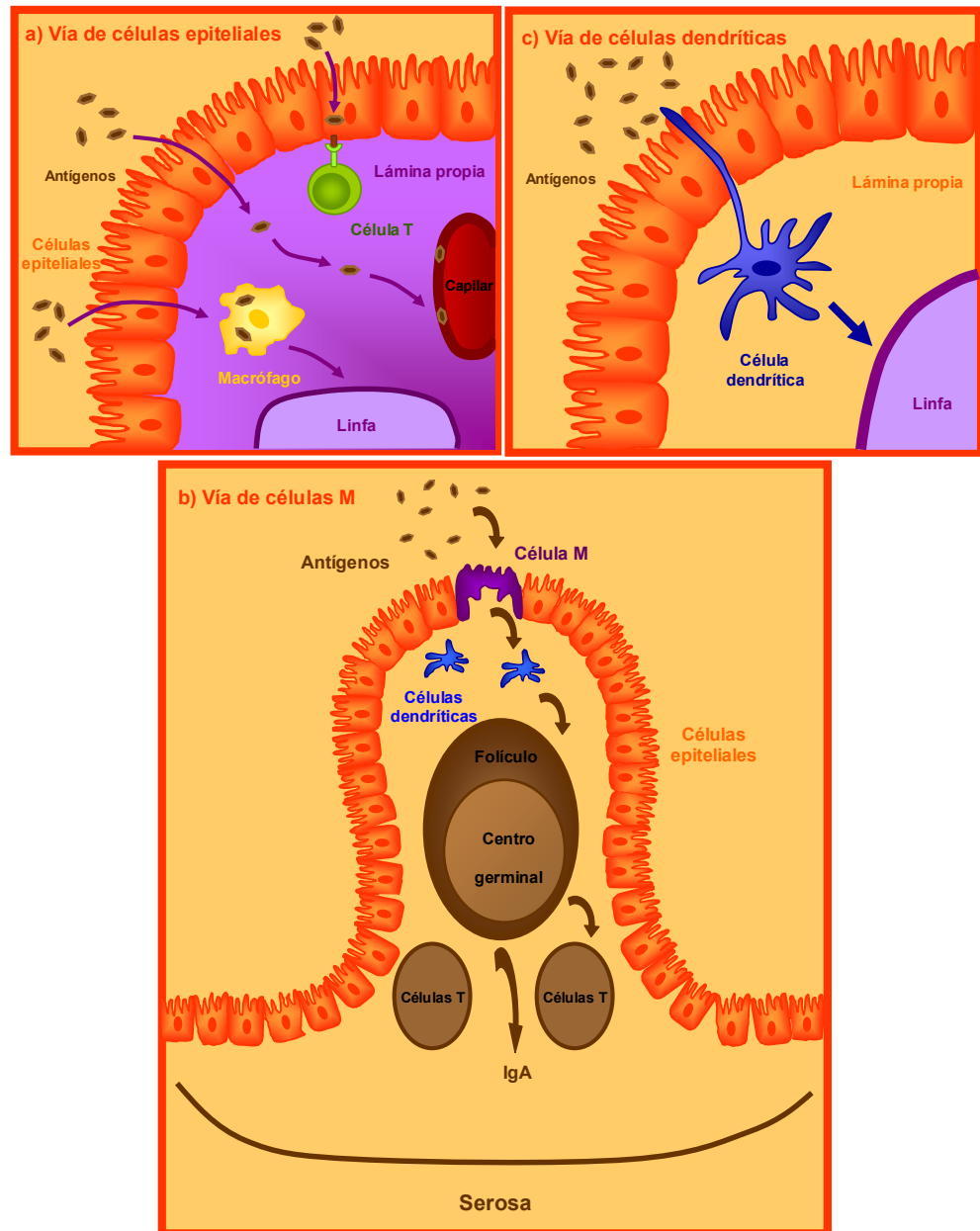
2) actuando como transductor de señales inflamatorias mediante liberación de citocinas, quimiocinas y otras sustancias proinflamatorias (Kagnoff y Eckmann, 1997).

3) actuando como células presentadoras de antígeno (CPA) (Mayer *et al.*, 1991).

Las células epiteliales, a través de procesos de endocitosis, captan antígenos solubles, depositando al espacio extracelular por exocitosis aquellas moléculas que no han sufrido digestión intracelular (Walker y Isselbacher, 1974) (Figura 3a). Las células epiteliales intestinales expresan constitutivamente moléculas del CMH-II, principalmente en sus membranas basolaterales (Hershberg *et al.*, 1998), pudiendo actuar por tanto como CPAs no clásicas presentando antígenos a células T (Figura 3a); así, estas células se encuentran en relación con linfocitos intraepiteliales de una forma directa y, a través de proyecciones basolaterales que atraviesan la membrana basal, con los linfocitos de la lámina propia. En contraste con las CPAs clásicas, las células epiteliales intestinales normalmente activan selectivamente a células T supresoras CD8<sup>+</sup>, jugando un papel en la supresión local de la respuesta inmune (Mayer y Shlien, 1987). Sin embargo, las células epiteliales intestinales de pacientes con EII, llevan a cabo una presentación del antígeno de forma alterada, resultando en una activación de las células T colaboradoras CD4<sup>+</sup> más que de las supresoras CD8<sup>+</sup> (Mayer y Eisenhardt, 1990), proceso que parece estar en relación con una falta de expresión del ligando de CD8, gp180, una glicoproteína de la membrana del epitelio intestinal (Toy *et al.*, 1997).

### **Células dendríticas**

El tejido linfoide asociado al intestino es un órgano del sistema linfático encargado de procesar los antígenos que interactúan con la mucosa intestinal y de extender la respuesta inmune. Las respuestas inmunológicas y la tolerancia en el intestino se inician en órganos linfoides organizados, tales como las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos. Las placas de Peyer son folículos linfoides altamente especializados que contienen áreas ricas en células B vírgenes, células dendríticas (CD) y células T. Se encuentran cubiertas por un epitelio asociado al folículo que contiene células epiteliales



**Figura 3.** Vías de captación de antígenos en el intestino. **a)** Antígenos solubles pueden atravesar el epitelio a través de rutas inter e intracelulares y enfrentarse a macrófagos o células T o alcanzar la circulación sanguínea. **b)** Antígenos particulados son captados por las células M de las placas de Peyer y liberados hacia las células dendríticas subepiteliales, dirigiéndose hacia los folículos de células B, donde se produce IgA. **c)** Los antígenos pueden ser procesados por células dendríticas a través de prolongaciones hacia el lumen intestinal.

especializadas en el transporte de antígenos, denominadas células M (Kucharzik *et al.*, 2000). Son células que se caracterizan por una notable capacidad de pinocitosis, especializadas en captar antígenos particulados o aquellos antígenos para los cuales estas células expresan receptores (Figura 3b). Las partículas así transportadas son conducidas hacia las áreas foliculares donde se enfrentan a células dendríticas que actúan como CPAs. Las CDs están presentes en diferentes compartimentos del intestino, como la lámina propia, las placas de Peyer, y los nódulos linfáticos mesentéricos (Scheinecker *et al.*, 2002). Las CDs pueden también encontrarse intercaladas entre las células epiteliales intestinales preservando la integridad de la barrera epitelial a través de la expresión de proteínas de las uniones estrechas. Pueden enviar dendritas hacia el lumen para captar antígenos directamente (Rescigno *et al.*, 2001) (Figura 3c). Además de la captación de antígenos liberados desde la membrana basolateral de las células epiteliales, la directa, y la mediada por células M, una cuarta vía de acceso a antígenos por las CDs ocurre cuando la integridad epitelial se encuentra comprometida, como en la EII, de forma que el material antigénico interacciona directamente con las CDs en tejidos profundos (Stagg *et al.*, 2003). Tras la captación del antígeno, las CDs activadas comienzan a expresar el receptor de quimiocinas CCR7, migrando a los nódulos linfáticos, donde vénulas endoteliales expresan el ligando de CCR7, CCL2 (Chan *et al.*, 1999).

### **Células T**

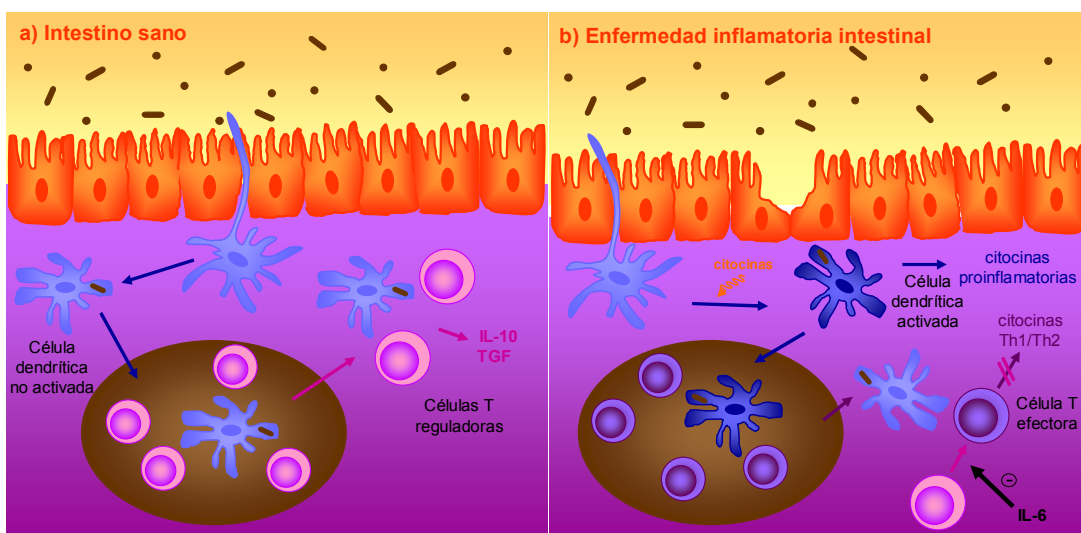
Las CDs portando el antígeno pueden circular a través de la linfa hacia el tejido linfoide secundario, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos (Scheinecker *et al.*, 2002), donde interaccionan con las poblaciones linfocitarias vírgenes. Su papel en el sistema inmune es distinto del de otros tipos de CPAs profesionales, como macrófagos y células B, ya que son potentes activadoras de células T que no han sido previamente enfrentadas al antígeno, diferenciándolas a linfocitos T colaboradores CD4<sup>+</sup> o citotóxicos CD8<sup>+</sup> efectores o memoria. Ante una señal activadora, las células T CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse adquiriendo un fenotipo Th1 o Th2, que se distinguen por las citocinas que producen en respuesta a la activación, y en consecuencia en su función. La decisión de cuál es el fenotipo que una célula va a adoptar en respuesta a la estimulación se toma en el primer encuentro con el

antígeno. Características específicas del antígeno y de las señales coestimuladoras determinarán si predominará la inmunidad celular (Th1) o humoral (Th2). El patrón de citocinas que produce la célula T distingue a estos dos subgrupos de células T CD4<sup>+</sup>. Las células Th1 producen considerables cantidades de interleucina (IL)-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que las células Th2 producen de forma característica IL-4, IL-5 e IL-10 (Sartor, 1997).

Aunque los modelos animales de EII muestran una clara polarización hacia respuestas de tipo Th1 o Th2, esta situación es menos clara en la enfermedad humana. Los estudios realizados en pacientes con EC muestran en general un predominio de la respuesta inmunológica tipo Th1, caracterizada por la producción de IL-2 e INF- $\gamma$ ; por el contrario, en la CU parece predominar una respuesta de tipo Th2 atípica, con cantidades aumentadas de IL-5, aunque no de IL-4, la principal citocina Th2 (Podolsky, 2002). Además, la presencia en CU de altos niveles de inmunoglobulinas, concretamente IgG1, y de autoanticuerpos frente a componentes perinucleares de neutrófilos y a la tropomiosina epitelial sugiere una mayor respuesta de tipo humoral (Th2) en este tipo de enfermedad (Monteleone *et al.*, 2002).

El ambiente de citocinas al que las células T vírgenes están expuestas es el factor determinante primario para la diferenciación hacia el fenotipo Th1 o Th2: la IL-12 junto con la IL-18, ambas producidas por CPAs, inducen diferenciación Th1 y la IL-4, producida por células asesinas naturales (*natural killer*, NK), mastocitos, basófilos y células CD4<sup>+</sup> maduras, conduce a la diferenciación Th2 (van Montfrans *et al.*, 2002). Las células Th1 y Th2, se inhiben mutuamente a través de las citocinas liberadas, de forma que la diferenciación las células productoras de citocinas Th2 está inhibida por INF- $\gamma$ , mientras que la activación de las células Th1 se encuentra bloqueada por IL-10 (Monteleone *et al.*, 2002). Existe otra población de células T CD4<sup>+</sup> denominadas reguladoras, Th3 y Tr1, productoras de citocinas inmunomoduladoras. Las células Th3 producen principalmente factor de crecimiento transformante (*transforming grown factor*, TGF- $\beta$ ), mientras que las Tr1 secretan IL-10, siendo ambas citocinas claves en el control de la inflamación al controlar la activación de otros tipos celulares (Allez y Mayer, 2004).

En relación a las señales derivadas de las CD activadas, estas células pueden producir IL-12, contribuyendo a la respuesta Th1, e IL-4 o IL-10, y por tanto polarizar a las células T hacia un fenotipo Th2 o regulador (Stagg *et al.*, 2004). En ausencia de señales de citocinas, que indicaría un daño tisular, estas CD no sufren maduración y dan lugar a poblaciones de células T reguladoras específicas del antígeno. En EII, las CD se activan generando células efectoras para componentes de la flora comensal. Normalmente, estas células serían inhibidas por las células T reguladoras generadas previamente, pero en la EII esta vía falla. Un componente clave en este fallo puede ser la IL-6, presente en altos niveles en la EII, porque puede transformar a las células T en refractarias a las células reguladoras y además alterar el repertorio de antígenos presentados por la CD (Stagg *et al.*, 2004) (Figura 4).



**Figura 4.** Activación de células dendríticas. **a)** En el intestino sano las CD procesan constitutivamente los productos bacterianos y migran a los nódulos linfáticos mesentéricos, donde permanecen inmaduras debido a la ausencia de citocinas y dan lugar a células T reguladoras. Estas células T reguladoras se dirigen a la lámina propia donde son reestimuladas secretando citocinas antiinflamatorias. **b)** En la EII las CD activadas generan células T efectoras que, como consecuencia de los altos niveles de IL-6, no son moduladas por las células T reguladoras, y por tanto liberan grandes cantidades de citocinas amplificándose el proceso inflamatorio.



Finalmente, las CDs tienen un papel fundamental en dirigir el balance entre tolerancia y la inmunidad activa en el intestino.

#### **1.4.2. Tolerancia oral.**

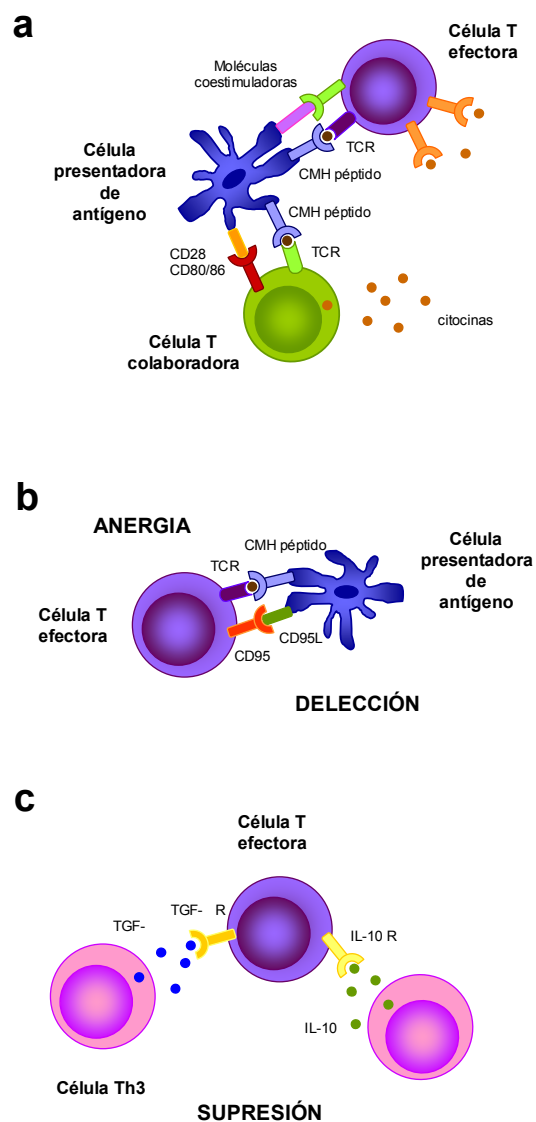
Los mecanismos principales de inducción de tolerancia oral son la anergia clonal, la delección clonal y la inducción de células reguladoras (Figura 5).

##### *Anergia clonal*

La activación completa de las células T requiere el reconocimiento del antígeno presentado por la CPA en el contexto del CMH por parte del receptor de células T (*T cell receptor*, TCR) y el reconocimiento de los coestimuladores, principalmente B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), por parte de CD28. Si el linfocito T reconoce al antígeno sin coestimulación, son incapaces de responder al antígeno, proceso denominado anergia clonal. Esta anergia también puede inducirse si los linfocitos T emplean CTLA-4 (CD152), un receptor inhibitorio de las moléculas B7, para reconocer los coestimuladores presentes en las CPA mientras se produce el reconocimiento antigénico. Como consecuencia de la interacción CTLA:B7 se produce una inhibición de la expresión de IL-2 y la proliferación de células T, resultando en una atenuación de la respuesta inmune (Janeway y Bottomly, 1994). Además, los linfocitos T activados expresan una molécula denominada ligando de CD40 (CD40L) que se une al CD40 expresado por las CPA y transmite una serie de señales que potencian la expresión de los coestimuladores B7 en las CPA. Así, en pacientes de EII, se ha comprobado un aumento de la expresión de CD80, CD86 y CD40 en la superficie de las CDs (Stagg *et al.*, 2003).

##### *Delección clonal*

Los mecanismos implicados en el control de la expansión de células efectoras específicas de antígeno son fundamentales para la homeostasis del sistema inmune con el objeto de prevenir la proliferación incontrolada de células efectoras. La IL-2 es una señal de supervivencia para los linfocitos activados que se encuentra en grandes cantidades durante la inflamación. Cuando el antígeno ha sido aclarado, la producción de IL-2 cae, resultando



**Figura 5.** Mecanismos de tolerancia oral. **a)** La respuesta inmune requiere la unión del receptor de células T con antígeno asociado al CMH en presencia de moléculas coestimuladoras y citocinas. **b)** La ausencia de coestimulación o la presencia de ligandos inhibidores, conduce a la anergia o la delección clonal respectivamente. **c)** La activación de células T reguladoras inhibe la respuesta inmune a través de citocinas supresoras.

en la apoptosis de la mayoría de las células efectoras excepto una pequeña población de linfocitos memoria (Akbar *et al.*, 1996). La apoptosis está regulada por dos vías intracelulares principalmente: la activación del receptor Fas (CD95) y la liberación del citocromo C mitocondrial. Así, ha sido determinada una alta resistencia a la apoptosis de células T de la mucosa de pacientes con EII como consecuencia de alteraciones en estas vías (Peppelenbosch y van Deventer, 2004).

#### *Inducción de células reguladoras*

La tolerancia también está mediada por las células T reguladoras que producen altos niveles de TGF- $\beta$  e IL-10, citocinas que son capaces de contrarrestar respuestas inmunes perjudiciales en la mucosa. Este efecto es, al menos en parte, dependiente de la capacidad de TGF- $\beta$  e IL-10 para suprimir la proliferación de células efectoras (Maloy *et al.*, 2003).

La IL-10 es una citocina tipo Th2 capaz de inhibir tanto la diferenciación hacia Th1 como la síntesis de citocinas proinflamatorias derivadas de células Th1 y/o macrófagos (Leach *et al.*, 1999). Además, la IL-10 promueve la maduración de células Th3 productoras de TGF- *in vitro* y atenúa la formación de metabolitos reactivos del oxígeno y nitrógeno derivados de macrófagos (Leach *et al.*, 1999). Finalmente, la IL-10 ha mostrado una inhibición de la expresión en superficie de moléculas de CMH-II y molécula de adhesión intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1). Por otra parte, se ha determinado que el TGF- $\beta$  es una citocina importante en la inhibición de la excesiva inflamación observada en varias enfermedades inmunes tanto experimentales en ratón como en humanos, como la EII (Strober *et al.*, 1997). Aunque la actividad biológica de TGF- $\beta$  es compleja, en general parece inhibir la generación de células Th1, la producción de IL-12, y la inmunidad mediada por células *in vivo* (Strober *et al.*, 1997). Así, se ha demostrado que la actividad TGF- $\beta$  es anormal en la mucosa de enfermos de EII como consecuencia de una producción aumentada de SMAD7, un inhibidor de la transducción de señal de TGF- (Monteleone *et al.*, 2001).

Bajo situaciones normales, la mucosa intestinal está en un estado de inflamación "controlada" regulada por un equilibrio entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

### **1.4.3. Producción de citocinas.**

En una situación patológica como la EII, tras la activación por un antígeno de los linfocitos, la IL-2 liberada actúa de forma autocrina, estimulando la proliferación de las células T y potenciando la muerte celular por apoptosis de éstos.

El INF- $\gamma$  activa la producción de IL-12 e IL-18 por los macrófagos, induciendo por tanto una diferenciación y activación de células Th1, en un ciclo que se autoalimenta dada la producción de mayores cantidades de INF- $\gamma$ , IL-2 y TNF $\beta$  por las células Th1. El INF- $\gamma$  no sólo aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, facilitando por tanto el reclutamiento de células inflamatorias, sino que también activa a los macrófagos, los cuales producen grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, e IL-18, y metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno. En individuos sanos, esta respuesta inflamatoria se encuentra bajo control gracias a citocinas inmunomoduladoras, de forma que TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 y IL-12, consideradas como citocinas proinflamatorias, se encuentran en equilibrio con sus equivalentes antiinflamatorios IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13. Alteraciones en este equilibrio conducen a un daño del tejido como consecuencia de una inflamación severa y a manifestaciones clínicas de la enfermedad.

La IL-1 y el TNF $\alpha$  comparten muchas de sus propiedades proinflamatorias, siendo críticas para la amplificación de la inflamación de la mucosa en la EII (Ardizzone y Porro, 2002). Ambas citocinas son secretadas inicialmente por monocitos y macrófagos tras su activación e inducen la producción de prostaglandinas, proteasas y otros mediadores solubles de la inflamación, así como otras citocinas inflamatorias y quimiotácticas por macrófagos intestinales, neutrófilos, fibroblastos y células de músculo liso. La contribución del TNF $\alpha$  a la patogénesis de la EII es resultado de un gran espectro de efectos biológicos (Monteleone *et al.*, 2002), como la activación de macrófagos residentes, la liberación de otros mediadores proinflamatorios (óxido nítrico, prostaciclina, y factor activador de

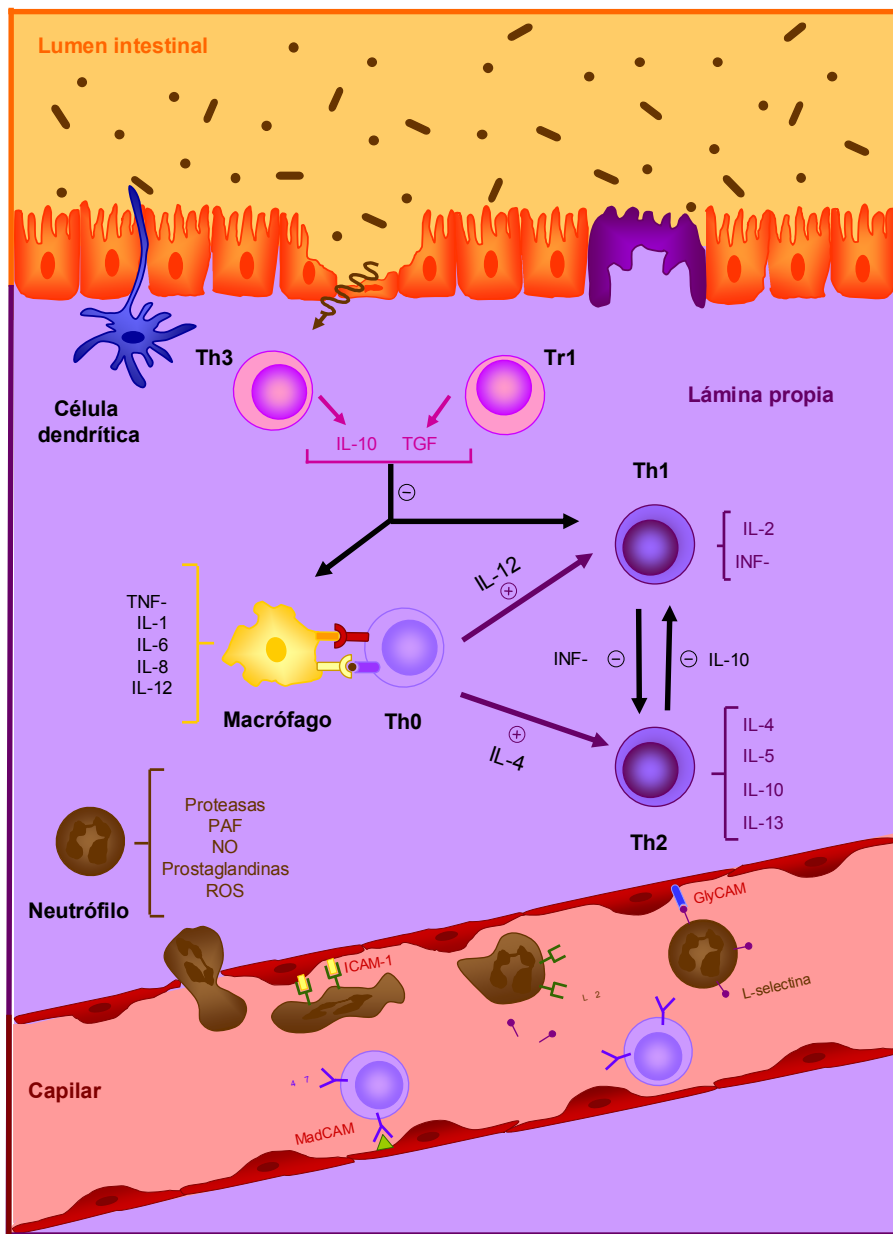
plaquetas), o la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, favoreciendo el flujo de nuevas células inflamatorias a la mucosa. TNF $\alpha$  también puede contribuir al daño intestinal alterando directamente la integridad de las membranas epiteliales. Los granulocitos también son activados por esta citocina a través de la inducción de integrinas en su superficie, promoviendo su unión al endotelio y la posterior diapédesis a la mucosa, generando la producción de radical superóxido en sus gránulos, e induciendo la liberación de éstos (Beutler, 1995). IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  pueden participar directamente en el daño tisular local a través de la estimulación de los fibroblastos del intestino con la síntesis de metaloproteinasas de la matriz, una familia de endopeptidasas que renuevan lentamente la matriz (Monteleone *et al.*, 2002). Las citocinas también podrían producir indirectamente cambios en la morfología del intestino a través de sus efectos en la producción de factores de crecimiento por células del estroma: el factor de crecimiento de queratinocitos se encuentra sobreexpresado en pacientes con EII, pudiendo ser responsable de la hiperplasia de las células de la cripta observada en estas condiciones (Bajaj-Elliott *et al.*, 1998).

Finalmente, la recuperación del epitelio dañado se encuentra mediada por una variedad de factores de crecimiento, ácidos grasos de cadena corta, y proteínas trébol.

Por todo lo descrito anteriormente, se puede afirmar que la EII consiste en una alteración del sistema inmune como resultado de la interacción entre distintos tipos celulares y mediadores inflamatorios (Figura 6).

#### **1.4.4. Reclutamiento celular.**

Además de la activación, una respuesta inmune en la mucosa colónica implica tanto una migración selectiva de células T vírgenes desde la circulación periférica a las placas de Peyer o a los nódulos linfáticos mesentéricos que drenan el intestino, como el reclutamiento de células T activadas (efectoras o memoria) a los sitios de inflamación/daño, importante en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria.



**Figura 6.** Patogénesis de la EII. Los antígenos bacterianos acceden al epitelio intestinal cuya permeabilidad se encuentra alterada. Las CPAs (células dendríticas, macrófagos, células epiteliales) presentan estos antígenos a las células T CD4<sup>+</sup> residentes originando la liberación de citocinas proinflamatorias. Esto trata de ser compensado por la acción de las células T reguladoras. Además, desde el torrente sanguíneo son reclutados polimorfonucleares neutrófilos, que, a través de la liberación de mediadores, colaboran con el proceso inflamatorio. PAF, factor activador de plaquetas; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas del oxígeno.

### *Migración de células vírgenes*

El proceso de extravasación de las células T vírgenes desde la circulación periférica a las placas de Peyer o a los nódulos linfáticos mesentéricos del intestino es logrado por la interacción específica entre L-selectina asociada a célula T y su ligando la molécula de adhesión celular portadora dependiente de glicosilación 1 (*Glycosylation dependent cell adhesion molecule 1*, GlyCAM-1) localizado en células endoteliales especializadas en el tejido linfático que reciben el nombre de vénulas de endotelio alto. Además, las células T vírgenes pueden migrar específicamente a la mucosa del intestino a través de la interacción entre la integrina  $\alpha_4 \beta_7$  asociada a célula T y la molécula de adhesión celular adresina 1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*, MAdCAM-1) de la célula endotelial de la mucosa (Abbas, 2004). Si las células T vírgenes entran en contacto con el antígeno activándose, estas células T activadas proliferan, se despojan de sus L-selectinas, e incrementan la expresión en superficie de moléculas de adhesión adicionales tales como la integrina  $\alpha_L \beta_2$  (antígeno asociado a la función leucocitaria 1, *leukocyte function-associated antigen 1*, LFA-1), integrina  $\alpha_4 \beta_1$  (antígeno de activación muy tardía 4, *very late activation antigen 4*, VLA-4,) y CD44 (Abbas, 2004). La progenie de estas células T activadas pueden entonces diferenciarse en células efectoras o memoria. A diferencia de las células efectoras, las células memoria pueden existir durante largos períodos de tiempo (20 años) en ausencia de la estimulación antigénica (Abbas, 2004). Estos linfocitos no producen moléculas efectoras, como las citocinas, a menos que se enfrenten de nuevo con el antígeno. Tras la activación inicial de las células T en el tejido linfoide, las células efectoras o memoria ingresan de nuevo en la circulación sanguínea a través de vías linfáticas eferentes y del conducto torácico.

### *Reclutamiento de células T activadas*

En el regreso a la circulación sistémica, las células T activadas no migran de forma eficiente al tejido linfoide debido a la pérdida de la L-selectina de superficie. En lugar de ello, estas células migran preferentemente a zonas de infección/inflamación donde el antígeno original responsable accede al tejido. Este nuevo patrón de migración es mediado

por la interacción de la integrina  $\alpha_4\beta_1$ , la integrina  $\alpha_L\beta_2$ , y CD44 asociados a linfocito con la molécula de adhesión a célula vascular 1 (*vascular surface adhesion molecule 1*, VCAM-1), ICAM-1 y -2, y hialuronato, respectivamente (Abbas, 2004). Así, las células T efectoras y memoria poseen patrones de migración muy diferentes a los de las células vírgenes. Tras la extravasación, una célula T memoria o efectora puede reencontrarse con su antígeno. Esta segunda interacción antígeno-específica activa a los linfocitos para sintetizar y liberar citocinas, desencadenándose toda la respuesta inflamatoria. Muchos de los mediadores liberados como consecuencia de esta respuesta juegan un papel importante en el reclutamiento y activación de linfocitos, leucocitos fagocíticos como los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) y macrófagos, lo cual induce un daño tisular, y como consecuencia las manifestaciones clínicas de la EII.

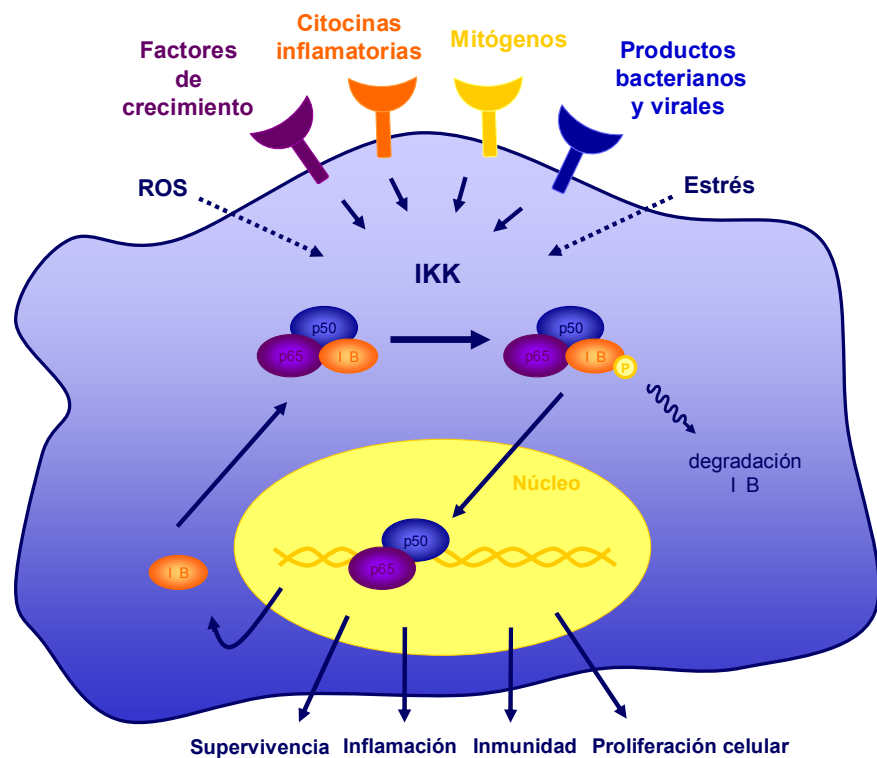
#### **1.4.5. Mecanismos moduladores de la expresión de genes proinflamatorios.**

##### *Factor nuclear $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)*

Tanto en la EC como en la CU, la excesiva respuesta inmune local está caracterizada por una síntesis aumentada de citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-16, y TNF $\alpha$  en la mucosa (Monteleone *et al.*, 2002). Los elementos claves en el control de la síntesis de estas citocinas inflamatorias continúan sin estar determinados. Candidatos importantes pueden ser los factores de transcripción que se unen a regiones promotoras de genes. Entre estos, el NF $\kappa$ B parece ser un regulador de la expresión inducible de muchos genes de citocinas (por ejemplo, IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) en linfocitos, monocitos, y células epiteliales del intestino, y su actividad se encuentra aumentada en la mucosa de pacientes con EII activa (Neurath *et al.*, 1998). Además, una gran variedad de citocinas inflamatorias, como IL-1, IL-18 y TNF $\alpha$ , presentan la capacidad de activar al NF $\kappa$ B. Este hecho podría proporcionar un mecanismo de retroalimentación capaz de perpetuar el proceso inflamatorio en el intestino. El NF $\kappa$ B está constituido por homo y heterodímeros de miembros de la familia NF $\kappa$ B: p50, p52, p65, c-Rel y RelB, siendo la forma activa más frecuente la formada por p50/p65. En la mayoría de los tipos celulares los complejos NF $\kappa$ B



inactivos se encuentran secuestrados en el citoplasma a través de interacciones covalentes con proteínas inhibidoras conocidas como IκBs. En respuesta a múltiples estímulos extracelulares, como citocinas, patógenos virales y bacterianos, y agentes inductores de estrés, el complejo citoplasmático latente NFκB/IκBα es activado por fosforilación de IκBα, gracias a la actividad de un complejo multimérico conocido como complejo IκB kinasa (IKK). La fosforilación de IκBα induce su ubiquitinización, produciéndose la degradación de esta subunidad inhibidora por el proteosoma (Karin y Ben-neriah, 2000). Este proceso deja libre al NFκB para migrar desde el citoplasma hasta el núcleo, donde regula la expresión de múltiples genes diana implicados en el control de la proliferación y supervivencia celular, en la respuesta inflamatoria e inmune, y de genes autorreguladores como IκBα (Kumar *et al.*, 2004) (Figura 7).



**Figura 7.** Vía del factor nuclear κB. ROS, especies reactivas del oxígeno.

Productos bacterianos pueden activar al NFκB a través de miembros de una familia de receptores transmembrana, denominados receptores de tipo *toll* (*toll like receptors*, TLRs). TLR4 está expresado abundantemente por células mononucleares epiteliales y de la lamina propia en la mucosa en EII (Cario y Podolsky, 2000). Dado que el TLR4 funciona como una vía principal de transducción para el lipopolisacárido bacteriano (LPS), su excesivo reconocimiento puede contribuir al aumento de la actividad NFκB y la posterior síntesis de citocinas inflamatorias en la EII.

*Vía de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK)*

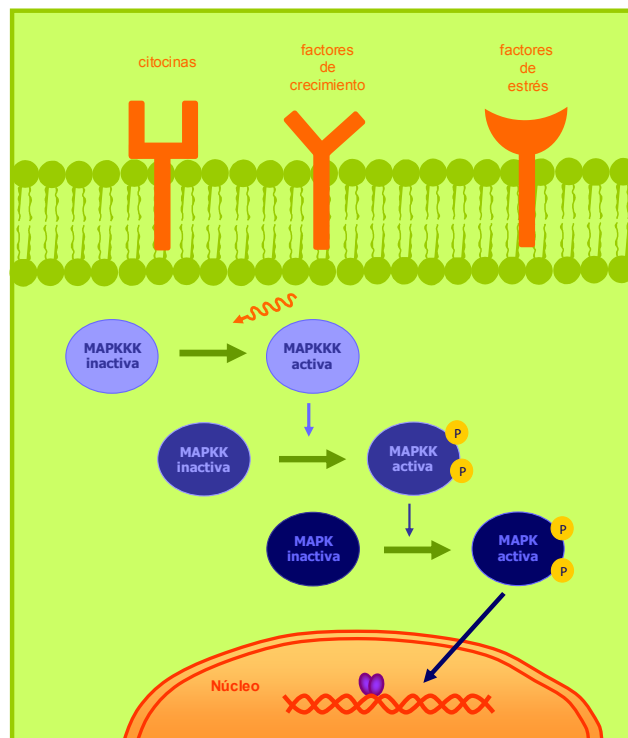
De forma semejante al NFκB, las proteínas kinasas activadas por mitógeno (*mitogen activated protein kinase*, MAPK) constituyen una de las principales cascadas proinflamatorias desde la superficie de la célula al núcleo. Las MAPK están divididas en tres subgrupos de señalización: ERK1/2 (*extracellular regulated protein kinase*), JNK (*c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase*) y p38 MAP-kinasas. Cada subgrupo se encuentra regulado de forma diferente, dando lugar a distintas acciones (Hommes *et al.*, 2003):

- la vía ERK1/2 está implicada fundamentalmente en la regulación del crecimiento celular, la proliferación y supervivencia, así como en varios procesos inflamatorios.
- la vía JNK está implicada en la regulación de la proliferación celular y apoptosis.
- la cascada de la MAPK p38 está asociada con el crecimiento celular, la diferenciación celular, la muerte celular y la inflamación.

Las vías de las MAPK son activadas por una gran variedad de estímulos y son reguladas por fosforilaciones sucesivas en forma de cascada (Figura 8). Se inician por una proteína G pequeña, que es transformada de un estado inactivo a uno activo por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina. Las proteínas G pequeñas activan la primera enzima de la cascada, una proteína-kinasa denominada kinasa de kinasa MAPK (MAPKKK)

que fosforila una segunda enzima, la kinasa de MAPK (MAPKK), que a su vez fosforila y activa a MAPK. Esta MAPK, cuando se fosforila, es activada y capacitada para translocarse del citosol al núcleo, donde a su vez puede fosforilar y activar los factores de transcripción nucleares. Así, la proteína ERK activada estimula la transcripción de Fos, un componente del factor de transcripción de la proteína activadora 1 (*activator protein 1*, AP-1) que regula la expresión de genes asociados con el crecimiento y estrés celular, mientras que la proteína JNK activada fosforila a c-Jun, el segundo componente de dicho factor de transcripción.

Se ha demostrado que las MAPK JNK y p38 están activadas en la mucosa de pacientes con EC activa y aumentadas significativamente cuando son comparadas con los niveles en biopsias de controles sanos (Hommes *et al.*, 2002).



**Figura 8.** Vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos.

## 2. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 3 (AGPI $\omega$ 3).

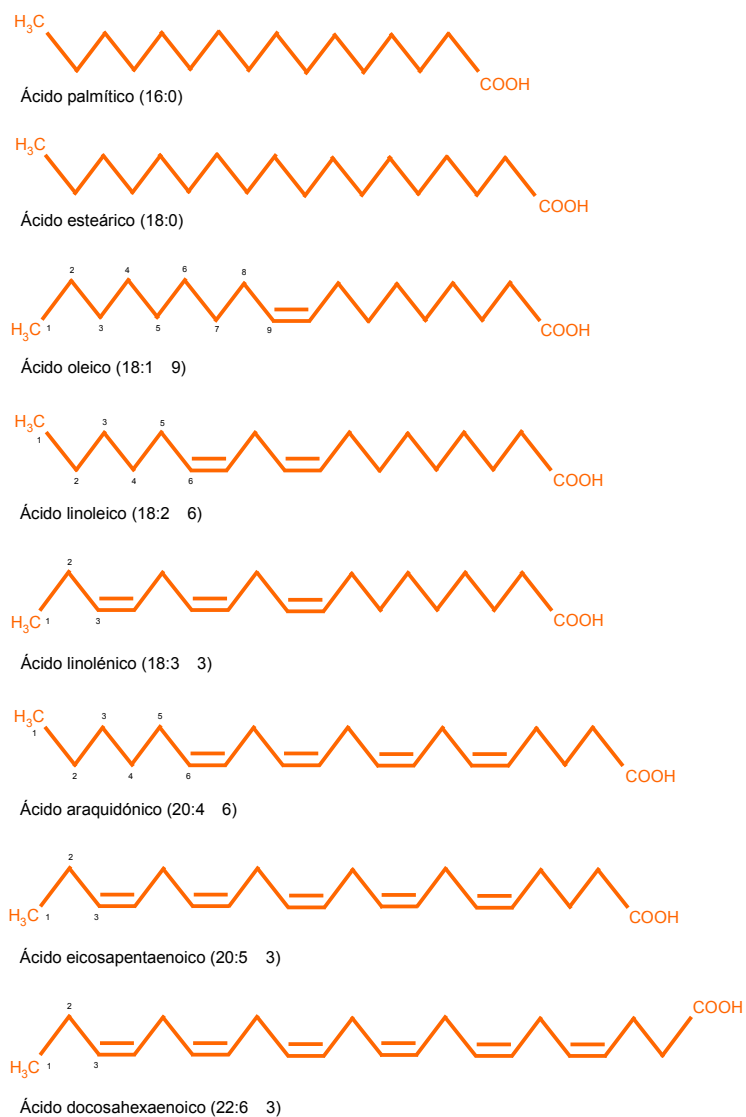
### 2.1. ESTRUCTURA, NOMENCLATURA Y BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS.

Los ácidos grasos son los lípidos más sencillos cuya estructura básica consiste en un grupo carboxílico unido a un extremo de una cadena hidrocarbonada saturada, monoinsaturada (ácido graso monoinsaturado, AGMI) o poliinsaturada (ácido graso poliinsaturado, AGPI). Los AGMI contienen un doble enlace, mientras que los AGPI presentan más de uno.

Los ácidos grasos naturales más frecuentes suelen tener un nombre común, además del nombre sistemático (Figura 9). Sin embargo, resulta mucho más útil y simple indicar exclusivamente el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces y la posición del primero de ellos contando a partir del carbono terminal no carboxílico, añadiendo omega (  $\omega$  ) o n. Por ejemplo, el ácido linoleico, ácido graso poliinsaturado de 18 átomos de carbono, viene representado por 18:2  $\omega$ 6 ó 18:2 n6. Se indica así que hay un doble enlace en posición 6, es decir, en el carbono 6 contando a partir del metilo terminal. Los restantes dobles enlaces están situados a partir de este doble enlace de manera no conjugada, quedando siempre un metileno entre ambos.

La formación de ácidos grasos insaturados y de longitud de cadena larga, ocurre a partir del ácido esteárico (Figura 10), el cual a su vez se forma a nivel de todos los organismos superiores por elongación en dos carbonos del ácido palmítico. El ácido esteárico por acción de una delta 9 desaturasa ( $\Delta$ 9-desaturasa) introduce un doble enlace en el carbono 9, transformándose en ácido oleico, reacción que ocurre tanto en el reino vegetal como animal.

Sin embargo, los mamíferos carecen de las desaturasas capaces de introducir un doble enlace en los átomos de carbono 12 (  $\Delta$ 12-desaturasa) y 15 ( $\Delta$ 15-desaturasa) de los ácidos, enzimas que se encuentran sólo en plantas; por lo tanto, no pueden sintetizar ni el ácido linoleico (18:2  $\omega$ 6) ni el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3  $\omega$ 3), respectivamente (Calder, 1997a). Estos ácidos grasos se consideran "esenciales", por lo que deben incorporarse a



**Figura 9.** Estructura y nomenclatura tradicional de ácidos grasos.

nuestro metabolismo mediante la ingesta de alimentos que los contienen (fundamentalmente de origen vegetal). También, dado que los tejidos de los mamíferos no contienen la  $\Delta^{15}$ -desaturasa no pueden interconvertir los ácidos grasos  $\omega 6$  y  $\omega 3$ .

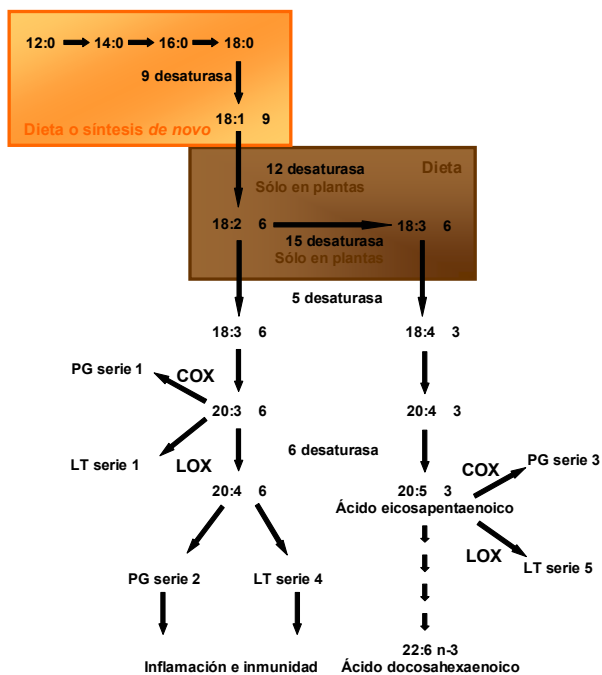


Figura 10. Ruta biosintética de los ácidos grasos.

A partir de estos ácidos grasos esenciales tanto en células animales como en vegetales se forman las familias  $\omega 6$  y  $\omega 3$  de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. El metabolismo de ambas familias es competitivo, ya que ambas vías emplean el mismo conjunto de enzimas. El principal producto final de la vía  $\omega 6$  es el ácido araquidónico (AA). Esta vía es cuantitativamente la más importante del metabolismo de los AGPI en humanos, ya que el ácido linoleico es abundante en aceites vegetales y productos basados en tales aceites, y por lo tanto consumido en mayores cantidades que el ácido  $\alpha$ -linolénico, que está presente en vegetales de hojas verdes y algunas semillas y aceites vegetales. Los principales productos finales de la vía  $\omega 3$  son el ácido eicosapentaenoico (*eicosapentaenoic acid*, EPA) y el ácido docosapentaenoico (*docosapentaenoic acid*, DPA); sólo una pequeña cantidad de ácido  $\alpha$ -linolénico avanza a lo largo de la vía metabólica entera dando lugar al ácido docosahexaenoico (*docosahexaenoic acid*, DHA). Sin embargo, el pescado graso contiene lípidos que tienen una alta proporción de AGPI de cadena larga  $\omega 3$ , EPA y DHA, y

son las principales fuentes de estos ácidos grasos. Lo que explica la abundancia de estos ácidos grasos  $\omega$ 3 en algunos aceites de pescado marinos, es su biosíntesis por parte de estos animales a partir del ácido linolénico presente en el plancton que les sirve de base alimentaria.

## **2.2. MECANISMOS INMUNOMODULADORES DE LOS AGPI.**

El estudio de la organización estructural y de los papeles fisiológicos de los ácidos grasos en las células, ha permitido identificar nuevos mecanismos por los cuales podrían modular la función inmune. Los ácidos grasos juegan numerosos papeles en todas las células: son importantes como fuente de energía, como componentes estructurales de las membranas celulares y como moléculas de señalización. A continuación se describen algunos de sus mecanismos inmunomoduladores.

### **2.2.1. Modulación de la síntesis de eicosanoides.**

Los eicosanoides, productos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3  $\omega$ 3), AA (20:4  $\omega$ 6) y EPA (20:5  $\omega$ 3), tienen una vida muy corta, actúan localmente de forma autocrina o paracrina y ejercen su acción sobre diversos procesos biológicos como la inflamación y la hemostasia. De entre los tres ácidos grasos precursores, el AA es el más importante, tanto cualitativa como cuantitativamente, en los fosfolípidos de las membranas celulares (Pacheco *et al.*, 1987). Cuando las células reciben estímulos específicos, se activan enzimas que hidrolizan los fosfolípidos de las membranas. Una de estas enzimas es la fosfolipasa (PL)  $A_2$  que rompe específicamente el enlace éster en posición 2 del fosfoglicérido (Murakami *et al.*, 1997) y produce, sobre todo, AA. Este ácido graso se convierte en compuestos eicosanoides mediante reacciones de oxidación. En estas reacciones participan las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) que originan prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina de la serie 2. En contraste con la COX-1 expresada constitutivamente, la expresión de COX-2 es inducida por la activación de células inflamatorias resultando en un aumento de la producción de prostaglandinas (PG) (Mitchell y Warner, 1999). Los monocitos y macrófagos producen grandes cantidades de  $PGE_2$  y  $PGF_2$ , los neutrófilos cantidades moderadas de  $PGE_2$ , mientras que los mastocitos sintetizan

PGD<sub>2</sub>. El metabolismo del AA vía 5-lipoxigenasa (5-LOX) proporciona hidroxí e hidroperoxi derivados (ácidos 5-HETE y 5-hidroperoxieicosatetraenoico respectivamente) y leucotrienos (LT) de la serie 4. Neutrófilos, monocitos y macrófagos producen LTB<sub>4</sub>, mientras que LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> suelen ser sintetizados por mastocitos, basófilos y eosinófilos.

La mayoría de los eicosanoides de las series 2 y 4 tienen una existencia efímera, de minutos e incluso de segundos. Pero son efectores poderosos, con actividades biológicas muy variadas e incluso contrapuestas. Aunque los linfocitos son una fuente pobre de eicosanoides (Goldyne, 1988), estos mensajeros ejercen gran influencia en su función (Calder *et al.*, 2002); por ejemplo, la PGE<sub>2</sub> inhibe la proliferación de linfocitos y la producción de citocinas Th1 (Calder, 1997b). Esta prostaglandina también es capaz de suprimir la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 y IL-6 por monocitos y macrófagos (Calder, 1997b), lo cual forma un importante bucle regulador. Además de estos efectos antiinflamatorios, la PEG<sub>2</sub> presenta efectos proinflamatorios: aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación e incremento del dolor y edema causado por otros agentes como la histamina. El LTB<sub>4</sub> ejerce efectos proinflamatorios: aumenta la inflamación incrementando la permeabilidad vascular, aumenta el flujo sanguíneo local y es un potente agente quimiotáctico para leucocitos, induciendo la liberación de enzimas lisosomales y la producción de especies reactivas del oxígeno así como de TNF $\alpha$ , IL-1 y IL-6 (Kinsella *et al.*, 1990). Además, es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos y promover la actividad de células NK. Sin embargo, la PGE<sub>2</sub> puede interferir con la producción de LT de la serie 4 a través de la inhibición de la 5-LOX. Además, el AA también puede dar lugar a lipoxinas antiinflamatorias debido a la actividad 15-LOX (Levy *et al.*, 2001).

Las modificaciones en los eicosanoides derivados de los AGPI han sido consideradas como un mecanismo principal de la acción inmunomoduladora de estos ácidos grasos, particularmente los de las series  $\omega$ 3. En general, la incorporación de AGPI en los fosfolípidos de membrana ocurre principalmente a expensas de AA, reduciendo así la cantidad de sustrato disponible para la síntesis de eicosanoides a partir de AA (Calder, 2005). Además, los AGPI  $\omega$ 3 son capaces de disminuir la actividad PLA<sub>2</sub> en macrófagos e inhibir competitivamente el metabolismo del AA en células inmunes reduciendo la síntesis de



eicosanoides a partir de AA. Este efecto ha sido demostrado en muchas ocasiones tras el consumo de aceite de pescado tanto en modelos animales como en humanos (Yaqoob, 2004). Además de los efectos en la generación de eicosanoides a partir de AA, el EPA puede actuar como un sustrato tanto para la COX como para la 5-LOX, dando lugar a derivados que tienen una estructura diferente a la de los sintetizados a partir de AA (es decir, PG de la serie 3 y LT de la serie 5). Así, la supresión inducida por EPA en la producción de eicosanoides derivados de AA puede estar reflejada por una elevación en la producción de eicosanoides derivados de EPA, con frecuencia, biológicamente menos potentes que los análogos sintetizados a partir del AA (por ejemplo, el LTB<sub>5</sub> presenta sólo alrededor de un 10% de la potencia del LTB<sub>4</sub> como agente quimiotáctico). Distintos estudios, tanto en animales de experimentación como en humanos, han demostrado que el consumo de aceite de pescado resulta en un aumento importante de la producción de los LT de la serie 5 (Yaqoob, 2004).

Con respecto a la actuación a nivel de la enzima, datos recientemente publicados indican que el DHA y el EPA inhiben la expresión de COX-2 mediada por el TLR2 en monocitos (Lee *et al.*, 2003). Esto indica que los AGPI alteran la síntesis de eicosanoides también a nivel de la expresión génica, mecanismo que se añade a la complejidad de las interacciones de AGPI con las vías de los eicosanoides.

Recientemente, se ha identificado un nuevo grupo de mediadores denominados resolvinas E, formados a partir de EPA y que parecen ejercer una actividad antiinflamatoria (Serhan *et al.* 2000a; 2000b; 2002), sugiriéndose que podría constituir incluso un mecanismo por el que los AGPI  $\omega$ 3 modulan el proceso inflamatorio intestinal (Arita *et al.*, 2005). Además, se sugiere que las resolvinas D, los docosatrienos y las neuroprotectinas, mediadores derivados del DHA, también presentan efectos antiinflamatorios (Hong *et al.*, 2003; Marcheselli *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2004).

### **2.2.2. Componentes de balsas lipídicas (*rafts*).**

Los *rafts* lipídicos son microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos, y con cadenas aciladas del fosfolípido enriquecidas en ácidos grasos

saturados (Simons e Ikonen, 1997). Las proteínas localizadas en los *rafts* pueden ser tanto extracelulares, como intracelulares o de transmembrana. Las proteínas extracelulares residentes en *rafts* están unidas a la membrana plasmática por un anclaje glico fosfatidilinositol mientras que las proteínas intracelulares y transmembrana incluidas en los *rafts* están modificadas con unión a ácidos grasos acetilados.

Los *rafts* lipídicos están implicados en la transducción de señal a través del TCR y de otros receptores, como el de citocinas (Bromley *et al.*, 2001). Muchas proteínas implicadas en la señalización celular se encuentran constitutivamente presentes en los *rafts* y su funcionalidad es dependiente de su acilación con ácidos grasos como el mirístico o palmítico. Curiosamente, el papel de los *rafts* de membrana en las células Th1 y Th2 parece ser diferente; existe una activación de TCR dependiente de *rafts* en células Th1, mientras que en las células Th2 no se encuentra esta dependencia (Balamuth *et al.*, 2001). La razón no está clara pero se ha sugerido que es debido a diferencias en la composición, distribución o cantidad de *rafts* lipídicos (Horejsi, 2003, Goebel *et al.*, 2002).

El tratamiento de células T con AGPI desplaza selectivamente a las proteínas aciladas de la cara interna de la bicapa lipídica de los *rafts*, mientras que las proteínas ancladas por GPI en la cara exoplásmica no se ven afectadas (Stulnig *et al.*, 1998; 2001). El EPA es más potente en el desplazamiento de proteínas aciladas desde los *rafts* lipídicos de membrana, mientras que en el caso del AA y el DHA, este efecto es menos pronunciado (Stulnig *et al.*, 1998). Tales desplazamientos de proteínas claves en los procesos de transducción de señal tienen como consecuencia una alteración de la función de los linfocitos (Yaqoob, 2004); desplazamientos que pueden ser debidos a cambios en la composición del *raft* conduciendo a su remodelado, o a la acilación de esas proteínas con los AGPI en vez de ácidos grasos saturados como consecuencia de la poca especificidad de ciertas aciltransferasas. Un ejemplo de la alteración de la función de linfocitos como consecuencia de la desorganización parcial de los *raft* lipídicos, es el desplazamiento y posterior activación de fosfolipasa D en estas células por el DHA (Díaz *et al.*, 2002). La activación de la fosfolipasa D podría ser la responsable de los efectos antiproliferativos del DHA en las células linfoides (Díaz *et al.*, 2002). Además, también ha sido demostrada la

capacidad de los AGPI  $\omega$ 3 para modular la composición de los *raft* lipídicos *in vivo* (Fan *et al.*, 2003).

Por último, es interesante destacar que los AGPI  $\omega$ 3 promueven la muerte celular inducida por activación en células Th1, pero no en Th2 (Switzer *et al.* 2003). Dado que la activación de Th1 se sugiere que depende de los *rafts* lipídicos, mientras que la de las células Th2 es independiente, Fan *et al.* (2003) especulan que la modulación de la composición de *raft* lipídicos podría tener un papel en la disminución de la respuesta Th1 y por lo tanto en las propiedades antiinflamatorias de los AGPI  $\omega$ 3.

### **2.2.3. Transducción de señal.**

Muchos lípidos están directamente implicados en las vías de señalización intracelular. Por ejemplo, la hidrólisis de fosfolípidos como el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato o la fosfatidilcolina genera segundos mensajeros como el diacilglicerol. La capacidad de las fosfolipasas para generar estos segundos mensajeros se ve modificada por la composición de los fosfolípidos de las membranas celulares que le sirven de sustrato (Miles y Calder, 1998; Calder, 2003). Otros fosfolípidos activan o estabilizan enzimas implicadas en la señalización intracelular, como la fosfatidilserina que es requerida para la activación de la proteína quinasa C (PKC).

Varios estudios han determinado la capacidad de los AGPI  $\omega$ 3 para inhibir la actividad PKC (Speizer *et al.*, 1991; May *et al.*, 1993) así como para disminuir la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (Sperling *et al.*, 1993). Además, estos ácidos grasos pueden actuar sobre canales de calcio modificando la concentración de calcio libre intracelular, un componente clave en la vía de señalización intracelular (Chow *et al.*, 1990).

### **2.2.4. Regulación de la expresión de genes.**

Los AGPI regulan la expresión de genes tanto directamente, por la interacción con receptores nucleares, como indirectamente, alterando otras vías de señalización iniciadas en la membrana plasmática que regulan la expresión genética alterando la actividad de

factores de transcripción (Jump, 2002). Como consecuencia de la interacción directa con AGPI o sus metabolitos, los receptores nucleares son candidatos para mediar las acciones de estos ácidos grasos en el sistema inmune.

Los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR) son una familia de receptores de los que los principales miembros son el PPAR $\alpha$ , expresado predominantemente en linfocitos de forma constitutiva, y el PPAR $\gamma$ , que se encuentra principalmente en células mieloides (Jones *et al.*, 2002). Mientras PPAR $\alpha$  es activado por una gran variedad de ácidos grasos, PPAR $\gamma$  presenta cierta selectividad por ácidos grasos insaturados (Desvergne y Wahli, 1999), lo cual indica un posible mecanismo de clases específicas de ácidos grasos (particularmente AGPI  $\omega$ 3) para mediar sus efectos en la función celular a través de estos receptores nucleares.

Agonistas de PPAR $\gamma$  son capaces de inhibir la proliferación de células T humanas (Clark *et al.*, 2000), promover la apoptosis de clones de células T colaboradoras murinas (Clark *et al.*, 2000), disminuir la expresión de TNF $\alpha$ , IL-6 y IL-1 $\beta$  en monocitos, de la óxido nítrico sintasa inducible, la metaloproteinasa-9 de la matriz y receptor A *scavenger* en macrófagos, y la IL-2 en linfocitos T (Jiang *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Estos resultados son importantes para la EII, dado que la mucosa colónica expresa altas concentraciones de PPAR $\gamma$  (Jain *et al.*, 1998; DuBois *et al.*, 1998). De hecho, ratones deficientes en PPAR $\gamma$  son más susceptibles a la colitis inducida por hapteno, produciéndose una mejora tras la administración de ligandos agonistas asociada a la reducción de citocinas proinflamatorias (Desreumaux *et al.*, 2001).

Sin embargo, parece no haber distinción entre los AGPI  $\omega$ 3 y los  $\omega$ 6 con respecto a su afinidad de unión y/o capacidad de activación de estos receptores, así como relación con la longitud de la cadena o el número de dobles enlaces (Yaqoob, 2004). Por ello, no se puede afirmar que un tipo concreto de ácidos grasos presente una capacidad superior para actuar como ligando de PPAR en el sistema inmune *in vivo*.

Los AGPI pueden regular la expresión de genes actuando sobre vías de señalización que modifican la actividad del NF $\kappa$ B. La inhibición de la translocación de este factor de

transcripción al núcleo por parte de los AGPI  $\omega$ 3 ha sido demostrada tanto en ensayos *in vitro* reduciendo la producción de citocinas proinflamatorias (Denys *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004), como *ex vivo* en células aisladas de animales alimentados con aceite de pescado (Xi *et al.*, 2001).

Además, el EPA reduce la actividad del factor de transcripción AP-1, a través de la inhibición de la vía de las MAPK (Babcock *et al.*, 2003).

### **2.2.5. Modulación de la flora intestinal.**

Los AGPI pueden modificar la adhesión de bacterias gastrointestinales a la mucosa (Kankaanpaa *et al.*, 2001), probablemente a través de la modificación de la composición de la pared intestinal. Puesto que la adhesión de las bacterias gastrointestinales a la mucosa es esencial para los efectos beneficiosos de los probióticos, los AGPI  $\omega$ 3 podrían mejorar su efectividad (Bomba *et al.*, 2003).

Finalmente, en la figura 11 se exponen los distintos mecanismos a través de los cuales los AGPI  $\omega$ 3 ejercen su actividad antiinflamatoria.

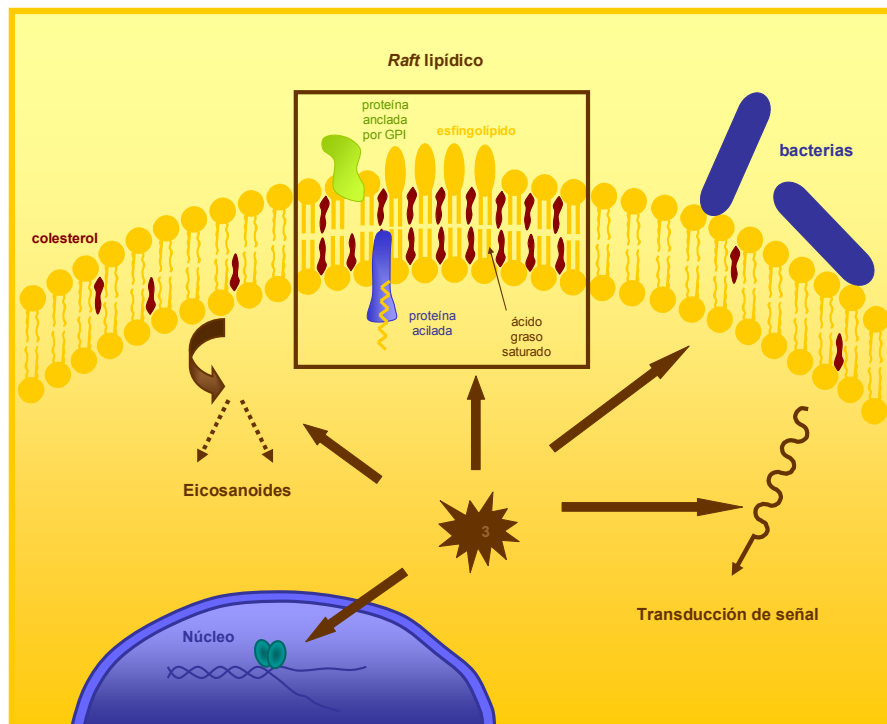
## **2.3. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS $\omega$ 3 Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.**

Son numerosos los efectos moduladores de los AGPI  $\omega$ 3 sobre el sistema inmune, lo cual indica que pueden ser importantes en el tratamiento de muchas enfermedades inflamatorias crónicas, entre ellas la EII.

Aunque el antagonismo del metabolismo del AA es clave en la actividad antiinflamatoria de los AGPI  $\omega$ 3, estos ácidos grasos presentan otros muchos efectos que son consecuencia de procesos posteriores a la producción de eicosanoides, o incluso independientes de ella. Los más destacables son:

1. Modulación de linfocitos.

Los AGPI  $\omega 3$  son capaces de disminuir la actividad de células NK tanto en animales (Yaqoob *et al.*, 1994a) como en humanos (Purasiri *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 1991). Sin embargo, a pesar de que estos ácidos grasos inhiben la proliferación de linfocitos en distintos estudios animales (Arrington *et al.*, 2001; Jolly *et al.*, 1997; Yaqoob *et al.*, 1994b), existe una gran controversia sobre esta actividad en humanos (Yaqoob, 2004).



**Figura 11.** Mecanismos antiinflamatorios de los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega 3$ . GPI, glicofosfatidilinositol

2. Producción de citocinas.

Estudios en cultivos celulares han demostrado que el EPA y el DHA pueden inhibir la producción de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en monocitos (Chu *et al.*, 1999). En concordancia con estos resultados, el consumo de aceite de pescado redujo los niveles de estas citocinas, además

de la IL-6, tanto en macrófagos de roedor (Renier *et al.*, 1993; Yaqoob y Calder, 1995; Wallace *et al.*, 2000) como en monocitos humanos (Trebble *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2003). Los AGPI  $\omega$ 3 también han sido relacionados con un descenso en la producción de IL-2 en linfocitos así como en la expresión de su receptor (Calder, 1997b).

### *3. Presentación de antígeno.*

Tanto monocitos humanos de sangre periférica de voluntarios sanos alimentados con aceite de pescado (Hughes *et al.*, 1996a) como monocitos humanos incubados con EPA y DHA (Hughes y Pinder, 1997), han mostrado una disminución de la expresión del CMH-II, indicando que esta actividad podría ser importante en la modulación de la respuesta inmune por parte de los AGPI  $\omega$ 3.

### *4. Expresión de moléculas de adhesión.*

Los ácidos grasos  $\omega$ 3 disminuyen la expresión en la ICAM-1 en la superficie de macrófagos de ratón (Miles *et al.*, 2000) así como en monocitos humanos (Hughes *et al.*, 1996b).

## **2.3.1. Modelos animales de EII y AGPI $\omega$ 3.**

Son varios los estudios experimentales de EII que tratan de establecer una relación entre el efecto beneficioso de los AGPI  $\omega$ 3 y la modificación de distintos parámetros indicadores de inflamación.

La mejora del proceso inflamatorio intestinal ha sido relacionada con una disminución de los eicosanoides proinflamatorios de la serie 2 y 4. Así, los AGPI  $\omega$ 3 determinaron un descenso de los niveles de estos mediadores en el colon de animales con inflamación por ácido acético (Campos *et al.*, 2002); esta actividad también se vio reflejada en el plasma (Shoda *et al.*, 1995), y en la mucosa (Inui *et al.*, 1996; Nieto *et al.*, 1998; 2002) y contenidos luminares (Vilaseca *et al.*, 1990; Guarner *et al.*, 1992) intestinales de animales con colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS).

Aunque el perfil de eicosanoides es el parámetro estudiado con más frecuencia en los modelos experimentales, otro tipo de mecanismos han sido implicados en los efectos antiinflamatorios de los AGPI  $\omega$ 3. Así, se ha demostrado su capacidad para mejorar la función barrera de la mucosa (Marotta *et al.*, 1995; Whiting *et al.*, 2005) restableciendo los procesos de absorción tras el proceso inflamatorio intestinal (Empey *et al.*, 1991). Por otra parte, estos ácidos grasos también poseen la capacidad de reducir el infiltrado en polimorfonucleares neutrófilos presente en la colitis de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (*severe combined immunodeficient*, SCID) (Whiting *et al.*, 2005), resultados que están de acuerdo con la disminución de los niveles de actividad mieloperoxidasa (MPO) colónicos en el modelo de TNBS (Nieto *et al.*, 2002), que determina de forma indirecta la presencia de este tipo celular.

Más recientemente, se ha establecido la actividad de los AGPI  $\omega$ 3 en la producción de citocinas proinflamatorias, mostrando un claro efecto antiinflamatorio por la inhibición de los niveles colónicos de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 (Whiting *et al.* 2005) así como de la IL-6 plasmática (Andoh *et al.*, 2003), en los modelos de colitis de SCID y TNBS respectivamente.

### **2.3.2. Ensayos clínicos de AGPI $\omega$ 3 en la EII.**

La primera evidencia de la importancia de la ingesta dietética de los ácidos grasos  $\omega$ 3 deriva de los estudios epidemiológicos en las que se observó una menor incidencia de EII en los esquimales. Un estudio realizado por Shoda *et al.* (1996) examinó la correlación entre la incidencia de la EC y el cambio dietético en la población japonesa. Desde 1966 a 1985 comparó anualmente los cambios producidos en la dieta con la incidencia de la enfermedad, período de tiempo en el que hubo un desplazamiento desde una dieta basada predominantemente en pescado a una dieta más occidental. El análisis de datos reveló que el aumento en la incidencia de la EC estuvo fuertemente correlacionado con un consumo aumentado en la dieta de grasa total, grasa animal, grasas poliinsaturadas  $\omega$ 6, proteínas animales y una relación de ácidos grasos  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 aumentada.

Hay que destacar que los enfermos con EII presentan perfiles anormales plasmáticos de ácidos grasos (Esteve-Comas *et al.*, 1992; 1993; 1995), que persisten en los



pacientes con CU seis meses después de la colectomía (Esteve *et al.*, 1998), lo que indica una anomalía primaria en el metabolismo de los AGPI en esta enfermedad.

Además, los infartos gastrointestinales multifocales, que constituyen uno de los primeros pasos en el desarrollo de la EII (Wakefield *et al.*, 1989), sugieren que las plaquetas y el tromboxano (TX)<sub>2</sub> pueden desempeñar un papel fundamental en esta enfermedad (Lee *et al.*, 1985). Por ello, el tratamiento con AGPI  $\omega$ 3 es recomendable ya que la respuesta plaquetaria disminuye en los pacientes con EII (Jaschonek *et al.*, 1991).

Desde el punto de vista clínico, el primer indicio del beneficio de los AGPI  $\omega$ 3 se obtuvo en 1989, cuando McCall *et al.* trataron a 6 pacientes con CU activa con 3-4 g de EPA al día durante 12 semanas y observaron que había una mejora significativa de los síntomas y de la apariencia histológica, asociadas a un descenso en la producción de LTB<sub>4</sub> por los neutrófilos.

En 1990 Salomon *et al.*, en otro estudio no controlado con placebo, administraron a 10 pacientes con CU refractarios a los tratamientos convencionales, 2,7 g/día de EPA y 1,8 g/d de DHA durante 8 semanas. Todos los indicadores de actividad de la enfermedad mejoraron en 7 pacientes, aunque en otros 3 no se obtuvo mejoría o fue muy ligera.

El primer ensayo prospectivo, controlado y doble ciego fue publicado por Lorenz *et al.* (1989), quienes trataron 29 pacientes afectados de EC, en diferentes estadios de actividad, y 10 pacientes con CU activa durante 7 meses en un estudio cruzado. Los enfermos recibieron 3,2 g/día de APGI  $\omega$ 3 o aceite de oliva como placebo, encontrando resultados prometedores en el caso de los enfermos con CU, aunque la actividad clínica no se vio modificada en los pacientes de EC tras la suplementación con el aceite de pescado.

En 1992 Hawthorne *et al.* publicaron el primer gran estudio controlado con uso de placebo, de los efectos de la administración por vía oral de ácidos grasos  $\omega$ 3 en la EII. En dicho estudio se trataron 96 pacientes con CU en diferentes grados de actividad con 4,5 g/día de EPA durante 1 año. Los pacientes que ingerían el placebo recibían aceite de oliva. En los pacientes con CU activa, tratados con  $\omega$ 3, se observó una disminución en la

utilización de esteroides, pero el aceite de pescado no previno la recaída en el grupo de pacientes en remisión. En cambio, la producción de LTB<sub>4</sub> por los neutrófilos disminuyó en más de un 50%.

Stenson *et al.* (1992) llevaron a cabo un estudio cruzado, aleatorizado, doble ciego y controlado con aceite vegetal como placebo, administrando diariamente 3,24 g de EPA y 2,16 g de DHA a 24 pacientes con CU activa durante 4 meses. Los pacientes ganaron peso, mejoraron la histología del colon y la producción de LTB<sub>4</sub> en los dializados rectales disminuyó en más de un 60%, aunque la disminución en el uso de corticoides no fue significativa.

Aslan y Triadafilopoulos (1992) llevaron a cabo un estudio similar al anterior administrando 4,2 g/d de ácidos grasos  $\omega$ 3 a 11 pacientes con CU activa durante 3 meses y observaron una disminución del 72% en la administración de esteroides para controlar la enfermedad. El índice de actividad de la enfermedad disminuyó un 56%, aunque la mejora de la histología colónica no alcanzó significancia estadística.

En 1993 Greenfield *et al.*, en un estudio aleatorizado y controlado con aceite de oliva y de onagra como placebos, administraron aceite de pescado a 43 enfermos con CU establecida durante 6 meses, sin obtener ninguna mejora clínica.

Más recientemente, Loeschke *et al.* (1996) presentaron datos de un estudio doble ciego, controlado con placebo sobre la prevención de la recaída en la CU. 64 pacientes con CU en remisión, distribuidos aleatoriamente, tomaron 5,1 g/d de ácidos grasos  $\omega$ 3 o la misma cantidad de aceite de maíz durante dos años. A los tres meses, el grupo que ingería el aceite de pescado presentaba ya un menor número de recaídas que el grupo que ingería el placebo, aunque este efecto no se mantuvo al final del estudio.

Lorenz-Meyer *et al.* (1996) publicaron un gran estudio aleatorizado y controlado mediante placebo en el que 204 pacientes con EC que se recuperaban de una recaída se distribuían aleatoriamente para recibir 5,1 g/d de ésteres etílicos de AGPI  $\omega$ 3 o aceite de maíz como placebo, durante 1 año. En el grupo tratado con  $\omega$ 3 la cantidad de prednisolona

que fue necesaria utilizar para el control de la enfermedad disminuyó, aunque no mostró ningún efecto sobre el mantenimiento de la remisión en la EC.

Belluzzi *et al.* (1996) llevaron a cabo un estudio controlado y doble ciego en 78 pacientes con EC, utilizando un suplemento de 2,7 g/d de ácidos grasos  $\omega$ 3 encapsulado, durante 1 año. El número de recaídas disminuyó significativamente, con un 59% de pacientes que permanecían en remisión en el grupo tratado con el suplemento de ácidos grasos  $\omega$ 3.

Posteriormente, Almallah *et al.* (1998; 2000a; 2000b) trataron a 18 pacientes con proctocolitis de forma aleatoria con 3,2 g/d de EPA y 2,4 g/d de DHA o con la correspondiente cantidad de un placebo a base de aceite de girasol durante 6 meses. El grupo tratado con los ácidos grasos  $\omega$ 3 presentaba una menor actividad de las células NK asociada a una disminución en los niveles séricos de LTB<sub>4</sub>. Por otra parte, los pacientes tenían un menor número de células que expresan CD3 y CMH, así como IgM. Todo ello evidencia que los ácidos grasos  $\omega$ 3 suprimen la reactividad inmune en los pacientes afectados de proctocolitis, lo cual puede ser importante para la terapia de la CU.

Dichi *et al.* (2000) realizaron un estudio comparativo entre los efectos de 2g/d de sulfasalazina y 5,4 g/d de ácidos grasos  $\omega$ 3 en el tratamiento de la CU activa. Para ello, 10 pacientes recibieron de forma aleatoria tanto el fármaco como aceite de pescado durante 2 meses, mostrando que la mejora de la actividad de la enfermedad tras el tratamiento con sulfasalazina es superior a la de los ácidos grasos  $\omega$ 3.

En el 2002, Middleton *et al.* trataron, diariamente y de forma aleatoria, a 63 pacientes con CU inactiva durante 12 meses con 1,6 g de ácido  $\alpha$ -linolénico, 270 mg de EPA y 45 mg de DHA o aceite de girasol como placebo. La suplementación de la dieta con esta combinación de ácidos grasos esenciales no prolongó el período de remisión de la CU.

En todos los estudios anteriores se han evaluado los posibles efectos beneficiosos de los AGPI  $\omega$ 3 en la EII desde un punto de vista fundamentalmente clínico; sin embargo poco se conoce sobre su actividad en la producción de citocinas pro o antiinflamatorias en

estos enfermos. A este respecto, Nielsen *et al.* (2005) realizaron un estudio aleatorio en 31 pacientes con EC activa que recibieron 3 g/d de ácidos grasos  $\omega$ 3 o 7,8 g/d de  $\omega$ 6 durante 9 semanas. Los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$ , proteína quimiotáctica de monocitos-1, IL-2, IL-4, IL-5 y la IL-10, se determinaron a las 5 y 9 semanas del tratamiento. En general, los enfermos que recibieron ácidos grasos  $\omega$ 6 mostraron de forma significativa un incremento en los niveles de las citocinas proinflamatorias junto con una disminución de las antiinflamatorias en la EC activa. Sin embargo, los ácidos grasos  $\omega$ 3 no presentaron modificaciones en la mayoría de estos mediadores, en contraste con los  $\omega$ 6.

En conjunto, todos los datos disponibles (Tabla 2) son insuficientes para poder establecer una conclusión clara sobre el papel de los AGPI  $\omega$ 3 en la EII (Belluzzi, 2004; MacLean *et al.*, 2005). La mayoría de los ensayos realizados no son comparables, puesto que:

1. Los AGPI  $\omega$ 3 se emplean en forma de distintas preparaciones con una absorción e incorporación a los tejidos diferente, lo que determina que las dosis diarias asumidas de estos ácidos grasos no sean comparables.

2. Muchos de los placebos empleados no pueden considerarse como tales, ya que presentan efectos *per se*, como el aceite de oliva.

3. Aunque las muestras de pacientes son aparentemente homogéneas, difieren las características de cada uno de estos enfermos. En este sentido, un mismo estado de remisión de EC presenta un riesgo de recaída diferente dependiendo del tiempo transcurrido desde el último proceso agudo.

4. Algunos de los estudios realizados son cruzados, con un período corto entre los dos tratamientos, lo cual no permite el desplazamiento completo de los AGPI  $\omega$ 3 de las membranas, pudiendo interferir con los resultados finales de los estudios (Endres *et al.*, 1989).

Toda esta controversia, se espera que sea aclarada tras los resultados que se obtengan de dos estudios multicéntricos bien diseñados: EPIC-1 y EPIC-2 (EPanova In Crohn's disease). Epanova© es un preparado de cubierta entérica de ácidos grasos EPA y DHA, que está siendo administrado en dos subgrupos de pacientes con EC. El estudio EPIC-1 consiste en un ensayo clínico en fase III realizado en ocho países, principalmente europeos, en pacientes en remisión; EPIC-2 también se trata de un ensayo clínico en fase III, pero desarrollado en Estados Unidos y Canadá, en pacientes con la enfermedad activa y tratados con esteroides con el objeto de lograr la remisión.

**Tabla 2.** Ensayos clínicos de AGPI  $\omega$ 3 en la EII

Autor	Tipo de ensayo	n	Enfermedad	Dosis $\omega$ 3	Duración	Resultados principales
<b>McCall <i>et al.</i> (1989)</b>	No C	6	CU activa	3-4 g/d EPA	12 sem	Mejoría de síntomas e histología; descenso de LTB <sub>4</sub>
<b>Salomon <i>et al.</i> (1990)</b>	No C	10	CU refractarios a medicación	2,7 g/d EPA 1,8 g/d DHA	8 sem	70% de mejoría de indicadores de enfermedad
<b>Lorenz <i>et al.</i> (1989)</b>	ACX	39	CU, EC	3,2 g/d $\omega$ 3	7 meses	Mejoría de indicadores de enfermedad en CU pero no en EC
<b>Hawthorne <i>et al.</i> (1992)</b>	ACD	96	CU distintos grados de actividad	4,5 g/d EPA	1 año	Disminución del uso de esteroides; >50% descenso de LTB <sub>4</sub> ; no mejora de recaídas
<b>Stenson <i>et al.</i> (1992)</b>	ACDX	24	CU activa	3,2 g/d EPA 2,2 g/d DHA	4 meses	Ganancia de peso; mejora de la histología del colon; 60% de disminución de LTB <sub>4</sub> en dializados rectales; no mejora el uso de corticosteroides

**Tabla 2 continuación** Ensayos clínicos de AGPI  $\omega$ 3 en la EII.

<b>Autor</b>	<b>Tipo de ensayo</b>	<b>n</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Dosis <math>\omega</math>3</b>	<b>Duración</b>	<b>Resultados principales</b>
<b>Aslan y Triadafilopoulos, (1992)</b>	ACDX	11	CU activa	4,2 g/d $\omega$ 3	3 meses	72% de reducción en el uso de corticosteroides; 56% mejora en actividad de enfermedad; mejora no significativa de la histología
<b>Greenfield et al., (1993)</b>	AC	43	CU	Aceite de pescado	6 meses	Ninguna mejora clínica
<b>Loeschke et al. (1996)</b>	ACD	64	CU en remisión	5,1 g/d $\omega$ 3	2 años	Menor número de recaídas inicial, no mantenida al final del estudio
<b>Lorentz-Meyer et al. (1996)</b>	AC	204	EC	5,1 g/d $\omega$ 3	1 año	Reducción en el uso de prednisona; no mejora de recaídas
<b>Belluzzi et al. (1996)</b>	ACD	78	EC	2,7 g/d $\omega$ 3 Microencapsulado	1 año	Menor número de recaídas y mayor tiempo de remisión (59%)
<b>Almallah et al. (2000)</b>	AC	18	Proctocolitis	3,2 g/d EPA 2,4 g/d DHA	6 meses	Menor actividad de células NK; disminución de LTB <sub>4</sub> ; menor número de células CD3, CMH e IgM
<b>Dichi et al., (2000)</b>	ACX	10	CU suave a moderada	5,4 g/d $\omega$ 3 frente a 2 g/d sulfasalazina	2 meses	Actividad de la enfermedad superior a sulfasalazina
<b>Middleton et al. (2002)</b>	ACD	63	CU inactiva	1,6 g/d GLN 270 mg EPA 45 mg DHA	1 año	No mantenimiento de la remisión

**Tabla 2 continuación** Ensayos clínicos de AGPI  $\omega$ 3 en la EII.

Autor	Tipo de ensayo	n	Enfermedad	Dosis $\omega$ 3	Duración	Resultados principales
Nielsen <i>et al.</i> (2005)	AD	31	EC activa	3 g $\omega$ 3 frente a 7,8 g $\omega$ 6	9 semanas	Mantenimiento perfil citocinas frente al aumento de las proinflamatorias y disminución de antiinflamatorias de $\omega$ 6

C, controlado con placebo; A, aleatorizado; X, cruzado; D, doble ciego; GLN, ácido  $\omega$ -linolénico

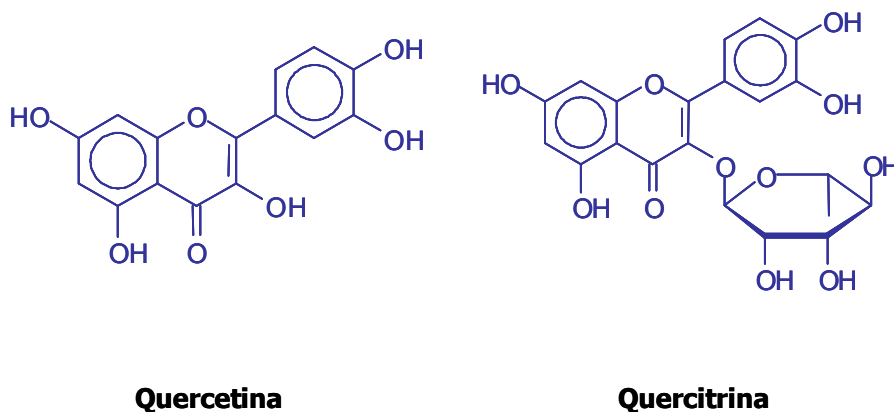
### 3. FLAVONOIDES.

#### 3.1. ASPECTOS GENERALES.

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos que aparecen en casi todas las plantas superiores. Poseen un origen biosintético común y por ese motivo, un mismo elemento estructural básico C6-C3-C6 con diferentes grados de oxidación dando lugar a distintos grupos: flavonoles, flavonas, flavanonas, catequinas (o flavanoles), isoflavonas, antocianos, dihidroflavonoles, chalconas y auronas. Las diferentes modificaciones químicas que tienen lugar dentro de cada una de estas clases, tales como hidrogenaciones, hidroxilaciones, sulfuraciones, metilaciones, acetilaciones, así como la incorporación de distintos restos azucarados, dan lugar a la gran diversidad de flavonoides que se pueden encontrar, siendo aproximadamente 5000 los identificados. La mayoría de los flavonoides se encuentran en forma de heterósidos, y entre los azúcares que entran a formar parte de su estructura se incluyen la D-glucosa, la L-ramnosa, la glucoramina, la galactosa y la arabinosa.

Los flavonoles son los flavonoides mayoritarios en la dieta, particularmente abundantes en frutas y vegetales (McCarty, 2001). La quercetina (Figura 12), el principal

flavonol de la dieta, se encuentra no sólo en estos alimentos, sino también en bebidas como el té o el vino. La importancia de los distintos alimentos como fuentes de quercetina varía entre países como consecuencia de los distintos hábitos alimenticios. Por ello, es difícil determinar el consumo en flavonoles, aunque se establece una ingesta media de 35 mg por día, de los que el 91% está constituido por la quercetina (Noroozi *et al.*, 2000). De hecho, la quercitrina (Figura 12) y la rutina son los flavonoides más comunes en forma de heterósidos en la dieta, los cuales tienen como genina común a la quercetina, el flavonoide mayoritario en alimentos vegetales (Hertog *et al.*, 1993).



**Figura 12.** Estructura química de la quercetina y la quercitrina.

Los flavonoides presentan numerosos efectos biológicos, los cuales se relacionan principalmente con dos de las actividades que caracterizan a los flavonoides y que han sido ampliamente descritas en numerosos trabajos de investigación: sus propiedades antioxidantes y/o captadores de radicales libres (Cos *et al.*, 1998; Mora *et al.*, 1990), así como su capacidad de interferir con la actividad de distintos sistemas enzimáticos (Middleton, 1998).



Dado que la EII se caracteriza por una situación de estrés oxidativo colónico y por la alteración de la función de ciertas enzimas celulares, el uso terapéutico de los flavonoides en esta patología podría resultar beneficioso a efectos preventivos y curativos, puesto que la ingestión de flavonoides, tanto a través de la dieta como en forma de principios activos de medicamentos, origina la presencia de estos compuestos biológicamente activos en el tracto gastrointestinal durante períodos de tiempo más o menos prolongados, donde pueden ejercer un efecto farmacológico.

### **3.2. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA INTESTINAL DE LOS FLAVONOIDES.**

#### **3.2.1. Flavonoides y EII.**

Los flavonoides son compuestos que, además de estar dotados de una baja toxicidad (Middleton *et al.*, 2000), presentan unas características idóneas para ser considerados como compuestos antiinflamatorios aplicables en la EII:

a) son compuestos que presentan propiedades antioxidantes y/o antiradicalarias *in vitro* (Mora *et al.*, 1990); habiéndose incluso demostrado para algunos de ellos la capacidad de incrementar el contenido intestinal de glutathion (GSH) cuando se administran a ratas normales por vía oral, protegiendo el intestino del daño de tipo lipoperoxidativo que puede generarse cuando existe una sobreproducción de radicales libres (Galvez *et al.*, 1994; Valenzuela *et al.*, 1989).

b) inhiben distintas enzimas cuya expresión y/o actividad se encuentran incrementadas en los procesos inflamatorios (Wollenweber, 1988).

c) disminuyen la actividad de diversas células del sistema inmune, tal y como se ha podido comprobar en distintos ensayos *in vitro* (Middleton, 1998; Middleton *et al.*, 2000).

El primer estudio que apuntó el potencial efecto beneficioso de los flavonoides en la EII fue realizado por Galsanov *et al.* (1976). En él se describe la actividad antiinflamatoria

presentada por la quercitrina, a las dosis de 25 y 100 mg/kg, en un modelo de inflamación intestinal de tipo alérgico en rata. Más recientemente se ha valorado la actividad de los flavonoides en varios modelos bien establecidos de inflamación intestinal en rata, como el modelo de colitis inducida por ácido acético, TNBS y sulfato de dextrano sódico (*dextran sulfate sodium*, DSS) que presentan algunas similitudes con la EII en humanos (Elson *et al.*, 1995). Distintos flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria intestinal en estos modelos, heterósidos como la quercitrina (Sanchez de Medina *et al.*, 1996), la rutina (Cruz *et al.*, 1998; Galvez *et al.*, 1997), la diosmina y la hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), y geninas como la morina o la silimarina (Cruz *et al.*, 2001; Galvez *et al.*, 2001; Ocete *et al.*, 1998). Estos efectos beneficiosos se han puesto de manifiesto en las fases aguda y crónica del proceso inflamatorio intestinal. Así, los flavonoides previenen el daño colónico agudo cuando se administran antes de la administración del agente lesivo (ácido acético o TNBS), y facilitan la recuperación del tejido colónico dañado en la fase crónica del proceso inflamatorio cuando se inicia la administración del flavonoide una vez inducido el daño. Es difícil establecer una relación estructura-actividad, ya que el número de flavonoides ensayado hasta el momento es bajo, aunque parece existir una mayor eficacia del flavonoide en forma de heterósido sobre la genina, como ha demostrado un estudio del efecto de la rutina y la quercetina en un modelo de colitis experimental inducida por DSS en ratones (Kwon *et al.*, 2005). No obstante, diferentes tipos de flavonoides, incluyendo flavonoles (en forma de heterósidos como la quercitrina y la rutina o como geninas como la morina), un heterósido de flavona (la diosmina), un heterósido de flavanona (la hesperidina) y un flavanolignano (la silimarina) han mostrado actividad. De todos los flavonoides ensayados hasta el momento, la quercitrina es el más potente, al ejercer su actividad preventiva o curativa a las dosis de 1 y 5 mg/kg, mientras que el resto de los flavonoides ejercen su actividad antiinflamatoria intestinal en un rango de dosis entre 10 y 25 mg/kg, cuando se trata de los heterósidos, y entre 10 y 200 mg/kg cuando se estudiaron las geninas. Recientemente, el dosmalfato, un compuesto derivado de la diosmina, ha mostrado ser efectivo en los modelos de colitis inducida por DSS (Villegas *et al.*, 2003a) y TNBS (Villegas *et al.*, 2003b) en ratones. Finalmente, el estudio del efecto terapéutico de la administración oral de un flavonoide sintético, DA-6034, en los modelos de colitis experimental inducidos por TNBS y ácido acético, y el de colitis espontánea en ratas

transgénicas HLA-B27, mostró que dicho flavonoide resultó ser igualmente eficaz que otros fármacos ampliamente utilizados en la EII, como son prednisolona y sulfasalazina (Kim *et al.*, 1999).

### **3.2.2. Mecanismos de la actividad antiinflamatoria intestinal de los flavonoides.**

Se ha propuesto la participación de distintos mecanismos en la actividad antiinflamatoria intestinal de los flavonoides.

#### *3.2.2.1. Propiedades antioxidantes y/o antiradicalarias.*

Los flavonoides representan una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana, dadas sus propiedades como agentes quelantes de metales, secuestradores de radicales, inhibidores de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y/o inductores de la expresión de enzimas protectoras (Erlund, 2004).

Casi todos los estudios coinciden en que tres grupos estructurales incrementan la capacidad antioxidante de los flavonoides: el grupo o-dihidroxilo en el anillo B, un doble enlace en posición 2,3 en conjugación con un grupo carbonilo en posición 4 en el anillo C, y la presencia simultánea en 3 y 5 de grupos hidroxilos (Bors *et al.*, 1990). Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante.

Varios estudios han indicado que las geninas, como quercetina, luteolina, miricetina y kampferol, presentan una capacidad antioxidante mayor que sus formas heterosídicas como la rutina, la quercitrina, o la 3-glucosil quercetina (Noroozi *et al.*, 1998) por lo que su actividad como antioxidante se puede ver modificada por la presencia del azúcar en la estructura del fenilpropano. Ioku *et al.* (1995) mostraron que la actividad antioxidante en un sistema artificial de membranas de la quercetina en forma heterosídica es menor que la de la genina, sugiriendo que la glicosilación debilita la actividad antioxidante de los flavonoides. Este descenso puede deberse al bloqueo de los grupos fenólicos responsables

de la retirada de los radicales y de la quelación de metales y, posiblemente, también a una disminución de la accesibilidad a las membranas a causa del gran grupo glucosídico.

Todos los flavonoides estudiados mejoran el estado de estrés oxidativo asociado al proceso inflamatorio intestinal inducido experimentalmente (Galvez *et al.*, 2001; Loguercio *et al.*, 1996), ya que o bien preservaban la depleción de glutatión o reducían el contenido colónico de malondialdehído, dos de los marcadores bioquímicos indicativos del grado de peroxidación lipídica en el tejido intestinal. Este efecto puede considerarse de gran interés dado que los radicales libres, incluyendo los derivados del oxígeno y los del nitrógeno, desempeñan un papel clave en la etiopatogénesis de la EII en humanos (Yamada y Grisham, 1994).

### *3.2.2.2. Actuación sobre el metabolismo del óxido nítrico.*

El óxido nítrico (NO) es un radical libre, con moderada reactividad comparado a otras especies, que es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS). La oxidación de un nitrógeno terminal del aminoácido L-arginina produce NO y L-citrulina. Tres isoformas han sido identificadas: dos están presentes de forma constitutiva tanto en el tejido neuronal (nNOS) como en el endotelial (eNOS), denominadas óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS), mientras que una tercera isoforma se expresa tras la inducción por ciertas citocinas, microorganismos y productos bacterianos, y es llamada óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Knowles y Moncada, 1994), localizada en una gran variedad de células como son los hepatocitos, los macrófagos y el músculo liso.

Es importante señalar el creciente interés que ha suscitado en la última década el NO en la patogénesis de la EII (Grisham *et al.*, 1999). En condiciones fisiológicas, se generan pequeñas cantidades de NO por parte de la isoforma cNOS, que ejerce un efecto protector directo en las fases iniciales del proceso inflamatorio intestinal, principalmente al inhibir la interacción entre el leucocito y el endotelio vascular así como al reducir la permeabilidad epitelial (Lefer y Lefer, 1999). Por el contrario, la síntesis de NO se incrementa en situaciones de inflamación crónica, principalmente como consecuencia de la

expresión de la isoforma iNOS. La sobreproducción de NO da lugar a un efecto lesivo como consecuencia de su interacción con el anión superóxido, generando especies reactivas como el peroxinitrito, que ocasiona una situación de estrés oxidativo y daño tisular (Miller y Sandoval, 1999). De acuerdo con esto, es probable que las propiedades biológicas de los flavonoides puedan interferir con el metabolismo del NO. En primer lugar, los flavonoides pueden preservar las funciones beneficiosas del NO al captar directamente aniones superóxido (Sichel *et al.*, 1991); en segundo lugar, los flavonoides son capaces de inhibir la iNOS (Chan *et al.*, 1997); y, por último, actúan como potentes captadores de radicales peroxinitrito (Haenen *et al.*, 1997). En consecuencia, los flavonoides pueden prevenir los efectos perjudiciales generados por el NO en situaciones de inflamación intestinal. De hecho, se ha podido comprobar que el tratamiento con morina a animales con inflamación intestinal inducida con TNBS se traduce en una disminución en la actividad de la NOS en explantes intestinales procedentes de animales colíticos (Galvez *et al.*, 2001).

#### *3.2.2.3. Inhibición de la actividad lipooxigenasa y reducción en la producción de leucotrieno B<sub>4</sub>.*

Distintos estudios han postulado que el LTB<sub>4</sub> es un mediador inflamatorio con una importante función en la EII; de hecho, la inhibición de su síntesis (Bertran *et al.*, 1996) o el bloqueo de su receptor (Fretland *et al.*, 1990) se traduce en efectos beneficiosos en la colitis experimental. Aunque la mayoría de los flavonoides estudiados reducen la producción de LTB<sub>4</sub> colónico, no se ha podido establecer una relación directa entre la inhibición en los niveles colónicos del eicosanoide y el efecto antiinflamatorio intestinal (Ocete *et al.*, 1998; Sanchez de Medina *et al.*, 1996). En cualquier caso, se puede pensar que la combinación de la acción inhibidora de la síntesis de LTB<sub>4</sub> colónico con la actividad antioxidante contribuya en el efecto beneficioso manifestado por los flavonoides en los modelos de colitis experimental. Así, el LTB<sub>4</sub> facilita la quimiotaxis de los neutrófilos, su adherencia y degranulación en el colon inflamado por el TNBS (Fretland *et al.*, 1990). Como consecuencia de la actividad metabólica de estos granulocitos se genera la sobreproducción de radicales libres responsables de fenómenos de citotoxicidad directos en el tejido intestinal, que facilita la liberación adicional de distintos mediadores proinflamatorios (Yamada y Grisham

1994). De hecho, en la mayoría de los estudios con los flavonoides en modelos de colitis experimental se observa una reducción significativa en la actividad MPO colónica, enzima que se encuentra predominantemente en los gránulos azurofílicos de los neutrófilos.

#### *3.2.2.4. Inhibición de la actividad ciclooxigenasa y reducción en la producción de prostalandina E<sub>2</sub>.*

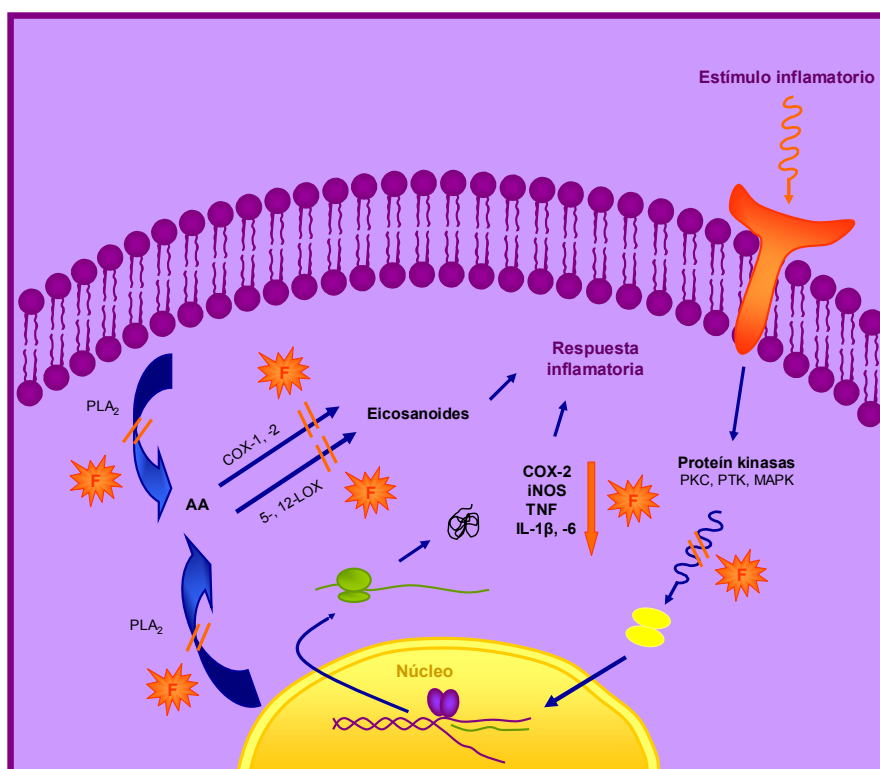
Tanto la COX-2 (Hendel y Nielsen, 1997) como las prostaglandinas (Fiocchi, 1998), productos derivados de su actividad enzimática, juegan un papel importante en la EII.

Distintos estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de los flavonoides para inhibir la expresión y la actividad de la COX-2 (O'Leary *et al.*, 2004), así como la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Chen *et al.*, 2001). De forma alternativa, el descenso de PGE<sub>2</sub> puede ser consecuencia de la inhibición de la liberación de ciertas citocinas, ya que la estimulación de macrófagos/monocitos, fibroblastos y células epiteliales con citocinas como la IL-1 y TNF estimula la producción de PGE<sub>2</sub> (Griffiths, 1999).

En un estudio muy reciente de colitis experimental, la administración de rutina presentó efectos beneficiosos, debidos en parte a una reducción en la producción de ARNm de COX-2 en la mucosa colónica, sin modificación en la de COX-1 (Kwon *et al.*, 2005).

#### *3.2.2.5. Modulación de la expresión de genes proinflamatorios.*

Los mecanismos de acción celulares de los flavonoides en la modulación de la expresión de genes han sido muy estudiados, aunque esta actuación se deriva fundamentalmente de los resultados obtenidos en ensayos *in vitro*. Las proteínas quinasas implicadas en la transducción de señales como la PKC y la MAPK, constituyen los puntos más relevantes de la regulación celular por flavonoides. A través de la inhibición de estas enzimas, la capacidad de unión al ADN de factores de transcripción como NFκB o AP-1 está regulada, controlando la tasa de expresión del gen diana (Figura 13).



**Figura 13.** Mecanismos antiinflamatorios de los flavonoides. PTK, proteína tirosín kinasa.

Manthey *et al.* (1999) revisaron la capacidad de distintos flavonoides presentes en los cítricos de inhibir la expresión de la citocina TNF en monocitos humanos, como distintas polimetoxiflavonas, el kampferol, la apigenina y la quercetina, siendo la más potente la heptametoxiflavona, que era capaz de inhibir la producción de IL-10 pero no la de IL-1β, IL-6 o IL-8. Estos autores establecieron la hipótesis de que, entre otros mecanismos, la capacidad manifestada por estos flavonoides de inhibir la actividad fosfodiesterasa podía estar relacionada con la inhibición en la producción de citocinas. Posteriormente, Xagorari *et al.* (2001) describieron que los flavonoides luteolina, 7-glucósido de luteolina, la quercetina y la genisteína inhibían la liberación de TNF y de IL-6 en células RAW 264.7 estimuladas con LPS, mientras que el eriodictiol y la hesperetina sólo inhibían la producción de TNF. Estos mismos autores concluyeron que el compuesto más potente fue la luteolina, y que en su acción estaba involucrada su capacidad de inhibir la

fosforilación de residuos de tirosina en proteínas, y en consecuencia la expresión génica mediada por el factor de transcripción NF B y la subsiguiente producción de citocinas proinflamatorias.

Otros flavonoides como la genisteína (Geng *et al.*, 1993) y la apigenina y el kaempferol (Liang *et al.*, 1999) también son capaces de inhibir la activación de NFkB.

Por otra parte, los flavonoides pueden inhibir las actividades enzimáticas de varias proteínas implicadas en las vías de transducción de señal, como la PKC (Ferriola *et al.*, 1989) y la proteína tirosín kinasa (Chang y Geahlen, 1992). Además, las MAPKs son elementos clave en la señalización celular, y la actividad de los flavonoides sobre estas vías también ha sido determinada. A este respecto, en células RAW 264.7 estimuladas con LPS, la quercetina es capaz de reducir la expresión de iNOS a través de la inhibición de la MAPK p38 (Wadsworth y Koop, 2001), así como la inducción de ICAM en células endoteliales (Kobuchi *et al.*, 1999) y de TNF $\alpha$  en una línea celular de macrófago (Wadsworth *et al.*, 2001), como consecuencia de su acción sobre JNK. Este flavonoide también fue capaz de inhibir ERK 1/2 y p38 regulando a nivel postranscripcional la producción de TNF $\alpha$  (Wadsworth *et al.*, 2001). Recientemente se ha determinado que la quercetina disminuye la activación de NFkB a través de la inhibición de ERK y p38 (Cho *et al.*, 2003). En RAW 264.7 estas MAPKs también fueron inhibidas por la luteolina (Xagorari *et al.*, 2002).

Todos los resultados anteriores han mostrado claramente que los flavonoides inhiben la expresión de enzimas/proteínas relacionadas con la inflamación, al menos en parte, por la supresión de la activación de factores de transcripción como el NFkB y el AP-1. Estas supresiones podrían deberse a la inhibición de varias proteínas implicadas en las vías de transducción de señal, como consecuencia de la unión del flavonoide al sitio de unión del ATP, provocando cambios estructurales en la kinasa que conducen a su inactividad.

Además, flavonoides como la apigenina, crisina y kaempferol, pueden inhibir la expresión de iNOS y COX-2 a través de la activación del receptor PPAR $\gamma$  (Liang *et al.*, 2001), implicado en la respuesta antiinflamatoria.



Además de reducir la producción y liberación de estos mediadores, se ha descrito que flavonoides como la apigenina, la luteolina y la quercetina son capaces de inhibir las acciones que las citocinas ejercen sobre los distintos tipos celulares tras la actuación sobre sus correspondientes receptores (Habtemariam, 1997; Ishikawa *et al.*, 1999; Panes *et al.*, 1996).

Con relación a los estudios *in vivo*, se ha descrito que el tratamiento con morina (Galvez *et al.*, 2001) en la inflamación intestinal inducida con TNBS inhibe la producción de IL-1 $\beta$ , efecto que se repite en el modelo de colitis experimental inducida con DSS para el dosmalfato (Villegas *et al.*, 2003a) y la rutina (Kwon *et al.*, 2005). En relación a otras citocinas, la disminución de la producción de TNF $\alpha$  en la mucosa colónica en la fase aguda de la colitis experimental inducida con TNBS, parece ser uno de los mecanismos implicados en los efectos protectores del dosmalfato (Villegas *et al.*, 2003b). Pocos datos se disponen de la actividad de los flavonoides sobre los factores de transcripción en estudios *in vivo*, aunque la determinación de la actividad del NF $\kappa$ B en la mucosa colónica parece ser que despierta un gran interés.

#### 3.2.2.6. Preservación de la función absortiva colónica.

La función absortiva colónica se encuentra profundamente alterada en la inflamación intestinal (Sanchez de Medina *et al.*, 2002a), de forma que su restauración puede contribuir, conjuntamente con las acciones comentadas anteriormente, en los efectos beneficiosos manifestados por los flavonoides en los modelos de colitis experimental. De hecho se ha propuesto que una alteración en la permeabilidad intestinal puede ser un factor desencadenante del proceso inflamatorio intestinal (Brandzaeg *et al.*, 1999), ya que un epitelio fácilmente permeable puede permitir la entrada en la lamina propia de antígenos bacterianos o procedentes de la dieta, que no sean convenientemente anulados por el sistema inmune de la mucosa intestinal pudiendo desencadenar la respuesta inflamatoria descontrolada. Se ha podido comprobar que la absorción colónica de fluidos *in vivo* se encuentra profundamente comprometida en diferentes modelos experimentales de inflamación intestinal, siendo una de las funciones que más tarda en recuperarse como

consecuencia del proceso inflamatorio (Sanchez de Medina *et al.*, 1996), habiéndose descrito que se encuentra incluso alterada cuando la recuperación histológica es prácticamente completa (Asfaha *et al.*, 2001). De los distintos flavonoides estudiados, la quercitrina (Sanchez de Medina *et al.*, 1996), la rutina (Galvez *et al.*, 1997), la hesperidina (Crespo *et al.*, 1999) y la morina (Ocete *et al.*, 1998) han demostrado su capacidad de promover la mejora de la funcionalidad absortiva colónica en los animales colíticos. No obstante, únicamente la quercitrina fue capaz de restaurar completamente el transporte hidroelectrolítico colónico, lo que se tradujo en una reducción de la incidencia de diarrea en comparación con el correspondiente grupo control (sin tratamiento con el flavonoide), siendo éste uno de los síntomas que caracterizan la inflamación intestinal. Es importante tener en cuenta que la mejora en esta funcionalidad colónica puede ser una consecuencia, más que una causa, de la recuperación más rápida de la mucosa sometida al proceso inflamatorio. La capacidad de los flavonoides de actuar sobre el transporte hidroelectrolítico alterado permite justificar su actividad antidiarreica.

## **OBJETIVOS**

---

El tratamiento de la EII ha sufrido un gran progreso desde el uso empírico inicial de los aminosalicilatos, antibióticos y corticosteroides. El mejor conocimiento de la etiología y fisiopatología de esta enfermedad ha propiciado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, que incluyen la utilización de fármacos inmunosupresores y de agentes biológicos. Aunque la optimización en el uso de estos fármacos ha permitido obtener elevadas tasas de respuesta, es importante resaltar que, en la actualidad, no existe un tratamiento desprovisto de reacciones adversas, lo que limita con frecuencia la administración crónica que de ellos se requiere.

En consecuencia, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que combinen eficacia y seguridad es un objetivo clave en la terapia de la EII. Una opción de gran atractivo sería la incorporación en la dieta de compuestos a los que se le han atribuido propiedades antiinflamatorias y que pudieran presentar mecanismos de acción complementarios: aceite de oliva, aceite de pescado y flavonoides.

Los objetivos planteados son:

1. Evaluar la actividad antiinflamatoria intestinal, en el modelo de colitis experimental inducida por DSS en ratas, de distintas dietas en las cuales se ha modificado su composición grasa en relación a las proporciones entre los distintos AGPI:

-  $\omega 6/\omega 9$  y  $\omega 6/\omega 3$  altas, dieta compuesta por aceite de soja.

-  $\omega 6/\omega 9$  disminuida, dieta enriquecida en aceite de oliva.

-  $\omega 6/\omega 9$  y  $\omega 6/\omega 3$  reducidas, dieta basada en aceite de oliva y de pescado.

2. Analizar el efecto del flavonoide quercitrina en el proceso colítico establecido por el DSS, profundizando en el mecanismo molecular de su actividad antiinflamatoria.

3. Valorar el posible sinergismo resultante de la combinación de la ingesta de la dieta enriquecida en aceite de pescado y la administración de quercitrina en la inflamación intestinal inducida por DSS. Con esta asociación trataremos de evaluar la posible existencia

## *Objetivos*

---

de una mejora en el estado colítico con respecto a los tratamientos individualizados, así como prevenir los procesos de peroxidación lipídica frecuentes en los AGPI.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## 1. REACTIVOS Y COMPOSICIÓN DE DIETAS.

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

Las diferentes dietas semisintéticas usadas en el presente estudio fueron proporcionadas por Harlan Interfauna Ibérica S.A (#2014). La única diferencia entre ellas fue la fuente de grasa incluida, de un 4% (p/p) de la dieta en todos los casos (Tabla 3). Las dietas fueron designadas como C (aceite de soja), O (aceite de oliva virgen) y  $\omega$  (grasa constituida por un 96% de aceite de oliva virgen y un 4% de aceite de pescado refinado). Estas dietas se caracterizaron por una relación entre AGPI:

- $\omega 6/\omega 9$  y  $\omega 6/\omega 3$  alta: dieta C
- $\omega 6/\omega 9$  baja y  $\omega 6/\omega 3$  elevada: dieta O
- $\omega 6/\omega 9$  y  $\omega 6/\omega 3$  disminuida: dieta  $\omega$

Las dietas estaban compuestas por 14,5% de proteína, 4% de aceite (descrito previamente), 4,5% de fibra (en forma de  $\alpha$ -celulosa) y 63,9% de carbohidratos (de los cuales un 44,5% estaba constituido por almidón y 5,7% por sacarosa, entre otros). El componente mineral y vitamínico representó el 4,7% y 0,8%, respectivamente. El valor calórico de cada dieta fue de 3,2 kcal/g (13,39 kJ/g).

## 2. ENSAYOS *IN VIVO*.

Estos 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).

**Tabla 3.** Contenido en ácidos grasos de las dietas C (aceite de soja), O (aceite de oliva) y  $\omega$  (96% aceite de oliva y 4% aceite de pescado del contenido en grasa)

Ácidos grasos	Dieta C	Dieta O	Dieta $\omega$
14:0	0,0	0,0	0,4
16:0	12,5	11,8	12,4
16:1 $\omega$ 7	0,0	0,9	1,3
18:0	2,1	3,0	3,0
18:1 $\omega$ 9	22,0	73,2	70,7
18:1 $\omega$ 7	1,1	2,3	2,4
18:2 $\omega$ 6	58,0	7,5	8,0
18:3 $\omega$ 3	3,7	0,5	0,6
20:4 $\omega$ 6	0,0	0,0	0,0
20:5 $\omega$ 3	0,0	0,0	0,8
22:6 $\omega$ 3	0,0	0,0	0,4
Saturados totales	14,6	14,9	15,8
Monoinsaturados totales	23,0	76,3	74,4
AGPI totales	61,7	8,0	9,8
$\omega$ 3 totales	3,7	0,5	1,8
$\omega$ 6 totales	58,0	7,5	8,0
$\omega$ 9 totales	22,0	73,2	70,7
Relación $\omega$ 6/ $\omega$ 9	2,6	0,1	0,1
Relación $\omega$ 6/ $\omega$ 3	15,7	14,0	4,5

Los valores están representados como % en relación a ácidos grasos totales.

## 2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los animales utilizados en este estudio fueron ratas albinas hembra 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 al menos 7 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 fueron alojadas individualmente en cubetas de makrolon con lecho de viruta, dispuestas en estante de acero inoxidable. Durante las dos semanas previas a ser sometidas al proceso colítico, fueron alimentadas con la correspondiente dieta para roedores, según el grupo perteneciente, y agua corriente *ad libitum* que, trascurrido ese período, fue sustituida por el agente inductor de la inflamación intestinal o agua destilada si se trataron de animales colíticos o no colíticos respectivamente.



## 2.2. INDUCCIÓN DE LA COLITIS EXPERIMENTAL.

La colitis se indujo empleando el método descrito por Stucchi *et al.* (2000) mediante la incorporación de sulfato de dextrano sódico (*dextran sodium sulfate*, DSS) (peso molecular 36000-50000) en el agua de bebida. Los animales recibieron DSS *ad libitum* disuelto en agua destilada, preparado diariamente, a una concentración del 5% (p/v) durante los cinco primeros días, seguido del 2% (p/v) durante los 10 días siguientes.

## 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño experimental se esquematiza en la Figura 14. Los animales se distribuyeron de forma aleatoria en seis grupos:

- grupo no colítico (NC, n=30): animales a los que no se les indujo el proceso inflamatorio intestinal y recibieron agua destilada, consumieron dieta C y a los que se les administró por vía oral y diariamente el mismo vehículo utilizado para administrar el flavonoide (1 mL de agua destilada).

El resto de grupos de animales fueron sometidos al proceso colítico con DSS en el agua de bebida. Dos de ellos recibieron dieta estándar C durante toda la experiencia:

- grupo control (C, n=30): animales que sólo recibieron el vehículo (1 mL de agua destilada) por vía oral.

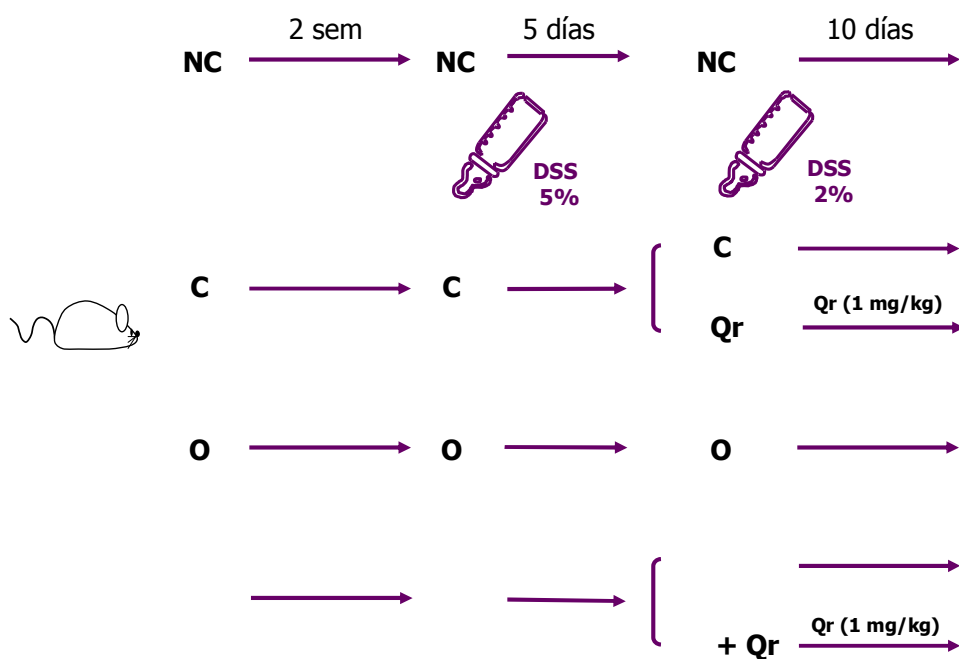
- grupo tratado con quercitrina (Qr, n=30): animales colíticos a los que se les administró diariamente por vía oral una dosis de 1 mg/kg/día del heterósido quercitrina disuelta en agua destilada (1 mL).

Los tres grupos restantes fueron alimentados con su correspondiente dieta desde dos semanas antes de la inducción de la colitis y hasta el final del experimento:

- grupo oliva (O, n=10): animales que recibieron dieta O a lo largo de toda la experiencia.

- grupo omega ( $\omega$ , n=20): animales que fueron alimentados con dieta  $\omega$  durante el ensayo.

- grupo omega-quercitrina ( $\omega + Qr$ , n=10): animales que consumieron dieta  $\omega$  y a los que se les administró diariamente por vía oral una dosis de la quercitrina de 1 mg/kg/día en agua destilada.



**Figura 14.** Diseño experimental. NC (grupo no colítico; ratas no colíticas); C (grupo control; ratas colíticas sin tratamiento y alimentadas con una dieta C estándar); Qr (grupo quercitrina; ratas colíticas tratadas con quercitrina); O (grupo oliva; ratas colíticas que recibieron una dieta rica en aceite de oliva);  $\omega$  (grupo omega; ratas colíticas alimentadas con una dieta enriquecida en aceite de pescado);  $\omega + Qr$  (grupo omega-quercitrina; ratas colíticas tratadas con quercitrina que recibieron una dieta rica en aceite de pescado).

El tratamiento con quercitrina o su vehículo correspondiente fue administrado desde el quinto día de la inducción del proceso inflamatorio intestinal, día que coincidió con el

comienzo de la administración del DSS 2%, hasta el día anterior al sacrificio de los animales.

Los animales de todos los grupos fueron sacrificados al cabo de 29 días, es decir, 15 días después del comienzo de la administración de DSS.

Durante el desarrollo de la experiencia se controló diariamente el peso corporal y el consumo de comida y agua de los animales, así como la consistencia de las heces y la presencia o no de sangre en éstas en cada rata. Estos parámetros permitieron asignar diariamente a cada animal un índice de la actividad de la enfermedad (IAE), de acuerdo con el criterio establecido por Cooper *et al.* (1993) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Escala de valoración del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en el modelo de colitis experimental inducida por DSS

IAE	Pérdida de peso	Consistencia de las heces	Sangrado rectal
0	Ninguna	Normal	No
1	1 - 5 %		
2	5- 10 %	Blanda	
3	10 – 20 %		
4	> 20 %	Diarrea	Sí

El valor del IAE es la combinación del valor de la pérdida de peso, la consistencia de las heces, y la presencia o no de sangre en las heces dividido entre 3. Adaptado de Cooper *et al.* (1993).

#### 2.4. VALORACIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO INTESTINAL.

Las alteraciones intestinales se caracterizaron macroscópica, histológica y bioquímicamente.

Antes del sacrificio de los animales, éstos fueron anestesiados con halotano con el objeto de obtener una muestra de sangre. Para ello se realizó una incisión en el abdomen hasta visualizar la aorta descendente donde se procedió a la extracción de sangre utilizando una jeringa previamente heparinizada. Seguidamente, se obtuvo el plasma mediante

centrifugación de la sangre a 3000 G durante 10 minutos a 4°C, que se almacenó a -80°C hasta su utilización para la determinación del perfil lipídico en plasma.

Una vez sacrificados los animales por dislocación cervical, se les extrajo el hígado y el colon en su totalidad, observándose la existencia o no de adhesiones entre el intestino grueso y los órganos adyacentes. Se eliminaron los posibles restos de sangre en el hígado con un lavado con solución salina isotónica, para inmediatamente ser almacenado a -80°C hasta su utilización para la determinación su contenido en ácidos grasos. Seguidamente se procedió a la limpieza del colon, retirando los restos de grasa y las adhesiones mesentéricas sobre una placa Petri con hielo. El colon se lavó con solución salina isotónica y se determinó su longitud bajo una tensión constante de 2 g, así como su peso.

En todos los casos se tomaron muestras transversales de tejido de la zona distal dañada para ser rápidamente fijadas en formaldehído al 4% (v/v) e incluidas en parafina para su análisis histológico. Por último, el colon se dividió en distintos fragmentos longitudinales que, a excepción de uno, fueron congelados inmediatamente a -80°C para la realización posterior de las determinaciones bioquímicas. El segmento destinado a la determinación de glutation 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 LTB<sub>4</sub> y de citocinas (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Todas las determinaciones se realizaron en las dos semanas siguientes al sacrificio de los animales.

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

La determinación de la actividad mieloperoxidasa colónica (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 fueron dispuestos sobre una placa Petri enfriada con hielo y picados 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 (50 mM, pH=6,0), con una dilución final de 1:20 (p/v) en un homogeneizador Heidolph hasta obtener un aspecto uniforme. El HTAB actúa como detergente, lo cual facilita la liberación del enzima MPO de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, donde se encuentra almacenada. Seguidamente, el homogenado se sonicó durante 10 segundos y se sometió a un triple proceso de congelación-descongelación que facilitó la ruptura de estructuras celulares, favoreciendo también la liberación de la enzima. Tras la última descongelación se centrifugó el homogenado 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, en una placa de 96 pocillos se añadieron 50 µL del sobrenadante a 150 µL del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por clorhidrato de o-dianisidina (0,167 mg/mL) y peróxido de hidrógeno al 0,066% en tampón fosfato (50 mM, pH=6,0). El incremento de absorbancia se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro Microplate Reader (Bio-Rad). La actividad MPO se calculó por interpolación en una curva patrón, realizada con mieloperoxidasa procedente de neutrófilos humanos. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 mmol/minuto de peróxido de hidrógeno a 25°C. Los resultados se expresan como U/g tejido fresco.

#### **2.4.2. Determinación del contenido colónico de glutathion total.**

La determinación del contenido colónico de glutathion total se realizó de acuerdo con el método de la reducción cíclica del DTNB-GSSG (Akerboom y Sies, 1981). Se basa en la oxidación del glutathion reducido (GSH) presente en una muestra a su forma oxidada (GSSG) mediante 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 glutathion reductasa (GSSGrd) en presencia de nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH). El GSH resultante 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 glutation.

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 homogenado a 2000 G durante 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante, para someterlo a una segunda centrifugación a 10000 G durante 5 minutos a 4°C. Para la determinación del glutation total se mezclaron, por este orden, 20 µL de sobrenadante, 5 µL de tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*, PBS) con ácido etilendiaminetetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) (PBS-EDTA) (solución acuosa de fosfato sódico 143 mM y EDTA 6,3 mM, pH=7,5), 140 µL de solución de β-NADPH (0,298 mM) en PBS-EDTA y 20 µL de DTNB (6 mM) en PBS-EDTA, en una placa de 96 pocillos, que se incubó a 30°C durante 5 minutos. Tras adicionar 15 µL de solución de GSSGrd (Boehringer-Mannheim, Barcelona) (266 UI/mL) en PBS-EDTA, se agitó y se registró el incremento de absorbancia a 412 nm en un dispositivo Microplate Reader (Bio-Rad). La concentración de glutation se calculó por interpolación en la curva patrón realizada con GSH. Los resultados se expresan como nanomoles de glutation total/g de tejido fresco.

#### **2.4.5. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina colónica.**

La determinación de la actividad fosfatasa alcalina (AP) en colon de rata se llevó a cabo por el método de Bessey *et al.* (1946). Los fragmentos de colon fueron dispuestos sobre una placa Petri enfriada con hielo y picados con tijeras durante aproximadamente 15 segundos. A continuación, se homogeneizaron en solución salina isotónica con una dilución final de 1:5 (p/v) en un homogeneizador Heidolph hasta obtener un aspecto uniforme. Seguidamente, el homogenado se sometió a un proceso de centrifugación a 2000 G durante 10 minutos a 4°C y se procedió a la determinación de la actividad AP. La AP presente en la muestra cataliza la hidrólisis del grupo fosfato de un reactivo coloreado, el p-nitrofenilfosfato sódico (5,5 mM) en tampón glicina (50 mM, pH=10,5), que incorpora MgCl<sub>2</sub>

(0,5 mM), dando lugar a p-nitrofenol, molécula que presenta un máximo de absorción a 405 nm. Para realizar el ensayo, se añadieron 5 L del sobrenadante a 50 L de reactivo, se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se paró la reacción con 120 L de NaOH (2N). Por último, se determinó la absorbancia de la solución resultante a 405 nm en un espectrofotómetro Microplate Reader (Bio-Rad) y se calculó la actividad AP por interpolación en una curva patrón, realizada con p-nitrofenol. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína (unidades internacionales).

#### **2.4.4. Determinación de la biosíntesis colónica de LTB<sub>4</sub>, TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .**

Para la determinación de estos parámetros bioquímicos 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 fueron incubados en tampón fosfato sódico (10 mM, pH=7,4) en proporción 1:5 (p/v) a 37°C durante 20 minutos con agitación constante. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 9000 G durante 5 minutos a 4°C y se congeló el sobrenadante obtenido a -80°C. Para la determinación de la concentración de LTB<sub>4</sub>, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se utilizaron kits comerciales de enzimoimmunoensayo suministrado por Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Reino Unido). Los resultados se expresan como ng/g de tejido fresco en el caso del LTB<sub>4</sub> y como pg/g tejido fresco en el caso del TNF y la IL-1 $\beta$ .

#### **2.4.5. Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa colónica.**

Esta determinación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Mitchell *et al.* (1991), basado en la formación de citrulina tritiada (<sup>3</sup>H-citrulina) producida por la actividad NOS procedente del segmento colónico tras su incubación con L-arginina tritiada (L-<sup>3</sup>H-arginina).

Tras descongelar el trozo de colon se picó con tijeras durante 15 segundos aproximadamente sobre una placa Petri con hielo, y posteriormente se homogeneizó en tampón de homogeneización compuesto por: ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico] (HEPES) (10 mM, pH 7,4), sacarosa (0,32 M), EDTA (100  $\mu$ M), ditioneitol (1 mM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mg/mL) y leupeptina (10  $\mu$ g/mL), en una proporción

1:5 (p/v) en un homogeneizador automático Heidolph. El homogenado se centrifugó a 20000 G durante 30 minutos a 4°C, tras lo cual se recogió el sobrenadante donde se midió tanto el contenido en proteínas por el método del ácido bicinchonínico (BCA) (Smith *et al.* 1985) como la actividad NOS.

Para la determinación de la actividad NOS, 80 µL de muestra o de tampón de homogeneización se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con 10 µL de una solución de L-arginina, preparada con 100 µL de arginina 100 µM y 10 µL de solución de clorhidrato de L-[2,3,4,5-<sup>3</sup>H] arginina (Amersham Ibérica, Barcelona) (14,7 mM, 1,0 mCi/mL) y en presencia de una solución de β-NADPH (1 mM), calmodulina (0,3 µM), tetrahidrobiopterina (10 µM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), y L-valina (10 mM), esta última para inhibir la actividad arginasa inespecífica (Rachmilewitz *et al.*, 1995), todo ello disuelto en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Para establecer la actividad NOS en presencia del inhibidor aminoguanidina, a la mezcla anterior se le adicionan 10 µL de ésta (100 µM) disuelta en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), volumen que se sustituyó por dicho tampón para la determinación de la actividad en la misma muestra en ausencia del inhibidor.

La incubación fue finalizada añadiendo 1 mL de tampón de parada: HEPES (20 mM, pH 5,5) con ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (*ethylene glycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic*, EGTA) (1 mM) y EDTA (1 mM). Seguidamente se adicionaron 1,5 mL de resina Dowex<sup>®</sup> 50W previamente activada, en forma sódica, la cual adsorbe la L-arginina. Se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 3000 G durante 5 minutos. Se recogieron 800 µL de sobrenadante, donde se encontraba la citrulina que se había formado por la acción de la NOS presente en la muestra, y se adicionaron 4 mL de líquido de centelleo Optiphase "HiSafe" 2 (Wallac, Turku, Finlandia). Tras agitar, se procedió a la medición de la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman modelo LS6000 del Laboratorio de Análisis Radiactivo del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. La actividad NOS se expresa como pmoles de L-citrulina/µg proteína/30 min.



#### **2.4.6. Determinación de la expresión de iNOS, eNOS y COX-2 en tejido colónico.**

La determinación de la expresión de iNOS, eNOS y COX-2 se realizó mediante Western blot. Para ello, los fragmentos colónicos fueron descongelados, picados y homogeneizados en proporción 1:3 (p/v) durante 1 minuto en PBS con dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) al 0,1%, desoxicolato sódico al 0,1% y Tritón X-100 al 1%, conteniendo inhibidores de proteasas (aprotinina, 1,10-fenantrolina, iodoacetamida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Seguidamente, los homogenados fueron centrifugados a 10000 G durante 10 minutos. Tras determinar el contenido en proteínas por el método del BCA, los sobrenadantes (100 µg) fueron hervidos durante 4 minutos en tampón de carga Laemli 5x (Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, SDS 5%, 2-mercaptoetanol 8,8% (v/v), glicerol 37,5%, azul de bromofenol 60 µg/mL) y sometidos a electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6%. Como indicadores de peso molecular, se utilizó una mezcla de proteínas previamente marcadas con un colorante (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (PROTAN<sup>®</sup>, Schleicher & Schuell, Germany), la cual posteriormente fue bloqueada durante al menos 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% (p/v) en tampón Tris salino (*tris buffer saline*, TBS) conteniendo Tween-20 al 0,1% (v/v) (TBS-T). Transcurrido 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. Las incubaciones con dichas diluciones de anticuerpo primario, 1:2000 frente a iNOS (Transduction Laboratories, Becton Dickinson Biosciences, Madrid, España), 1:2000 frente a eNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) y 1:1000 frente a COX-2 (Cayman Chemical Company, Montigny le Bretonneux, France), se realizaron durante toda una noche a 4°C. Un anticuerpo primario frente a β-actina se empleó como control de carga. Tras tres lavados de 5 minutos con TBS-T, las membranas fueron incubadas con anticuerpo conjugado con peroxidasa IgG anti-conejo (1:3000) durante 1 hora. Las bandas resultantes fueron detectadas por quimioluminiscencia (NEM Life Science Products, Zaventem, Bélgica) y cuantificadas por densitometría mediante el programa informático Scion Image.

#### **2.4.7. Determinación de la activación del factor de transcripción NFκB en tejido colónico.**

La activación de NFκB en tejido colónico fue establecida a través de un kit comercial de enzimoimmunoensayo (TransAM™; Carlsbad, CA). Para efectuar esta determinación los fragmentos de colon se homogeneizaron en un tampón de lisis (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,35 M, glicerol 20%, Igepal 1%, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 1 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,1 mM) conteniendo inhibidores de proteasas (aprotinina, 1,10-fenantolina, ioadacetamida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, leupeptina) y fosfatasas (ortovanadato sódico). Tras 10 minutos en hielo, el lisado fue centrifugado durante 20 minutos a 12000 G, obteniendo un sobrenadante que fue almacenado a -80°C hasta realizar el análisis. Cada extracto de proteína (10 g) fue incubado en una placa de 96 pocillos cubierta con un oligonucleótido que contenía una secuencia consenso para NFκB (5'-GGGACTTCC-3'). La forma activa de NF B presente en los extractos celulares se une específicamente a este oligonucleótido y puede ser detectada por ELISA. Los anticuerpos primarios empleados para detectar NF B reconocen un epítipo en la subunidad p65 que sólo se encuentra accesible cuando este factor de transcripción está activado y unido a su ADN diana.

#### **2.4.8. Determinación del contenido de proteínas: Método del Ácido bicinchonínico (BCA).**

En este caso se siguió la técnica descrita por Smith *et al.* (1985). Este método se utiliza cuando en el tampón de homogeneización puede haber agentes detergentes o de otro tipo que presentan reacciones de interferencia con el reactivo azul Coomassie del método convencional de Bradford. El fundamento de la técnica se basa en la capacidad de algunos aminoácidos y del enlace peptídico para reducir el Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup>.

En este método se usa un colorante con un máximo de absorbancia a 562 nm, que se obtiene mezclando dos reactivos A y B en proporción 50:1 (v/v). El reactivo A consiste en una disolución acuosa de ácido bicinchonínico (25,8 mM) en forma de sal sódica (ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolínico), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (0,16 M), tartrato sódico-potásico (5,7 mM), NaOH (0,1 M) y NaHCO<sub>3</sub> (0,11 M) (pH=11,25). El reactivo B es una disolución acuosa al 40% de

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Ambos reactivos son estables a temperatura ambiente de forma indefinida. Para realizar la determinación, se añadieron a 2 L del homogenado 200 L del reactivo de coloración y, tras incubarlo a 37°C durante 30 minutos, 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 fracción V.

#### **2.4.9. Estudio histológico.**

Para la realización de los correspondientes estudios histológicos, se obtuvieron las muestras de colon (0,5 cm de longitud) a una distancia de 2-3 cm del recto, antes de obtener las distintas tiras longitudinales utilizadas en las correspondientes determinaciones bioquímicas. Se fijaron en una solución tamponada de paraformaldehído (al 4% en tampón fosfato, pH=7,2) durante tres días. Después se deshidrataron con alcohol en concentraciones crecientes hasta alcohol absoluto y se incluyeron en parafina. Con ayuda de un microtomo se obtuvieron cortes de 3-5  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina para su evaluación histológica mediante microscopía óptica.

Los cortes histológicos se evaluaron según el criterio establecido por Stucchi *et al.* (2000) (Tabla 5).

La inmunotinción también fue realizada sobre muestras fijadas en formol tamponado e incluidas en bloques de parafina. Para la detección de los antígenos iNOS y TNF $\alpha$  se utilizó la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa tras un pretratamiento a alta temperatura para desenmascarar los antígenos. Posteriormente, las secciones fueron incubadas 15 minutos con 1% de peróxido de hidrógeno para bloquear la actividad peroxidasa endógena, y preincubadas con suero de bloquear durante 30 minutos para reducir las reacciones no específicas. Los anticuerpos primarios utilizados fueron un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.; dilución 1:100) y un policlonal de cabra anti-TNF $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.; dilución 1:100) incubados toda la noche a 4°C. Tras el primario, se utilizaron como anticuerpos secundarios los de cerdo anti-conejo y

cerdo anti-cabra biotinilados (Dako Cytomation, 1:400, 30 min) y finalmente, las preparaciones fueron incubadas con la estreptavidina-biotina-peroxidasa (Zymed P50242, 1:400, 30 min). El sistema de revelado fue evidenciado con tetracloruro de 3-3' diaminobencidina y peróxido de hidrógeno (0,01%), y los cortes fueron contrastados durante 2 minutos con hematoxilina Gill's. Las diluciones y lavados se realizaron con TBS. Los controles negativos se llevaron a cabo sustituyendo el anticuerpo primario con TBS o con suero normal.

**Tabla 5.** Escala de valoración del daño histológico en el modelo de colitis experimental inducida por sulfato de dextrano sódico

---

**Epitelio de la mucosa**

Ulceración: ninguna (0); leve (1); moderada (2); intensa transmural (3)

**Criptas**

Actividad mitótica en: tercio inferior (0); tercio medio leve (1); tercio medio moderada (2); tercio superior (3).

Infiltrado leucocitario

Depleción de moco

**Lámina propia**

Infiltrado plasmocítico

Infiltrado leucocitario

Vascularización

**Deposición de fibrina:** ninguna (0); mucosa (1); submucosa (2); transmural (3)

**Submucosa**

Infiltrado leucocitario

Edema

---

Escala de valoración: 0, ninguno; 1, leve; 2, moderado; 3, severo. Puntuación máxima: 30

Los métodos de inmunofluorescencia indirecta se realizaron de acuerdo a procedimientos establecidos. Los anticuerpos monoclonales de ratón empleados fueron anti-macrófagos de rata (BD Pharmingen, clon 1C7), anti-granulocitos de rata (BD Pharmingen, clon RP-1) y anti-linfocitos CD3 de rata (BD Pharmingen, clon G4.18). Los anticuerpos primarios fueron diluidos 1:40 en TBS e incubados en una cámara de humidificación durante toda una noche a 4°C. Las muestras se incubaron posteriormente con los

anticuerpos secundarios conjugados con tiocianato de fluoresceína apropiados (Dako Cytomation) diluidos 1:30 a 37°C. Las secciones fueron entonces montadas con un medio de montaje acuoso con 4',6-Diamino-2-fenilindol diclorhidrato ( DAPI) (Vectashield con DAPI. Vector).

#### **2.4.10. Determinación de ácidos grasos en plasma, hígado, colon y dietas.**

El perfil de ácidos grasos totales se determinó por el procedimiento descrito por Lepage y Roy (1986). Esta metodología permite realizar, en una reacción de un sólo paso, la extracción y metilación de los ácidos grasos para su análisis en muestras biológicas por cromatografía de gases.

Para ello, los fragmentos de tejido, así como las distintas dietas fueron homogeneizados en proporción 1:2 (p/v) en agua destilada. Posteriormente, 300  $\mu$ L de plasma u homogenado se añadieron en tubos de vidrio pirex con rosca, dispuestos en baño de agua-hielo. Inmediatamente después, se adicionaron 2 mL de la mezcla de metilación, metanol:tolueno 4:1 (v/v), cerrando enseguida los tubos para evitar la evaporación. Con la ayuda de un agitador mecánico se agitaron los tubos vigorosamente durante 2 minutos, con objeto de facilitar la completa extracción de la grasa. Posteriormente, bajo campana de extracción, se añadieron muy lentamente 200  $\mu$ L de cloruro de acetilo, mientras se mantuvieron los tubos en agitación. La adición de este producto permite la hidrólisis de los lípidos y su posterior metilación. Una vez adicionado el cloruro de acetilo, y tras gasear con  $N_2$ , se sometieron durante 1 hora a la temperatura de 100°C en un baño termostatzado, consiguiendo de este modo la metilación de los ácidos grasos. Transcurrida la reacción de metilación se enfriaron los tubos en un baño de agua-hielo durante 5 minutos, y seguidamente se añadieron a cada uno 5 mL de carbonato potásico al 6%, con el fin de detener la reacción y neutralizar la mezcla. Tras agitar enérgicamente durante 1-2 minutos, los tubos fueron centrifugados a 2700 G a 4°C durante 10 minutos.

La fase superior de cada tubo, en la que se encuentran los ésteres metílicos de los ácidos grasos extraídos de cada muestra, se traspasó a viales de cromatografía, que fueron sellados y mantenidos a -80°C hasta ser analizadas por cromatografía de gases.

Para el análisis por cromatografía se empleó un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama. La separación de los compuestos se realizó gracias a una columna Supelco SP2380 de 60 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, y 0,25 m de grosor de película.

La proporción de ésteres metílicos de ácidos grasos viene dada por el tanto por ciento de las áreas integradas de los picos obtenidos en los cromatogramas pertenecientes a los animales de los distintos grupos.

### **3. ENSAYOS *IN VITRO*.**

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo en macrófagos derivados de médula ósea (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM) de ratones machos de la cepa BALB/c de 18 g de peso, suministrados por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los animales se mantuvieron en grupo en cubetas de makrolon en el estabulario del laboratorio, a una temperatura de  $22\pm 2$  °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas.

#### **3.1. Obtención del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF).**

El factor estimulador de colonias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF), necesario para la diferenciación y proliferación de macrófagos murinos, se obtuvo a partir del sobrenadante del cultivo de fibroblastos de ratón de la línea celular L929, también denominado medio condicionado para macrófagos. Estas células producen altas cantidades de M-CSF mientras están proliferando.

Las células L929 fueron sembradas en frascos de cultivo de 150 cm<sup>2</sup>, a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por frasco, y cultivadas en 40 mL de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) rico en glucosa, suplementado con un 5% de suero bovino fetal (Boheringer Mannheim, Barcelona). El sobrenadante fue recogido al cabo de 7 días, momento en que las células habían llegado a confluencia. Dicho sobrenadante fue centrifugado para eliminar las células en suspensión y conservado en alícuotas a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **3.2. Obtención y cultivo de macrófagos murinos derivados de médula ósea.**

Los macrófagos murinos fueron obtenidos a partir de la médula ósea de los fémures de ratones tal como ha sido descrito anteriormente (Celada *et al.*, 1984). Para ello, los ratones de 6 a 8 semanas fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron sus fémures y se eluyó la médula ósea con medio de cultivo DMEM. Para evitar los efectos de la variabilidad entre ratones independientes, varias médulas óseas fueron recogidas en una misma placa, disgregadas, y repartidas en placas de Petri según el experimento a realizar.

Las células obtenidas fueron cultivadas en DMEM rico en glucosa, suplementado con un 20% de suero fetal bovino y un 30% del sobrenadante de células L929 como fuente de M-CSF. El cultivo de las células se llevó a cabo a una temperatura constante de 37°C y con una tensión de CO<sub>2</sub> del 5%. Al tercer día de cultivo ya se pudo observar un cambio en la morfología celular y un aumento de la adherencia a la superficie de la placa, debido a la diferenciación de los precursores de la médula ósea hacia la línea macrofágica.

Las células fueron cultivadas hasta llegar a un estado de subconfluencia (5-6 días), momento en el que se distribuyeron en placas de distintos tamaños, en función del tipo de ensayo

### **3.3. Determinación del efecto de los inhibidores sobre la viabilidad celular.**

Para llevar a cabo el estudio del efecto de los distintos inhibidores sobre la viabilidad celular se utilizó la técnica del cristal violeta, en la que una pérdida de coloración es indicativa de toxicidad, puesto que sólo las células vivas captan este colorante.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (10<sup>6</sup> células/pocillo), y se expusieron a las distintas concentraciones de quercetina y quercitrina (1-100 µM) disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) (1/1000), así como al propio vehículo, durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, tras retirar el medio y lavar repetidamente con PBS, las células se incubaron con 250 µL del colorante al 0,2% (p/v) en etanol al 2% (p/v) durante

30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron varias veces con PBS para eliminar el exceso de colorante, se recogieron en 500  $\mu$ L de SDS al 1% (p/v), se centrifugaron a 3000 G durante 5 min, y se determinó la absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de células vivas con respecto a las células incubadas en ausencia de inhibidor.

### **3.4. Determinación de la expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e iNOS en BMDM.**

Para la realización de estas experiencias, las células se sembraron a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 60 mm de diámetro y fueron incubadas durante 1 hora con distintas concentraciones de quercetina (1, 10 y 50  $\mu$ M) y quercitrina (100  $\mu$ M). Posteriormente, fueron estimuladas con lipopolisacárido bacteriano (LPS) (50 ng/mL) durante 0, 6, 12 y 24 horas. Transcurridos los distintos tiempos, la placa con los macrófagos fue depositada sobre hielo, el medio de cultivo fue eliminado, y se realizó un lavado con PBS frío. Inmediatamente, las células fueron lisadas en la propia placa en la que se encontraban adheridas y se procedió a la extracción de la proteína total.

Las células fueron lisadas sobre hielo con solución de lisis fría (Igepal CA-630 1%, HEPES-Na 20 mM pH 7,5, EGTA 10 mM, -glicerolfosfato 40 mM, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, ortovanadato sódico 2mM e inhibidores de proteasas). El lisado celular fue homogeneizado en un agitador orbital durante 15 minutos a 4°C. El material insoluble fue eliminado mediante centrifugación a 13000 G durante 8 minutos, a 4°C. La concentración proteica fue determinada mediante el método del BCA.

La expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS fue determinada por Western blot (ver apartado 2.4.6.). Una fracción de la proteína total (100  $\mu$ g) fue sometida a SDS-PAGE al 15% en el caso de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y del 7,5% para iNOS. Las distintas diluciones de anticuerpo utilizadas fueron 1:1000 para TNF (Bender MedSystems, Wien, Austria), 1:1000 para IL-1 $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y 1:2000 para iNOS (Transduction Laboratories, BD Biosciences, Madrid, España). Como anticuerpo secundario se empleó uno conjugado con peroxidasa IgG anti-conejo (1:3000).



### 3.5. Determinación de la secreción de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en BMDM.

En este ensayo, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos ( $10^6$  células/pocillo) e incubadas durante 1 hora con distintas concentraciones de quercetina (1, 10 y 50  $\mu$ M) y quercitrina (100  $\mu$ M). A continuación, se estimularon con LPS (50 ng/mL) durante 24 horas, tras las cuales se obtuvo el sobrenadante que fue centrifugado a 7000 G 10 minutos y congelado a -80 °C hasta la realización de la medida. La secreción de las citocinas fue determinada a través de un kit comercial de enzimoimmunoensayo de TNF e IL-1 $\beta$  de ratón (CytoSets<sup>TM</sup>, Biosource International, Nivelles, Belgium).

### 3.6. Determinación de la actividad JNK en BMDM.

La actividad JNK fue determinada a través de la fosforilación de GST-c-Jun, según ha sido descrita previamente (Comalada *et al.*, 2003).

Con la finalidad de conseguir macrófagos quiescentes, las células fueron cultivadas durante 18 horas, a 37°C, en DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, en ausencia de M-CSF. Posteriormente, fueron dispuestas en placas de 60 mm ( $3 \times 10^6$  células/pocillo) en presencia de quercetina (1, 10 y 50  $\mu$ M) o del inhibidor de la proteína JNK, SP600125 (25  $\mu$ M). Tras 1 hora, fueron estimuladas con LPS (50 ng/mL) durante 0, 30 y 60 minutos. A continuación, los macrófagos fueron lavados con PBS y lisados con tampón de lisis frío (Igepal 1%, HEPES-Na 20 mM pH 7,5, EGTA 10 mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 40 mM, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, ortovanadato sódico 2 mM e inhibidores de proteasas). El lisado celular fue homogeneizado en un agitador orbital durante 20 minutos a 4°C y, tras un proceso de centrifugación de 13000 G durante 8 minutos a 4°C, se determinó la concentración proteica del sobrenadante por el método del BCA. Posteriormente, 150  $\mu$ g de proteínas totales fueron mezclados con 75  $\mu$ L de proteína A-Sepharosa y 1  $\mu$ L de anticuerpo frente a JNK (sc-474, Santa Cruz Biotechnology) en un volumen total de 500  $\mu$ L, completado con tampón de lisis. Las muestras se sometieron a rotación orbital durante 2 horas a 4°C y posteriormente, los inmunocomplejos formados, fueron lavados por tres veces con PBS frío conteniendo Igepal 1% y ortovanadato sódico 2 mM, una vez con tampón JNK frío (HEPES-Na 20 mM pH 7,5,  $\beta$ -glicerolfosfato 20 mM, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, ortovanadato sódico 0,1 mM, ditiotreitól 2 mM)

y resuspendidos en el tampón de reacción JNK, que está compuesto por tampón JNK al que se le ha adicionado 1  $\mu$ g de GST-c-Jun (1–169) como sustrato (Calbiochem) y 20  $\mu$ M ATP, 1  $\mu$ Ci  $-\gamma$ -[ $^{32}$ P]ATP. La reacción tuvo lugar durante 30 minutos a 30°C y fue parada tras la adición de 12  $\mu$ L de tampón de carga Laemmli 5x. Las muestras fueron incubadas durante 3 minutos a 100°C y separadas por SDS-PAGE al 10%. Tras el proceso de electroforesis, los geles fueron fijados con una mezcla de isopropanol:agua:ácido acético (25:65:10), secados, y expuestos a una película autorradiográfica Kodak-AR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EEUU) para visualizar el resultado. La cuantificación de las bandas radiactivas se llevó a cabo mediante densitometría por el programa informático Scion Image.

### **3.7. Determinación de los niveles de I B fosforilado en BMDM.**

Los niveles de I B fosforilado se establecieron mediante Western blot. Se siguió el mismo procedimiento expuesto en el apartado 3.4., con la diferencia de que los macrófagos se encontraban en un estado de quiescencia y el tiempo de incubación con LPS fue de 5 minutos. Para la separación de las proteínas se empleó 50  $\mu$ g del lisado celular, que fue sometido a SDS-PAGE al 10%. En la detección de I B fosforilado se utilizó una dilución 1:2000 de anticuerpo primario frente a él (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

### **4. ESTUDIO ESTADÍSTICO.**

Todos los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media. La significación estadística de las diferencias entre las medias se determinó realizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias entre porcentajes se analizaron con el test de  $\chi^2$ . El umbral de significación se estableció en  $p < 0,05$ . El programa estadístico utilizado fue Sigma Stat 2.0 (Jandel, San Rafael, California, USA).

## **RESULTADOS**

---

## **1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR DSS EN RATAS.**

El modelo de colitis experimental por DSS descrito originalmente por Stucchi *et al.*, (2000) consiste en la inducción del daño colónico mediante la administración de DSS al 5% (p/v) disuelto en el agua de bebida durante 10 días. Tras intentar reproducir este modelo, se obtuvo una mortalidad de hasta un 50%, lo que condujo a realizar algunas modificaciones. Así, en el presente estudio el período de exposición al DSS al 5% se redujo a 5 días, en cambio se mantuvo al 2% (p/v) durante los 10 días siguientes. De esta forma, se logró prolongar el daño colónico en el tiempo reduciéndose la mortalidad y facilitando la modulación farmacológica del proceso inflamatorio inducido.

Para evaluar dicho modelo se valoró la evolución de las ratas a lo largo del proceso colítico, determinándose parámetros de carácter general como el peso de los animales, el consumo diario de comida, así como la consistencia de las heces y la presencia de sangre en ellas. El conjunto de estos parámetros permitieron asignar diariamente un índice de la actividad de la enfermedad (IAE) a cada animal, basándose en el criterio descrito en la Tabla 4. Tras el sacrificio, se realizó un estudio macroscópico del daño colónico generado, estableciendo una relación entre el peso y la longitud del intestino. Además, técnicas histológicas permitieron observar los distintos cambios inducidos por el DSS en el tejido colónico. Finalmente, se determinó la producción de mediadores proinflamatorios como eicosanoides y citocinas, y la expresión de diferentes enzimas, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2).

### **1.1. Evolución del proceso colítico.**

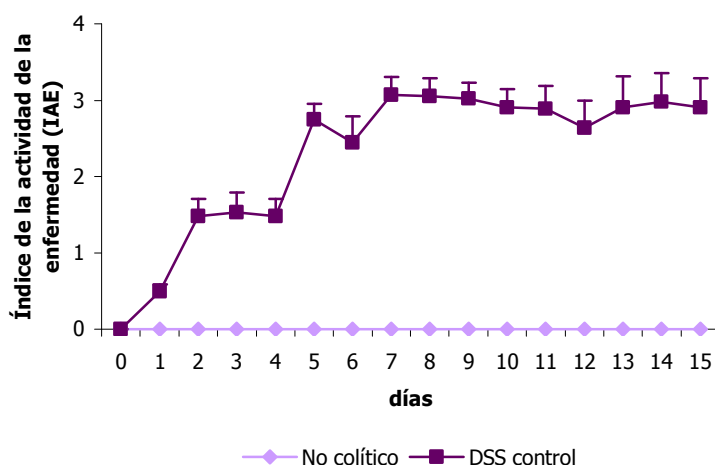
La exposición al DSS en el agua de bebida indujo un estado inflamatorio colónico con características similares a las descritas previamente (Kullmann *et al.*, 2001; Stucchi *et al.*, 2000). En este sentido:

- la mitad de las ratas desarrollaron heces blandas tras primer día de la administración, que evolucionaron a diarrea en la gran mayoría de los animales (90-100%)

a los 4-5 días. A la semana, el 70% de las ratas colíticas presentaron sangrado rectal, manteniéndose hasta el final del estudio.

- el proceso inflamatorio llevó a una pérdida progresiva de peso en todas las ratas, que podría justificarse por una reducción en el consumo de comida en comparación con las ratas no colíticas. Esta pérdida se manifestó un día después del comienzo de la administración del DSS, aumentando progresivamente hasta 6 días tras el comienzo de la experiencia, cuando el porcentaje de DSS fue modificado. A partir de este momento, el peso no se modificó significativamente en estas ratas colíticas.

La suma de los parámetros anteriores se tradujo en un aumento del IAE en los animales colíticos desde el día 1 al 5, alcanzando un valor de 2,7. Desde el día 6 al 15, el IAE permaneció casi constante hasta el final de la experiencia en este grupo de ratas (2,9) (Figura 15).



**Figura 15.** Evolución del índice de la actividad de la enfermedad a lo largo del período experimental en el modelo de colitis inducida por DSS basado en el criterio descrito en la Tabla 4. El grupo colítico mostró diferencias significativas con respecto al grupo no colítico desde el primer día de la experiencia n=30, p<0,01.

## 1.2. Estudio macroscópico y microscópico.

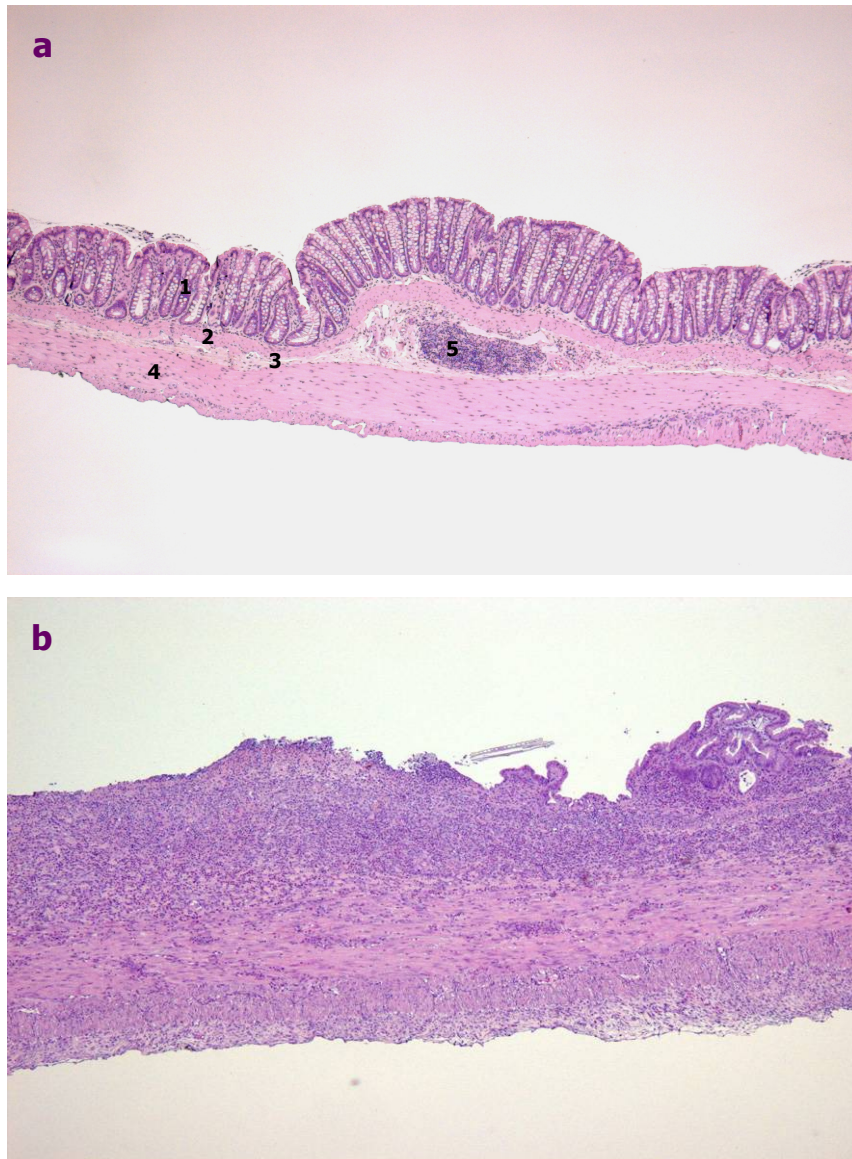
A los 15 días del tratamiento con DSS, los animales fueron sacrificados para llevar a cabo estudios tanto macroscópicos como histológicos.

El examen macroscópico mostró un engrosamiento de aproximadamente el 15% de la pared del intestino, si bien no fue significativo, asociado a una disminución de su longitud de más de 3 cm ( $p < 0,01$ ). Como consecuencia, se observó un aumento en la relación peso/longitud con respecto a los animales no colícticos ( $100,5 \pm 5,5$  vs.  $67,2 \pm 1,6$  mg/cm;  $p < 0,01$ ).

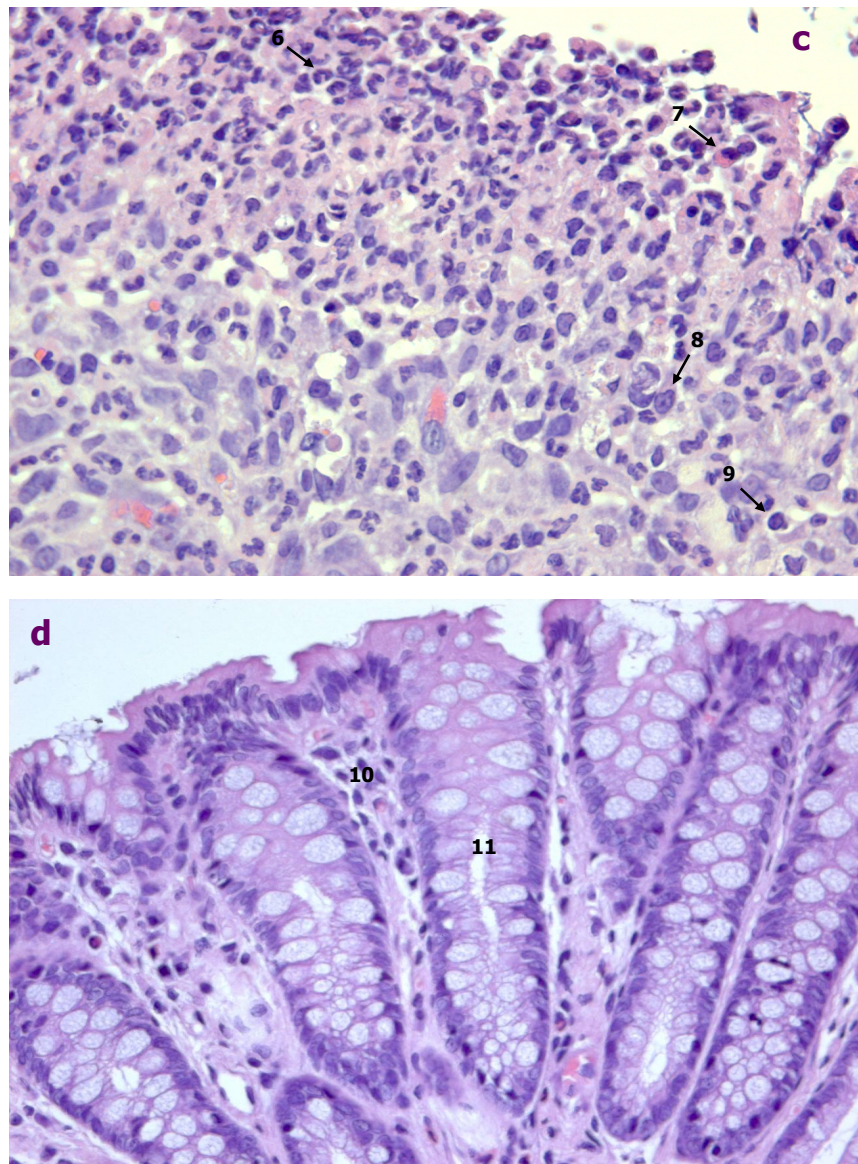
Desde un punto de vista histológico, la mucosa colónica de los animales no inflamados está constituida por un epitelio cilíndrico ciliado simple y unas criptas o glándulas de Lieberkuhn que incluyen abundantes células caliciformes con gran contenido en mucopolisacáridos (Figura 16a). Sin embargo, los animales tratados con DSS presentaron una ulceración del epitelio de la mucosa que, junto con las criptas intestinales, fueron sustituidos por un infiltrado inflamatorio (Figura 16b). Con frecuencia, la capa muscular de la mucosa, constituida por una fina capa de fibras musculares lisas, desapareció como consecuencia del proceso colíctico. El infiltrado se extendió hasta la submucosa y las capas musculares (Figura 16b).

La inflamación se caracterizó por la presencia en la superficie colónica de polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos fundamentalmente, y de linfocitos y macrófagos en la parte inferior (Figura 16c). El infiltrado inflamatorio ocupó la totalidad de la lámina propia, a diferencia de la pequeña población de células linfoides y del sistema mononuclear fagocitario que aparece en esta capa en condiciones no inflamadas (Figura 16d).

La cronificación del daño originó un tejido de granulación formado por células inflamatorias mononucleares (linfocitos y macrófagos), fibroblastos y neovasos (Figura 16e). En las zonas de reepitelización de la mucosa, aparecieron células epiteliales indiferenciadas, que en condiciones normales se encuentran situadas en la base de las criptas, con numerosas figuras mitóticas y citoplasmas intensamente basófilos (Figura 16f). Sólo cuando



**Figura 16.** Cortes histológicos de colon teñidos con hematoxilina y eosina. **(a)** Grupo no colítico donde se observa la mucosa (1) con la muscular de la mucosa (2), la submucosa (3), la muscular (4) y una placa de Peyer (5) (X5) **(b)** Grupo colítico con ulceración del epitelio de la mucosa e infiltración a lo largo de toda la pared intestinal (X5).



**Figura 16 continuación.** Cortes histológicos de la mucosa colónica teñidos con hematoxilina y eosina. **(c)** Grupo colítico con infiltración de la lámina propia; (6) polimorfonuclear neutrófilo, (7) eosinófilo, (8) macrófago, (9) linfocito (X63). **(d)** Grupo no colítico donde se observa la lámina propia intacta (10) y las criptas con células caliciformes repletas de moco (11) (x40).



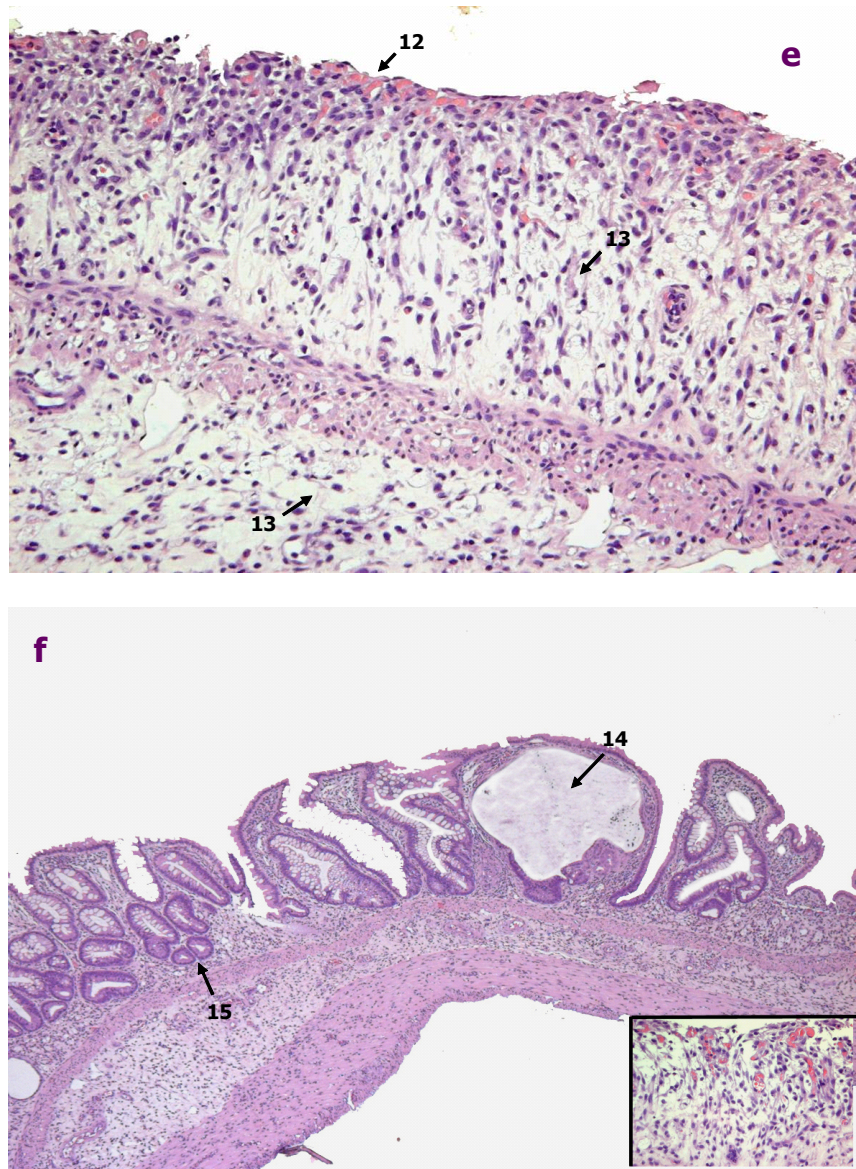
la recuperación fue más avanzada, comenzaron a apreciarse células caliciformes y criptas. En algunas ocasiones se observó dilatación de estas criptas neoformadas y edema en la lámina propia mostrando restos de inflamación de tipo crónico (Figura 16f).

La submucosa es la capa vascularizada del intestino formada por tejido conjuntivo, con presencia de fibroblastos, y escasas células linfoides y macrófagos (Figura 16g), y en la que se observa con gran frecuencia la presencia de placas de Peyer o nódulos linfoides formados por linfocitos T y B (Figura 16a). Sin embargo, en la submucosa de los animales colíticos se observó una gran cantidad de células inflamatorias, siendo mucho más numerosas en aquellas áreas en las que existió ulceración de la mucosa. Además presentó edema y un aumento en el número de vasos, que son los primeros signos que aparecen en la inflamación (Figura 16h).

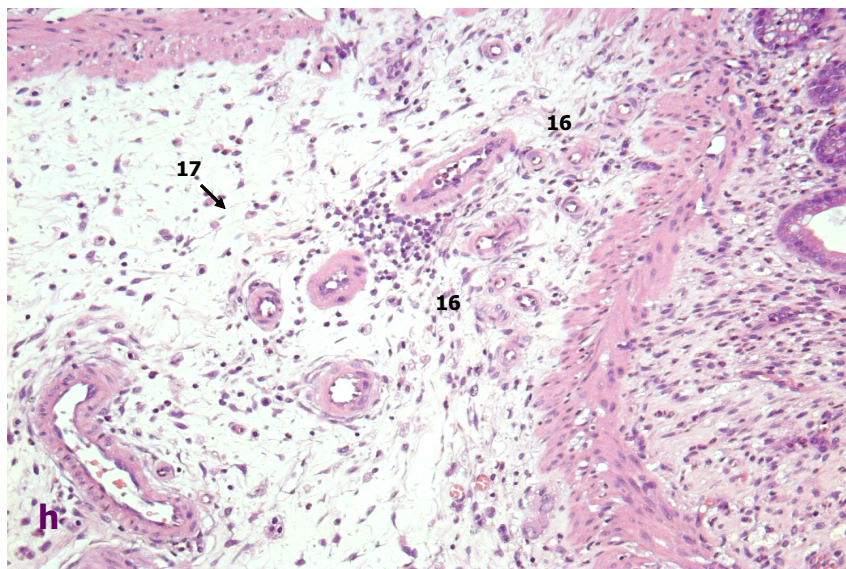
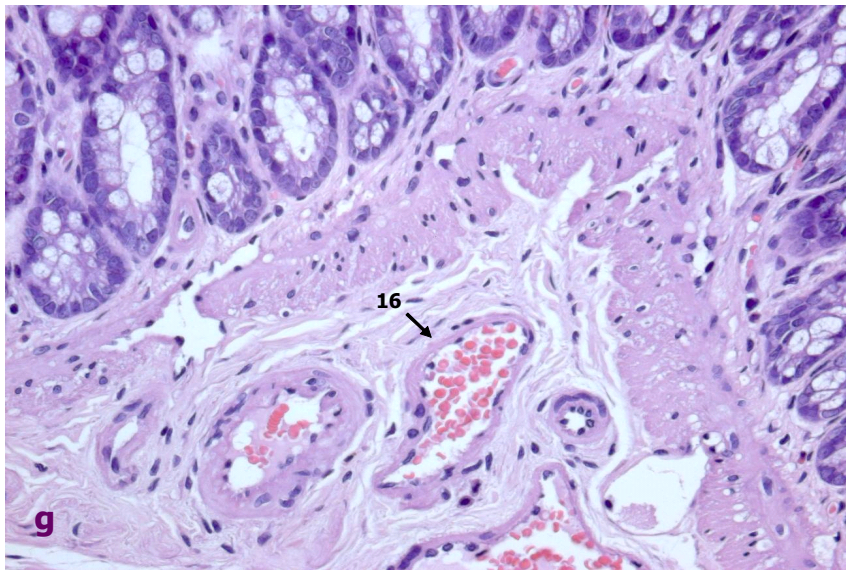
Finalmente, en la capa muscular lisa, tanto en la longitudinal como en la transversal, se observó con frecuencia edema con un infiltrado de polimorfonucleares en las zonas de inflamación aguda, o linfocitos y macrófagos en las crónicas. En algunas ocasiones el infiltrado se extendió hasta la capa serosa (Figura 16b).

### **1.3. Estudios bioquímicos.**

Desde un punto de vista bioquímico, el daño inflamatorio inducido por el DSS se caracterizó por un incremento de más de diez veces de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en relación a los animales no colíticos (Tabla 6). Esta actividad MPO constituye un buen marcador de la infiltración granulocítica y por tanto del proceso inflamatorio (Krawisz *et al.*, 1984; Morris *et al.*, 1989; Sanchez de Medina *et al.*, 1996). Por otra parte, los niveles de fosfatasa alcalina (AP) se vieron incrementados en un 100% (Tabla 6). Nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente que esta enzima se encuentra elevada en diversos modelos de inflamación intestinal (Sanchez de Medina *et al.*, 2004), lo cual ratifica su importancia en la EII en humanos (Gibson *et al.*, 1995). Además, el proceso colítico provocó una disminución en un 16% de los niveles de glutatión total (Tabla 6), uno de los



**Figura 16 continuación.** Cortes histológicos de colon teñidos con hematoxilina y eosina. **(e)** Grupo colítico con recuperación tisular (13) en la mucosa y submucosa presentando colágeno y neovasos (12) (X20). **(f)** Grupo colítico donde se observa dilatación (14) e hiperplasia de las criptas (15) (x10, detalle X40).



**Figura 16 continuación.** Cortes histológicos de la submucosa colónica teñidos con hematoxilina y eosina. **(g)** Grupo no colítico con una vascularización normal (16) (X40). **(h)** Grupo colítico donde se observa un gran aumento en el número de vasos (16) y edema (17) (X20).

principales compuestos implicados en la respuesta antioxidante fisiológica (Grisham *et al.*, 1990). Este descenso se produce como consecuencia del estrés oxidativo inducido por el proceso inflamatorio en el modelo del DSS (Stucchi *et al.*, 2000).

**Tabla 6.** Efecto de la administración del DSS en la actividad mieloperoxidasa (MPO), actividad fosfatasa alcalina (AP) y contenido en glutatión (GSH) en el modelo de colitis en ratas.

<b>Grupo</b>	<b>MPO</b> (U/g tejido)	<b>AP</b> (mU/mg proteína)	<b>GSH</b> (nmol/g tejido)
<b>No colítico</b>	12,0±3,7	5,91±0,65	1930±37
<b>DSS control</b>	131,3±9,1**	14,97±1,60**	1622±58**

Los valores están expresados como la media aritmética ± error estándar de la media, n=30. \*\*p<0,01 vs. grupo no colítico.

Los eicosanoides son un grupo de mediadores de una gran importancia biológica (Calder, 2003) derivados principalmente del metabolismo del ácido araquidónico. Este ácido, tras ser liberado por la acción de la PLA<sub>2</sub> a partir de los fosfolípidos de las membranas celulares, es sustrato de diversas enzimas, entre las cuales destacan las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas. Dado el interés de los eicosanoides en la EII (Sharon y Stenson, 1984) valoramos la importancia de estas dos vías en el modelo de colitis inducida por DSS. Para ello, se determinaron los niveles colónicos de LTB<sub>4</sub> así como la expresión de la COX-2, enzima que es indetectable en ausencia de inflamación, pero que es inducida en macrófagos, fibroblastos, y células vasculares, endoteliales y músculo liso por varias citocinas, endotoxinas, factores de crecimiento o promotores de tumores (Smith y Langenbach, 2001).

El LTB<sub>4</sub> presenta actividad quimiotáctica y activadora de los neutrófilos (Kubes *et al.*, 1991), atribuyéndole un importante papel en la patogénesis de la EII. De hecho, se ha descrito su elevada producción en pacientes con EC o CU (Sharon y Stenson, 1984), así como en modelos de inflamación intestinal (Wallace *et al.*, 1989; Sanchez de Medina *et al.*, 1996; Galvez *et al.*, 2000a; Galvez *et al.*, 2000b). La producción colónica de este mediador

se vio incrementada 2,5 veces en los animales colíticos con respecto a los no colíticos (Tabla 7), lo cual podría justificar la marcada infiltración leucocitaria que se manifestó en el colon inflamado, observada histológica y bioquímicamente. Igualmente, se ha demostrado que este eicosanoide ejerce acciones prosecretoras en el intestino, que contribuirían a la aparición de diarrea (Barrett, 1997).

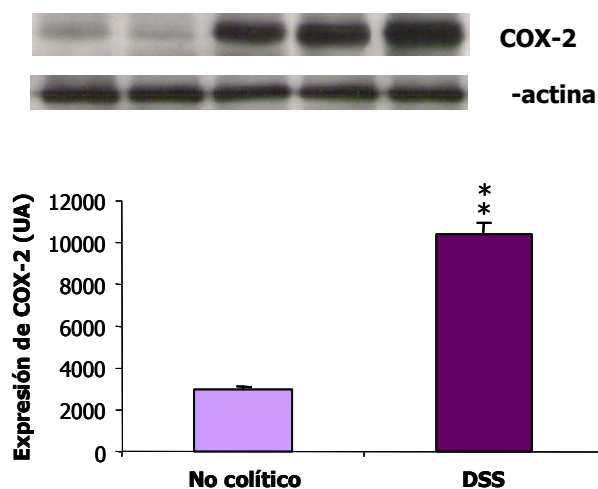
**Tabla 7.** Efecto de la administración del DSS en la síntesis de LTB<sub>4</sub>, TNF , IL-1β en el modelo de colitis en ratas.

Grupo	LTB <sub>4</sub> (ng g <sup>-1</sup> tejido)	TNF (pg g <sup>-1</sup> tejido)	IL-1β (pg g <sup>-1</sup> tejido)
No colítico	2,77±0,27	170,7±30,8	497,4±63,1
DSS control	6,97±0.73**	801,2±81,5**	1337,0±230,5**

Los valores están expresados como la media aritmética ± error estándar de la media, n=30. \*\*p<0,01 vs. grupo no colítico.

Por otra parte, el papel de la COX-2 en EII ha sido evaluado en varios estudios mostrando que se encuentra inducida en el epitelio intestinal durante la inflamación intestinal activa (Singer *et al.*, 1998). En concordancia con estos estudios, el proceso inflamatorio como consecuencia de la administración del DSS a las ratas, provocó un aumento de 3,5 veces de la expresión de la COX-2 en relación con las ratas no colíticas (Figura 17), establecida tras la determinación densitométrica por Western blot.

El proceso inflamatorio colónico también estuvo asociado con un aumento en los niveles de TNF e IL-1β en el colon. Ambas son citocinas proinflamatorias que juegan un papel clave en este tipo de procesos intestinales (Ardizzone y Porro, 2002); su síntesis y liberación se encuentran aumentadas en diferentes tipos celulares residentes en la mucosa inflamada, especialmente en macrófagos (Woywodt *et al.*, 1999). Así, se ha descrito un incremento en la producción de ambos mediadores tanto en modelos experimentales de inflamación (Strober *et al.*, 1998; van Dijk *et al.*, 1995; Galvez *et al.*, 2000a) como en humanos con EII (Reimund *et al.*, 1996; Mahida *et al.*, 1989; MacDonald *et al.*, 1990).



**Figura 17.** Medida de la expresión de COX-2 por Western blot de muestras colónicas de ratas no colíticas y tratadas con DSS ( $p < 0,01$ ).

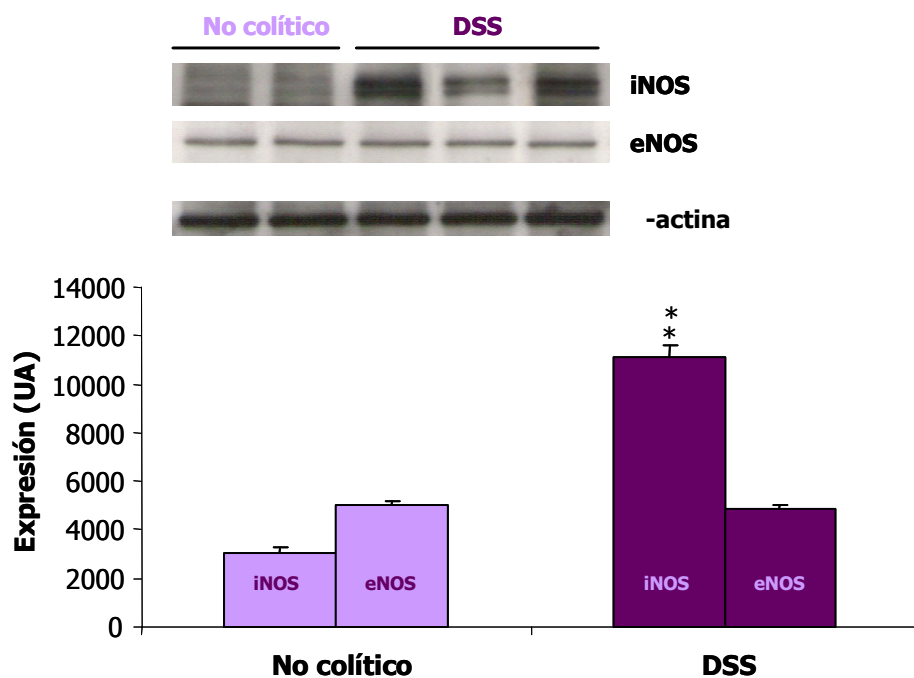
Confirmándose las observaciones anteriores, la producción colónica de TNF e IL-1 $\beta$ , se vio aumentada en cuatro y dos veces respectivamente en los animales colíticos en relación a los que no fueron expuestos al DSS (Tabla 7).

En los últimos años, el NO ha sido considerado como un mediador proinflamatorio importante, jugando un papel clave en la patogénesis de la EII (Salas *et al.*, 2002). De acuerdo con estudios previos (Obermeier *et al.*, 1999), la administración de DSS a las ratas indujo un incremento en la actividad NOS colónica ( $97,8 \pm 6,1$  vs.  $53,5 \pm 8,9$  pmol citrulina/mg proteína,  $p < 0,01$ ). Para determinar la isoforma de NOS responsable de dicha actividad, se estudió la influencia de un inhibidor selectivo de la iNOS, así como la expresión colónica de la isoforma inducible (iNOS) y la constitutiva (eNOS).

Cuando los homogenados colónicos de los animales inflamados fueron incubados en presencia de aminoguanidina ( $10^{-4}$  M), inhibidor selectivo de la iNOS (Griffiths *et al.*,

1993), se observó una disminución significativa en su actividad enzimática ( $97,8 \pm 6,1$  vs  $58,3 \pm 8,9$  pmol citrulina/mg proteína;  $p < 0,05$ ), llegando incluso a presentar valores similares a los de las ratas no colíticas ( $53,5 \pm 8,9$  pmol citrulina/mg proteína;  $p > 0,05$ ).

Los estudios de expresión de la NOS realizados por Western blot apoyaron este resultado, ya que la expresión colónica de la isoforma iNOS se encontró aumentada más de tres veces (Figura 18), mientras que no se observó ninguna modificación en los niveles de eNOS en el colon como consecuencia del proceso inflamatorio (Figura 18).



**Figura 18.** Medida de la expresión de iNOS por Western blot de muestras colónicas de ratas no colíticas y tratadas con DSS ( $p < 0,01$ ).

## **2. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON ACEITE DE OLIVA Y DE PESCADO EN LA COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR DSS EN RATAS.**

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales establecen una relación entre la composición en ácidos grasos de la dieta y muchas enfermedades inmunológicas e inflamatorias (Calder, 2003; Yaqoob, 2004).

Durante años, organismos internacionales han promovido la sustitución de las grasas saturadas por alimentos vegetales ricos en AGPI, de forma que, actualmente, las dietas occidentales se caracterizan por ser excesivamente abundantes en AGPI  $\omega 6$ . Sin embargo, este exceso puede ser la causa del incremento en la incidencia de enfermedades inflamatorias, dado el papel proinflamatorio de estos ácidos grasos (Simopoulos, 2002). La sustitución de estos AGPI  $\omega 6$  por ácidos grasos monoinsaturados o AGPI  $\omega 3$ , podría constituir una buena estrategia. Así, diversos estudios han demostrado una notable actividad antiinflamatoria de los AGPI  $\omega 3$  (Yaqoob, 2004), lo cual compensaría los efectos perjudiciales de un exceso en el consumo de AGPI  $\omega 6$ . No obstante, hay que destacar que lo importante no es la cantidad absoluta de AGPI  $\omega 6$  o de  $\omega 3$  ingeridos, sino una adecuada proporción entre ellos (Simopoulos, 2002).

Para estudiar la repercusión de las diferentes relaciones entre los ácidos grasos insaturados  $\omega 6$ ,  $\omega 9$  y  $\omega 3$ , diseñamos tres dietas con el mismo contenido en grasa saturada, modificando estas proporciones:

- dieta C: con una relación  $\omega 6/\omega 9$  y  $\omega 6/\omega 3$  alta.
- dieta O: con una proporción  $\omega 6/\omega 9$  baja, gracias a la incorporación de aceite de oliva.
- dieta : con una relación  $\omega 6/\omega 3$  baja, como consecuencia de la adición de aceite de pescado, manteniendo la proporción  $\omega 6/\omega 9$  de la dieta O.



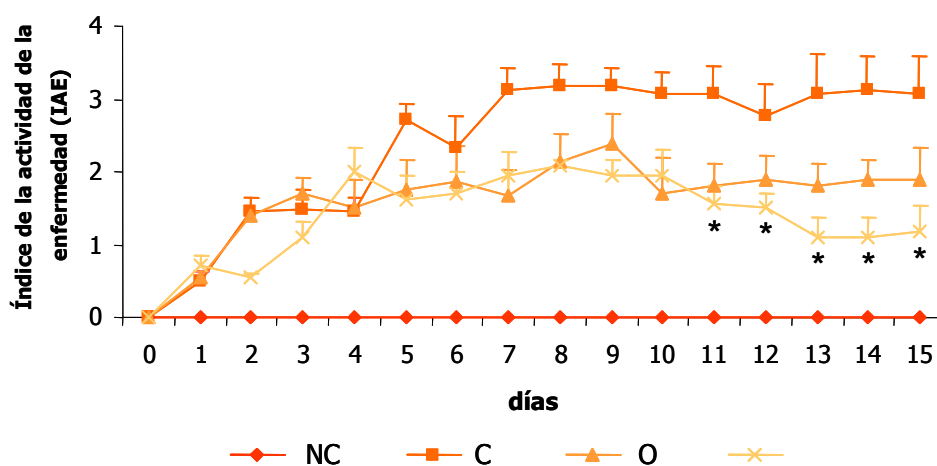
Estas dietas fueron ensayadas en la inflamación intestinal, evaluando su potencial como agentes antiinflamatorios en el modelo de colitis inducida por DSS en ratas. Posteriormente, se comprobó la incorporación en los tejidos de los distintos ácidos grasos, analizando las proporciones entre ellos y la posible relación con su efecto antiinflamatorio.

## 2.1. Valoración de la actividad antiinflamatoria intestinal.

El consumo de las dietas O y se tradujo en un efecto antiinflamatorio intestinal en la colitis inducida por DSS en ratas. Esta actividad fue mucho más patente en la dieta  $\omega$ , donde la relación entre AGPI  $\omega6/\omega3$  era menor que en la dieta O.

### 2.1.1. Efecto de la dieta enriquecida en aceite de oliva.

Durante el curso del proceso colítico, el IAE de los animales alimentados con dieta O mostró una tendencia a disminuir, aunque no llegó a alcanzar valores significativos ( $p=0,15$ ) (Figura 19).



**Figura 19.** Evolución del índice de la actividad de la enfermedad en ratas no colíticas, ratas con colitis inducida por DSS y alimentadas con dieta estándar C, dieta O y dieta basado en el criterio mostrado en la Tabla 4.  $n=10$ , \* $p<0,05$  vs. ratas colíticas alimentadas con dieta C. Todos los grupos colíticos mostraron diferencias significativas con respecto al grupo no colítico ( $p<0,01$ ).

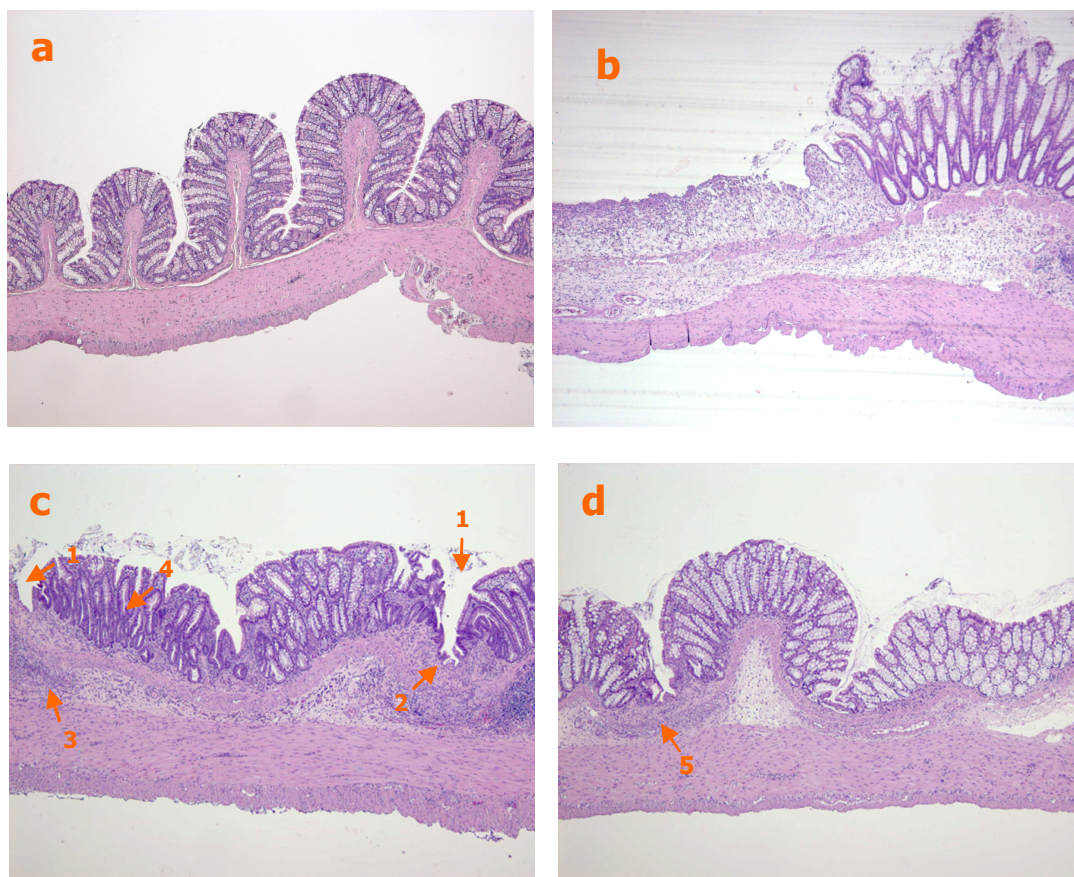
Tras el sacrificio de los animales, el efecto antiinflamatorio de la dieta O se demostró macroscópicamente por una reducción significativa de un 46% en la relación peso/longitud colónica (Tabla 8) con respecto a las ratas colíticas alimentadas con la dieta C.

**Tabla 8.** Efecto de la administración de las dietas O y  $\omega$  en la relación peso/longitud y valoración microscópica colónicas en el modelo de colitis del DSS en ratas

Grupo	p/l (mg/cm)	Valoración microscópica
NC	64,9±1,6	0,0±0,0
C	100,6±6,0 <sup>##</sup>	15,1±1,1 <sup>##</sup>
O	84,2±5,7 <sup>*</sup>	10,3±5,7
	81,7±3,6 <sup>*</sup>	6,7±1,3 <sup>*†</sup>

Los valores están expresados como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media, n=10. <sup>##</sup>p<0,01 vs. grupo NC; <sup>\*</sup>p<0,05 vs. grupo C; <sup>†</sup>p<0,05 vs. grupo O

El examen histológico indicó una recuperación del daño colónico tras el consumo de dieta O (Figura 20), a pesar de que no hubo diferencias significativas en el valor de daño microscópico al ser comparado con los animales colíticos que recibieron dieta C (Tabla 8). La mayoría de los animales presentaron un infiltrado inflamatorio de la lámina propia focal, constituido principalmente por linfocitos y macrófagos, sin ulceración del epitelio de la mucosa. En los casos en los que se observó ulceración, el infiltrado también incluyó polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. A pesar de que se mantenía una depleción de las células caliciformes, las criptas mostraron una hiperplasia de las células basales, lo que indicaba un inicio de recuperación de la inflamación; también se observaron dilataciones de las criptas. En la submucosa, el infiltrado inflamatorio se localizó únicamente en aquellas

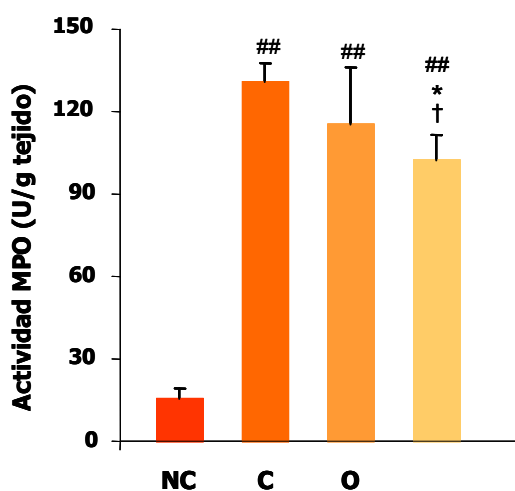


**Figura 20.** Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de la mucosa colónica de ratas no colíticas alimentadas con dieta C, y colíticas por inducción con DSS que recibieron dieta C, O y **(a)** Grupo no colítico (NC) mostrando una histología normal del colon (X5). **(b)** Grupo colítico alimentado con dieta C (C) en la que se apreció una extensa ulceración de la mucosa con un infiltrado inflamatorio celular severo en la lámina propia y la submucosa (X5). **(c)** Grupo colítico alimentado con dieta O (O) donde se distinguió ulceraciones de tipo focal (1), infiltrados de células inflamatorias focales en la lámina propia (2) y la submucosa (3) e hiperplasia de las criptas (4). **(d)** Grupo colítico alimentado con dieta  $\omega$  ( ) en el que se observó una recuperación total del proceso inflamatorio con ausencia de ulceración de la mucosa intestinal; sólo se observó infiltrados focales en la lámina propia y la submucosa (5) (X5).

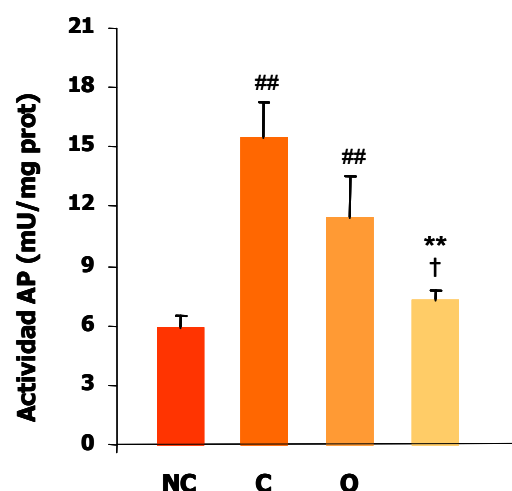
zonas en las que las criptas no habían recuperado aún la morfología previa al daño. La mejoría inducida por la dieta O también se caracterizó por una ausencia de edema y de aumento de la vascularización, a diferencia del grupo colítico alimentado con dieta C. En cuanto a la afectación de la capa muscular, ésta sólo se observó de forma focal y muy leve

en los casos en los que también hubo ulceración de la mucosa como una extensión del proceso de la superficie intestinal.

Desde el punto de vista bioquímico, las actividades enzimáticas MPO (Figura 21) y AP (Figura 22) tendieron a disminuir, aunque sin mostrar diferencias significativas con el grupo colítico que recibió dieta C.



**Figura 21.** Efecto de las dietas O y  $\omega$  en la actividad mieloperoxidasa colónica en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, ## p<0,01 vs. grupo NC; \* p<0,05 vs. grupo C; † p<0,05 vs. grupo O.



**Figura 22.** Efecto de las dietas O y  $\omega$  en la actividad fosfatasa alcalina colónica en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, ## p<0,01 vs. grupo NC; \*\* p<0,01 vs. grupo C; † p<0,05 vs. grupo O.

Cuando se evaluó el efecto de la dieta O sobre el estrés oxidativo originado por la inflamación intestinal, se observó una normalización de los niveles de GSH (Figura 23). Esta restauración junto con la disminución significativa en la expresión de iNOS en el colon (Figura 24) podría explicar la actividad antiinflamatoria presentada por esta dieta.

Finalmente, la dieta O no fue capaz de normalizar los niveles de los mediadores proinflamatorios TNF (Figura 25) y LTB<sub>4</sub> (Figura 26), modificados como consecuencia del proceso colítico.

### **2.1.2. Efecto de la dieta enriquecida en aceite de pescado.**

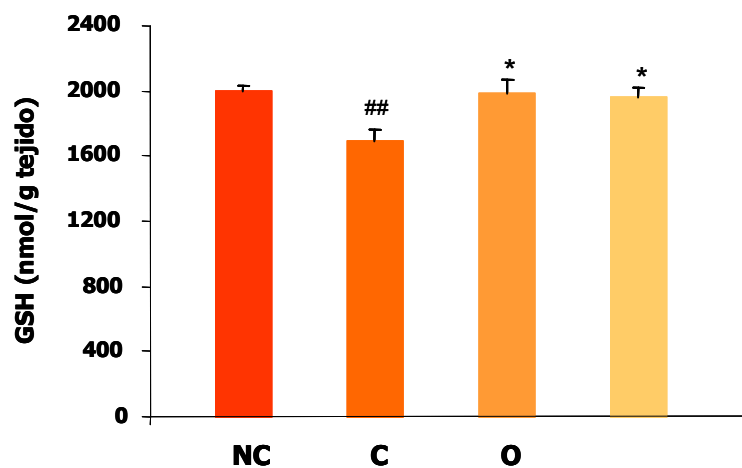
El efecto beneficioso de la dieta enriquecida en AGPI  $\omega$ 3 se puso de manifiesto durante el curso del proceso inflamatorio. Así, se observó un descenso significativo del IAE desde el día 11 al 15 (Figura 19), como consecuencia de una disminución de un 50% en la incidencia de diarrea y una reducción de la presencia de sangre en las heces, así como a una menor pérdida de peso en las ratas tratadas.

Esta actividad antiinflamatoria se confirmó microscópicamente por una reducción significativa de un 53% en la relación peso/longitud colónica con respecto a las ratas colíticas alimentadas con la dieta C, sin mostrar diferencias con la dieta O (Tabla 8).

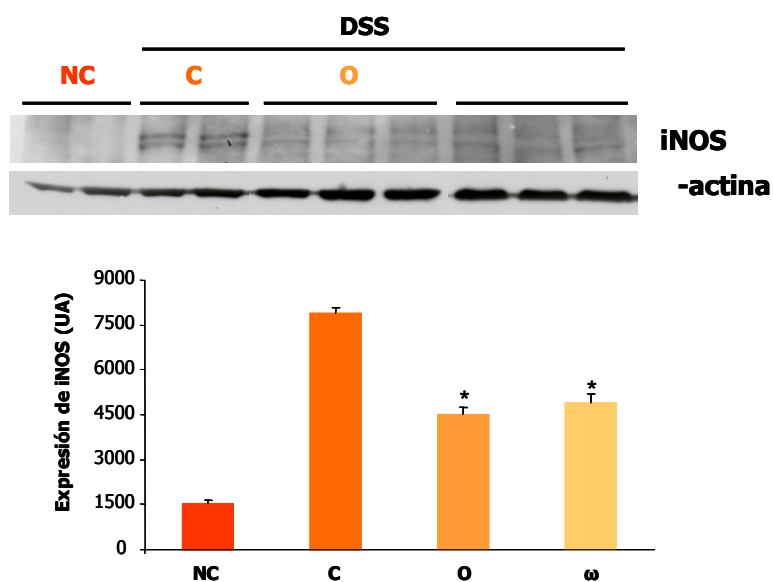
El análisis histológico mostró que el consumo de la dieta enriquecida en aceite de pescado indujo una recuperación muy evidente del daño causado por el DSS, presentando un valor de daño microscópico menor al de las otras dos dietas (Tabla 8). Únicamente se observó un infiltrado de células inflamatorias de carácter focal en la lámina propia acompañado en ocasiones de una ulceración también focal de la mucosa. El epitelio de las criptas se encontró restituido, con un tamaño de éstas y una presencia de células caliciformes similares a los animales no colíticos. La submucosa sólo se vio afectada en aquellos casos en los que apareció ulceración, estando restringida a la zona afectada por esta pérdida de epitelio. En ningún caso se vio dañada la capa muscular ni la serosa.

La disminución del infiltrado leucocitario establecida histológicamente, también se puso de manifiesto por una reducción de un 25% de la actividad MPO (Figura 21). Asimismo, el consumo de dieta  $\omega$  por las ratas colíticas disminuyó significativamente a la mitad la actividad AP colónica (Figura 22). Además, estos resultados nos muestran que la dieta con una relación de AGPI  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 baja, mejora estos dos parámetros incluso frente a la dieta enriquecida en aceite de oliva (Figura 21 y 22).

Tras valorar el estado oxidativo, se observó cómo la dieta  $\omega$  logró normalizar los valores de GSH colónicos sin presentar diferencias con el grupo no colítico, mostrando un comportamiento similar al de la dieta O (Figura 23).



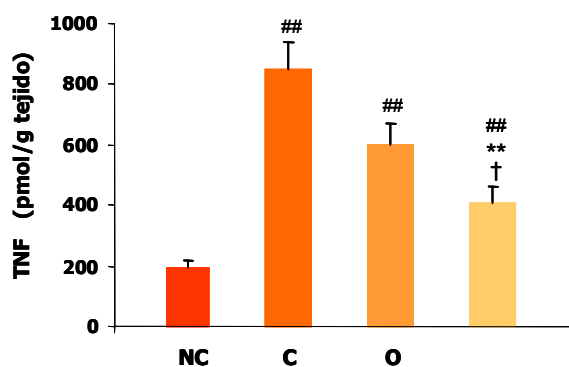
**Figura 23.** Efecto de las dietas O y  $\omega$  en el contenido colónico de glutatión total en el modelo de colitis del DSS en ratas.  $n=10$ , ##  $p<0,01$  vs. grupo NC; \*  $p<0,05$  vs. grupo C.



**Figura 24.** Efecto de las dietas O y  $\omega$  en la expresión colónica de iNOS determinada por Western blot, en el modelo de colitis del DSS en ratas.  $n=10$ , \*  $p<0,05$  vs. grupo C. Todos los grupos colíticos presentaron diferencias significativas vs. grupoNC ( $p<0,05$ ).

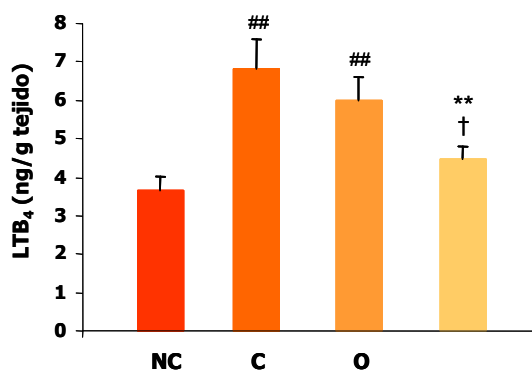
La dieta enriquecida en AGPI  $\omega$ 3 redujo la expresión colónica de iNOS, que se encontraba incrementada como consecuencia del proceso inflamatorio inducido por DSS en el grupo colítico alimentado con la dieta C (Figura 24) ( $4900 \pm 302$  vs.  $7868 \pm 302$  unidades densitométricas arbitrarias;  $p < 0,05$ ).

La valoración de mediadores proinflamatorios como TNF $\alpha$  y LTB $_4$  estableció una disminución de sus niveles colónicos de un 67 y 74% respectivamente en relación a la dieta C (Figuras 25 y 26), indicando una mejora de estos parámetros incluso con respecto a la dieta O.



**Figura 25.** Efecto de las dietas O y  $\omega$  en la síntesis colónica de TNF en el modelo de colitis del DSS en ratas.  $n=10$  ## $p < 0,01$  vs. grupo NC; \*\* $p < 0,01$  vs. grupo C; † $p < 0,05$  vs. grupo O.

**Figura 26.** Efecto de las dietas O y  $\omega$  en la síntesis colónica de LTB $_4$  en el modelo de colitis del DSS en ratas.  $n=10$ , ## $p < 0,01$  vs. grupo NC; \*\* $p < 0,01$  vs. grupo C; † $p < 0,05$  vs. grupo O.



## 2.2. Perfil lipídico tisular.

Los animales no mostraron diferencias significativas en la ingesta diaria de comida, con una media de consumo de  $12,7 \pm 0,4$  g/día durante las dos semanas previas al proceso colítico.

Tras la inducción de la inflamación, los animales colíticos mostraron un descenso significativo en la cantidad de comida ingerida con respecto a los animales no colíticos ( $p < 0,01$ ), aunque éste fue similar entre los distintos grupos expuestos al DSS.

Una vez sacrificados los animales, se determinó el perfil lipídico en distintos tejidos (plasma, hígado y colon), confirmando su modificación con respecto a la dieta C como consecuencia del consumo de las dietas basadas en aceite de oliva, conteniendo o no AGPI  $\omega 3$  (Tablas 9, 10 y 11).

Estas diferencias en la composición de ácidos grasos de las muestras de plasma, hígado y colon fueron análogas a las establecidas inicialmente en las dietas. Esto nos indicó la incorporación *in vivo* de los lípidos de la dieta en los distintos compartimentos del organismo de los animales. Las modificaciones más relevantes fueron (Tabla 9, 10 y 11):

- una reducción en el contenido de ácido linoleico en todos los tejidos analizados de las ratas alimentadas con las dietas O y  $\omega$  en comparación con las ratas colíticas alimentadas con dieta C, como consecuencia de su sustitución por ácido oleico.
- una modificación de la relación  $\omega 6/\omega 9$  en los órganos de los animales que recibieron ambas dietas basadas en aceite de oliva; ésta se debió a la reducción en el ácido linoleico, que provocó una disminución de las cantidades totales de AGPI y especialmente en el grupo de AGPI  $\omega 6$ , y al aumento en ácido oleico.
- un incremento en EPA y DHA en los tejidos de las ratas que consumieron dieta  $\omega$  con respecto a las ratas alimentadas con las dietas C y O.



- un aumento en los AGPI  $\omega$ 3 totales y una variación de la relación  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 debido a este incremento en EPA y DHA, aunque sin compensar la reducción en los AGPI totales.

**Tabla 9.** Contenido en ácidos grasos en plasma de ratas con colitis inducida por DSS alimentadas con las dietas C, O y  $\omega$ .

Ácidos grasos	No colítico	Dieta C	Dieta O	Dieta $\omega$
Palmítico 16:0	23,6±0,4	21,1±0,8	18,8±0,8	20,3±0,9
Esteárico 18:0	19,2±1,2	16,3±1,1	18,5±0,8	19,8±1,4
Oleico 18:1 ( $\omega$ 9)	10,8±1,3	10,6±0,6	22,2±2,5*	19,1±1,4*
Linoleico 18:2 ( $\omega$ 6)	22,2±1,0	23,9±2,0	5,4±1,3*	7,4±0,5*
Linolénico 18:3 ( $\omega$ 3)	n.d.	0,9±0,7	1,0±0,6	0,2±0,2
Araquidónico 20:4 ( $\omega$ 6)	13,7±0,8	18,0±2,1	21,4±1,9	20,3±2,7
EPA 20:5 ( $\omega$ 3)	n.d.	0,2±0,1	0,3±0,1	1,2±0,2*,†
DHA 22:6 ( $\omega$ 3)	3,3±0,2	3,2±0,2	2,4±0,1	4,7±0,2*,†
Saturados totales	44,7±1,1	38,4±1,9	38,5±0,7	41,0±2,3
Monoinsaturados totales	13,3±0,2	13,7±0,9	27,7±3,3*	24,0±2,0*
AGPI totales	39,2±0,1	46,4±2,6	30,5±0,8*	34,2±3,0*
$\omega$ 3 totales	3,3±0,2	4,3±0,7	3,7±0,6	6,2±0,1*,†
$\omega$ 6 totales	35,9±0,2	42,1±2,7	26,8±0,9*	28,0±3,0*
$\omega$ 9 totales	10,8±1,3	11,3±0,8	22,7±2,3*	19,5±1,5*
Relación $\omega$ 6/ $\omega$ 9	3,6±0,4	3,9±0,4	1,3±0,1*	1,6±0,2*
Relación $\omega$ 6/ $\omega$ 3	11,2±0,9	11,4±1,3	8,8±1,2	4,5±0,5*,†

Los valores están representados como la media aritmética del % en relación a ácidos grasos totales  $\pm$  error estándar de la media,  $n \geq 8$ . \* $p < 0,05$  vs. grupo C; † $p < 0,05$  vs. grupo O.

**Tabla 10.** Contenido en ácidos grasos en hígado de ratas con colitis inducida por DSS alimentadas con las dietas C, O y  $\omega$ .

Ácidos grasos	No colítico	Dieta C	Dieta O	Dieta $\omega$
Palmítico 16:0	18,9±0,3	19,2±0,5	18,1±0,2	19,5±0,8
Esteárico 18:0	23,4±0,1	21,8±0,5	23,4±0,6	22,4±0,8
Oleico 18:1 ( $\omega$ 9)	7,8±2,1	7,4±0,8	14,1±0,9*	13,5±2,2*
Linoleico 18:2 ( $\omega$ 6)	10,7±0,6	12,8±0,9	5,0±0,2*	5,6±0,6*
Linolénico 18:3 ( $\omega$ 3)	0,1±0,1	0,1±0,1	n.d.	n.d.
Araquidónico 20:4 ( $\omega$ 6)	21,8±0,8	21,4±1,1	22,9±0,5	20,7±1,4
EPA 20:5 ( $\omega$ 3)	0,4±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1	0,6±0,2*,†
DHA 22:6 ( 3)	7,3±0,1	7,0±0,5	6,6±0,2	9,3±0,8*,†
Saturados totales	44,2±0,5	42,0±1,0	41,9±0,5	42,7±0,7
Monoinsaturados totales	12,9±1,9	12,0±1,4	19,8±0,7*	19,0±2,7*
AGPI totales	42,5±1,6	42,9±1,7	35,4±0,5*	37,1±2,4*
$\omega$ 3 totales	8,9±0,1	8,2±0,6	7,9±0,2	11,1±0,8*,†
$\omega$ 6 totales	33,3±1,4	34,6±1,4	28,5±0,5*	27,1±1,6*
$\omega$ 9 totales	7,8±2,1	7,7±1,1	14,1±0,9*	13,5±2,2*
Relación $\omega$ 6/ $\omega$ 9	6,5±1,4	5,0±0,7	2,1±0,2*	2,3±0,5*
Relación $\omega$ 6/ $\omega$ 3	3,7±0,1	4,4±0,4	4,1±0,1	2,7±0,1*,†

Los valores están representados como la media aritmética del % en relación a ácidos grasos totales  $\pm$  error estándar de la media,  $n \geq 8$ . \* $p < 0,05$  vs. grupo C; † $p < 0,05$  vs. grupo O.

**Tabla 11.** Contenido en ácidos grasos en colon de ratas con colitis inducida por DSS alimentadas con las dietas C, O y  $\omega$ .

Ácidos grasos	No colítico	Dieta C	Dieta O	Dieta $\omega$
Palmítico 16:0	22,1±0,7	22,5±0,5	21,8±0,5	22,6±0,6
Estearico 18:0	14,4±0,9	11,8±1,5	12,5±1,0	11,6±1,3
Oleico 18:1 ( $\omega$ 9)	17,1±1,3	19,5±1,6	27,4±1,4*	27,3±2,1*
Linoleico 18:2 ( $\omega$ 6)	14,7±0,8	18,5±1,9	10,0±1,0*	9,5±1,4*
Linolénico 18:3 ( $\omega$ 3)	0,9±0,1	0,7±0,2	0,8±0,3	0,6±0,1
Araquidónico 20:4 ( $\omega$ 6)	13,6±1,4	10,9±1,7	11,3±1,4	9,7±2,1
EPA 20:5 ( $\omega$ 3)	n.d.	0,2±0,1	0,1±0,0	0,4±0,0*,†
DHA 22:6 ( $\omega$ 3)	1,6±0,1	1,4±0,2	1,3±1,3	2,5±0,2*,†
Saturados totales	39,1±0,3	36,1±1,3	35,9±1,0	36,2±1,3
Monoinsaturados totales	24,7±1,7	27,0±1,9	35,7±1,6*	37,7±2,5*
AGPI totales	34,1±0,8	33,3±0,6	24,7±0,9*	24,0±1,6*
$\omega$ 3 totales	3,5±0,2	2,6±0,3	2,4±0,5	4,0±0,2*,†
$\omega$ 6 totales	29,8±0,8	30,3±0,5	22,0±0,8*	19,8±1,7*
$\omega$ 9 totales	17,1±1,3	19,5±1,6	28,0±1,4*	30,6±2,3*
Relación $\omega$ 6/ $\omega$ 9	1,8±0,2	1,6±0,2	0,8±0,1*	0,7±0,1*
Relación $\omega$ 6/ $\omega$ 3	8,8±0,5	12,8±1,7	11,7±2,2	5,2±0,6*,†

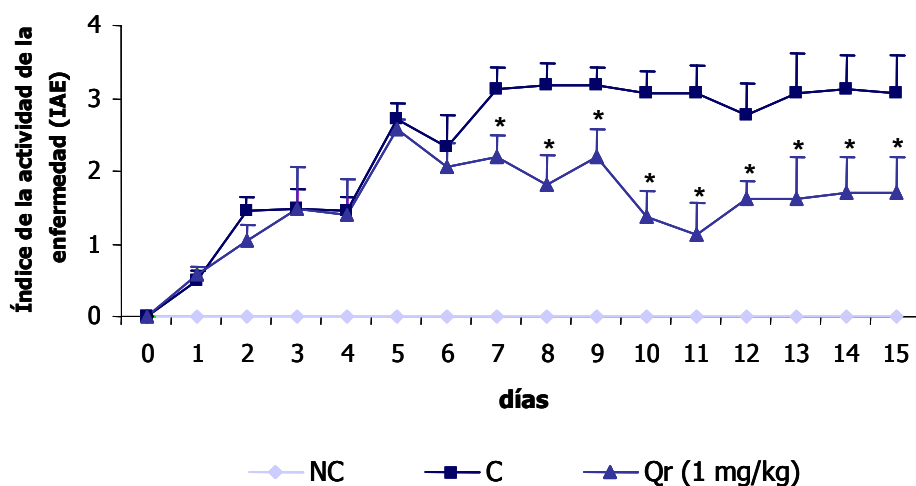
Los valores están representados como la media aritmética del % en relación a ácidos grasos totales  $\pm$  error estándar de la media,  $n \geq 8$ . \* $p < 0,05$  vs. grupo DSS control alimentado con dieta C; † $p < 0,05$  vs. grupo O.

### 3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL FLAVONOIDE QUERCITRINA EN LA COLITIS INDUCIDA POR DSS EN RATAS.

Estudios previos han demostrado la acción preventiva como antiinflamatorio intestinal de la quercitrina en distintos modelos de colitis experimental (Sanchez de Medina *et al.*, 2002b; Camuesco *et al.*, 2004) a las dosis de 1 y 5 mg/kg. En este estudio se quiso

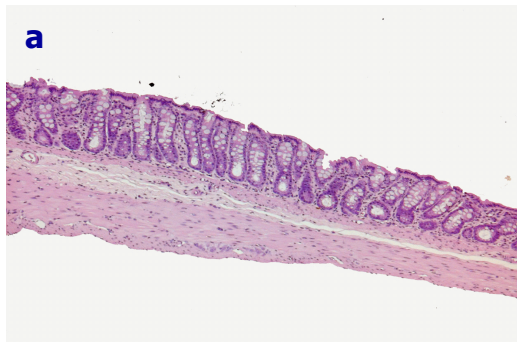
analizar el posible efecto beneficioso de la quercitrina una vez que el proceso inflamatorio se encuentra establecido. Para ello, el flavonoide fue administrado a las ratas oralmente a la dosis de 1 mg/kg a partir del sexto día de la inducción de la colitis, evaluando así la actividad del flavonoide en la colitis instaurada.

Las propiedades antiinflamatorias intestinales presentadas por la quercitrina se pusieron de manifiesto por una reducción significativa en los valores del IAE a partir del segundo día de su administración en comparación con el grupo colítico no tratado (Figura 27). Esto se debió tanto a una disminución de un 70% en la incidencia de diarrea como a una reducción de sangre en las heces. Tras el examen macroscópico de los segmentos colónicos no se observaron diferencias significativas en la relación peso/longitud entre ambos grupos colíticos (101,2±5,6 mg/cm en el grupo no tratado vs. 95,6±4,9 mg/cm en el grupo tratado con quercitrina;  $p=0,5$ ).



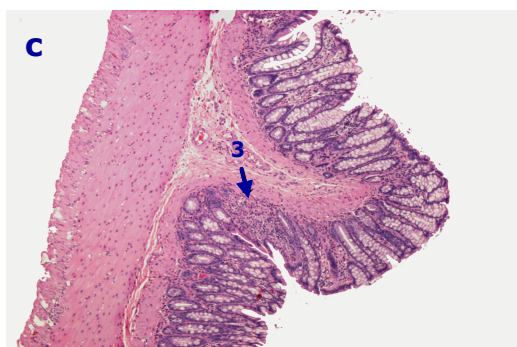
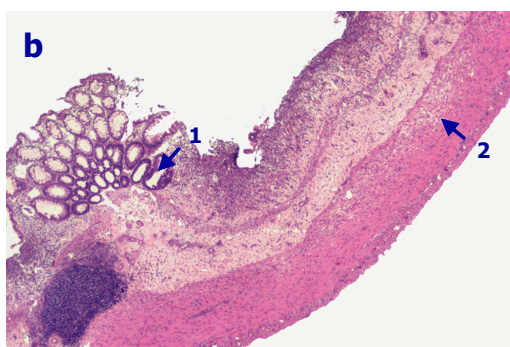
**Figura 27.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la evolución del índice de la actividad de la enfermedad en el modelo de colitis inducida por DSS en ratas basado en el criterio mostrado en la Tabla 4.  $n=10$ , \* $p<0,05$ , vs. grupo colítico control (C). Todos los grupos colíticos mostraron diferencias significativas con respecto al grupo no colítico (NC) ( $p<0,01$ ).

Sin embargo, el análisis histológico mostró que en los animales tratados con quercitrina, la mucosa aparece regenerada (Figura 28). En la mayoría de las muestras estudiadas, no se observó ulceración y las criptas recuperaron su morfología, con la presencia de las células basales y las células caliciformes. En general, no se encontró



(a) Grupo no colítico mostrando una histología normal del colon (x5).

(b) Grupo control con colitis inducida con DSS en el que se aprecia una ulceración de la mucosa con dilatación e hiperplasia de las criptas (1), edema (2) y un importante infiltrado inflamatorio celular en la lámina propia y la submucosa (x5).

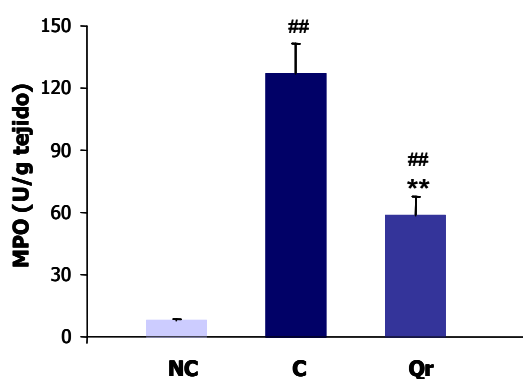


(c) Grupo colítico tratado con quercitrina en el que se observa una recuperación total del proceso inflamatorio con ausencia de ulceración de la mucosa intestinal; sólo mostró un pequeño foco de células inflamatorias (3) (x5).

**Figura 28.** Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de la mucosa colónica de ratas no colíticas y colíticas por inducción con DSS, mostrando los efectos del tratamiento con quercitrina (1 mg/kg) tras el daño colítico inicial con el agente inflamatorio.

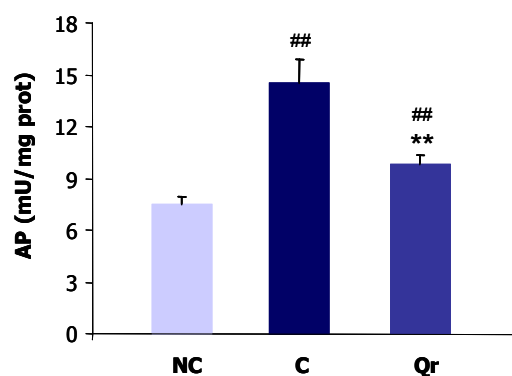
infiltrado inflamatorio en la lámina propia, y cuando éste se manifestó, fue de tipo focal y estuvo acompañado de hiperplasia de las células basales, lo cual es un signo de restitución de la integridad de la mucosa. Aquellas zonas que presentaron infiltrados focales en la lámina propia, también mostraron células inflamatorias en la submucosa, aunque sin alcanzar la capa muscular. En el resto de las capas no se apreció edema, ni aumento de la vascularización o de la celularidad, que sí se observaron en los animales colíticos no tratados con quercitrina.

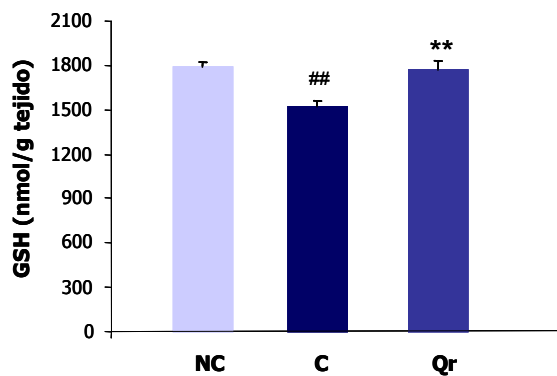
Desde el punto de vista bioquímico se confirmó el efecto antiinflamatorio del tratamiento con quercitrina al inhibir las actividades enzimáticas MPO y AP en un 60% y 68% respectivamente, en relación con el grupo colítico control (Figuras 29 y 30). De igual forma, el tratamiento con el flavonoide fue capaz de normalizar el contenido colónico en glutatión (Figura 31), indicativo de una restauración del estado oxidativo alterado como consecuencia del proceso inflamatorio.



**Figura 29.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la actividad mieloperoxidasa colónica en el modelo del DSS en ratas. n=10, ##p<0,01 vs. grupo NC; \*\*p<0,05 vs. grupo C.

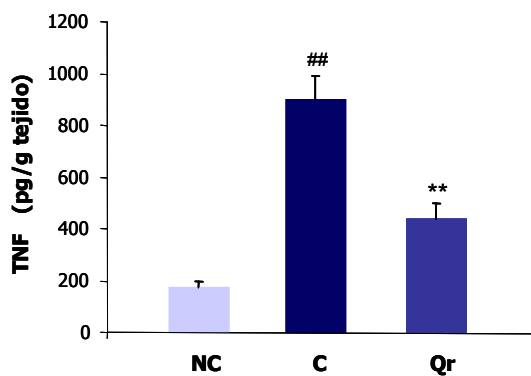
**Figura 30.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la actividad fosfatasa alcalina en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, ##p<0,01 vs. grupo NC; \*\*p<0,01 vs. grupo C.



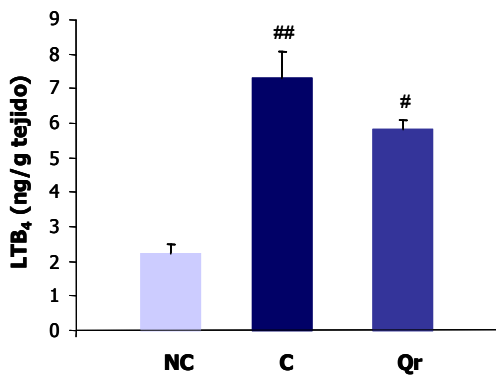


**Figura 31.** Efecto de la quercitrina (1 mg/mL) en el contenido colónico de glutation total en el modelo de colitis del DSS en ratas. <sup>##</sup>p<0,01 vs. grupo NC; <sup>\*\*</sup>p<0,01 vs. grupo C.

El tratamiento con el flavonoide redujo significativamente en un 64% los niveles colónicos de la citocina proinflamatoria TNF $\alpha$  en relación con el grupo colítico control (Figura 32); no obstante, no se apreciaron cambios en los valores de LTB $_4$  (Figura 33).



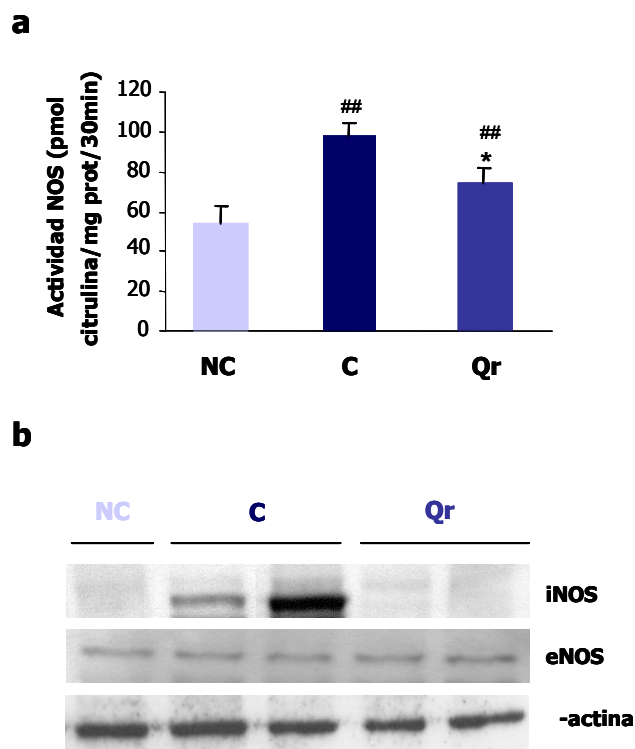
**Figura 32.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la síntesis colónica de TNF en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, <sup>##</sup>p<0,01 vs. grupo NC; <sup>\*\*</sup>p<0,01 vs. grupo C.



**Figura 33.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la síntesis colónica de LTB $_4$  en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, <sup>#</sup>p<0,05 vs. grupo NC <sup>##</sup>p<0,01 vs. grupo NC.

Además, la quercitrina fue capaz de inhibir de forma significativa hasta en un 45% la actividad NOS colónica previamente aumentada como consecuencia del estado inflamatorio (Figura 34a). Esta inhibición se debió a una disminución evidente de la

expresión de la isoforma inducible de esta enzima sin afectar de forma significativa la expresión de la constitutiva eNOS (Figura 34b).

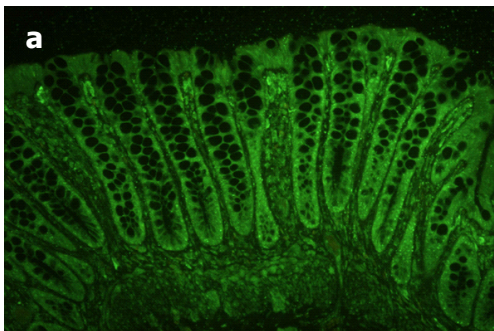


**Figura 34.** Efecto de la quercitrina (1mg/kg) en el modelo de colitis del DSS en ratas. **(a)** Actividad NOS colónica; n=10, \*p<0,05 vs. grupo C. **(b)** Medida de la expresión colónica de iNOS y eNOS por Western blot.

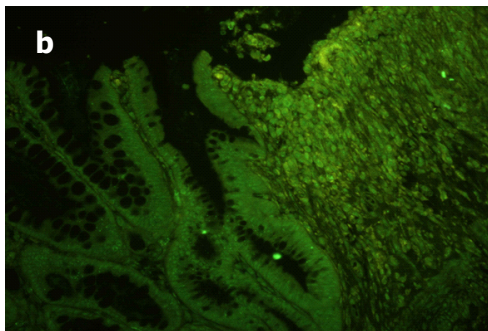
Como consecuencia de los buenos resultados obtenidos tras la administración de quercitrina en el proceso colítico, quisimos profundizar en su mecanismo antiinflamatorio intestinal. Así, la presencia de una menor infiltración de carácter inflamatorio en el tejido colónico, nos condujo al estudio de los distintos tipos celulares que constituían este infiltrado y al establecimiento de una posible relación con la producción de la enzima iNOS y TNF $\alpha$ .



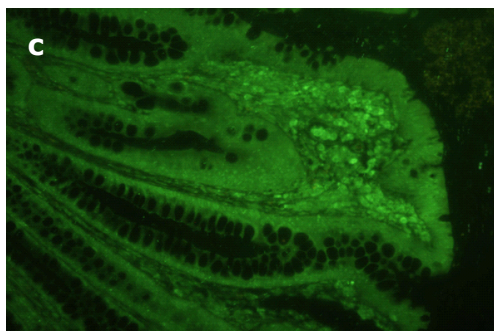
El marcaje de los linfocitos T, los polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos fue realizado a través de la técnica de fluorescencia indirecta. La inmunofluorescencia para linfocitos T (Figura 35a), macrófagos (Figura 36a) y neutrófilos (Figura 37a) fue mínima en el colon de los animales no colíticos.



**(a)** Grupo NC mostrando una escasa expresión en el tejido colónico.



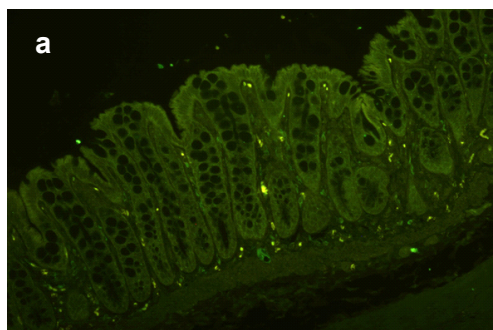
**(b)** Grupo C con una mínima presencia de linfocitos T en el infiltrado inflamatorio.



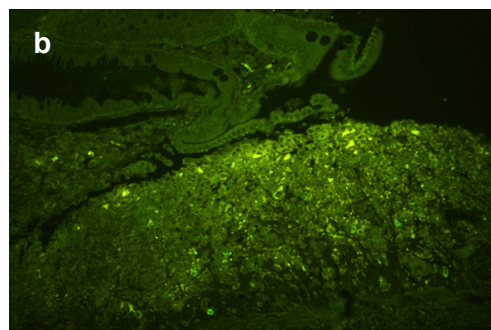
**(c)** Grupo Qr (1 mg/kg) en el que no se modificó la presencia de linfocitos T en el infiltrado inflamatorio.

**Figura 35.** Inmunofluorescencia de linfocitos CD3 realizada con el anticuerpo anti-CD3 clon G4.18 en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS (X10).

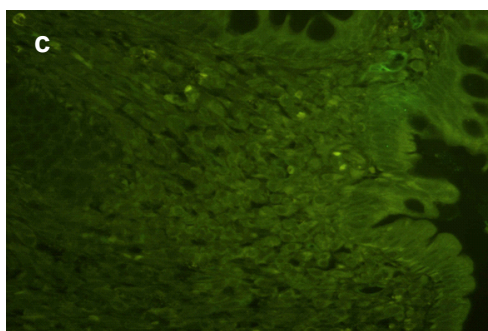
La presencia de células T en el infiltrado inflamatorio fue poco frecuente en los animales colíticos (Figura 35b) y no se encontró modificada tras el tratamiento con quercitrina (Figura 35c).



**(a)** Grupo NC presentando una escasa expresión en el tejido colónico (X10).



**(b)** Grupo C mostrando una expresión muy aumentada en las áreas ulceradas (X10).

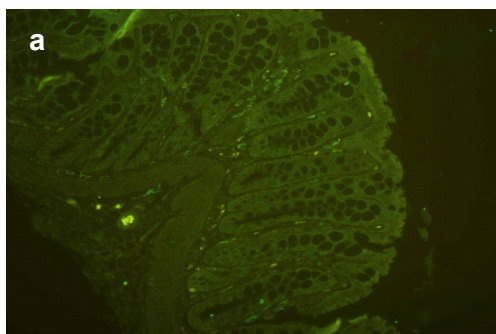


**(c)** Grupo Qr (1 mg/kg) manifestando el descenso en la inmunoexpresión de macrófagos (X20).

**Figura 36.** Inmunofluorescencia de macrófagos realizada con anticuerpo anti-macrófago clon 1C7 en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS.

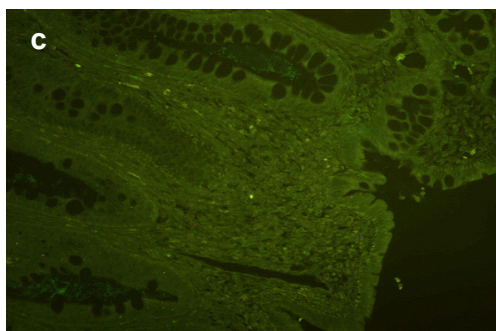
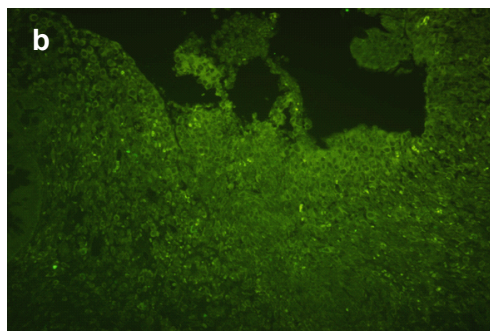
En relación a los macrófagos, se observó un gran número de células positivas con una elevada fluorescencia en el grupo colítico control, localizadas principalmente en zonas de la lámina propia y la submucosa asociadas a ulceración (Figura 36b). Sin embargo, los

animales tratados con quercitrina mostraron una reducción en el número de macrófagos infiltrados y, sobre todo, en la intensidad, presentando una fluorescencia semejante a la de las células epiteliales, consideradas como un control negativo (Figura 36c).



**(a)** Grupo NC mostrando una escasa expresión en el tejido colónico.

**(b)** Grupo C en el que se aprecia una expresión muy aumentada en la zona más alta de la ulceración.



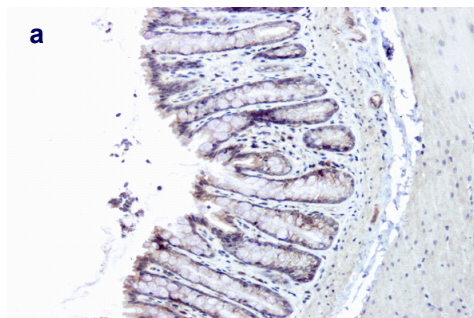
**(c)** Grupo Qr (1 mg/kg) presentando un descenso en la inmunexpresión de neutrófilos.

**Figura 37.** Inmunofluorescencia de polimorfonucleares neutrófilos realizada con el anticuerpo anti-granulocito clon RP-1 en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS (X10).

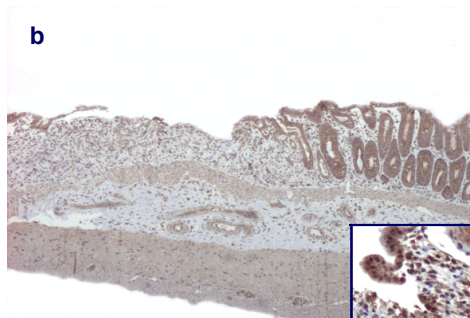
Junto con los macrófagos, otra de las células que aparecen en la inflamación son los polimorfonucleares neutrófilos. El marcaje de estas células se mostró más manifiesto en las zonas de ulceración, donde el proceso fue más agudo. Por ello, de nuevo en el caso de los animales colícticos no tratados, la fluorescencia fue más intensa localizándose en las zonas en las que el epitelio había desaparecido y en los abscesos de las criptas (Figura 37b). En cambio, puesto que en los animales a los que se le administró quercitrina no se observó ulceración, la presencia de neutrófilos fue menor, y por tanto también la expresión del marcado (Figura 37c).

iNOS y TNF se inmunomarcaron mediante la técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. En las muestras de los animales no colícticos, la inmunoexpresión de iNOS fue negativa, presentando solamente tinción de tipo inespecífica (fondo) en las células del epitelio de la mucosa (Figura 38a). En cambio, esta expresión fue mucho más intensa en el grupo colíctico control, observándose una marcada inmunotinción en las células epiteliales así como en muchas de las células inflamatorias que aparecen en la lámina propia y que se corresponden sobre todo con macrófagos y con polimorfonucleares neutrófilos presentes en la zona superficial de las úlceras (Figura 38b). En los animales tratados con quercitrina, la expresión fue débil y se limitó a la inmunotinción de neutrófilos en los pequeños abscesos de las criptas (Figura 38c).

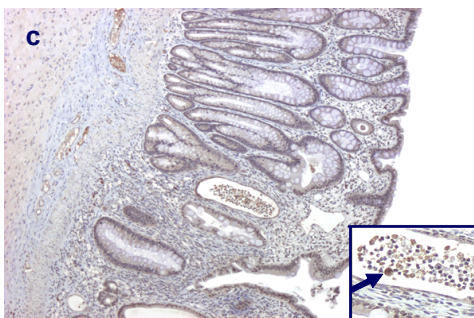
En cuanto al  $TNF\alpha$ , como en el caso de iNOS, los animales no colícticos sólo presentaron una tinción inespecífica en las células epiteliales (Figura 39a). Sin embargo, tanto las células epiteliales como las inflamatorias a nivel de la lámina propia y la submucosa, presentaron una intensa tinción frente al TNF en los animales colícticos control (Figura 39b). Esta expresión disminuyó en los animales tratados con quercitrina, reduciéndose, como en el caso de la iNOS, a los polimorfonucleares de algunos microabscesos y a las células epiteliales donde su intensidad fue sólo ligeramente superior a la que aparecía en las muestras de los animales no colícticos (Figura 39c).



(a) Grupo NC (X10)

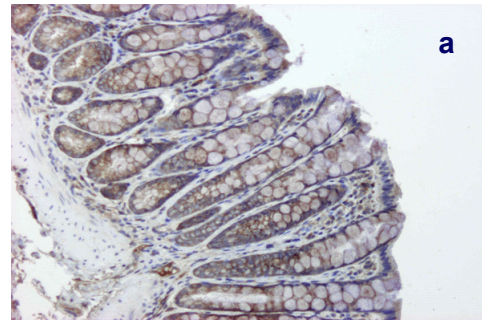


(b) Grupo C mostrando una inmunexpresión aumentada (X5, detalle X10)

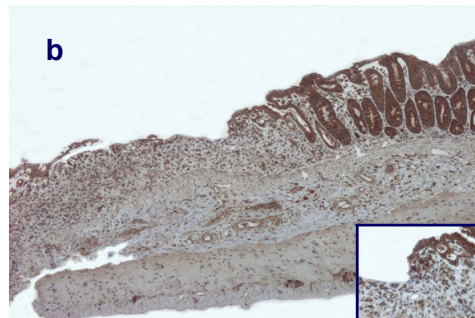


(c) Grupo Qr (1 mg/kg) presentando un descenso en la inmunexpresión de iNOS (X5) limitándose sólo a microabscesos (detalle X10)

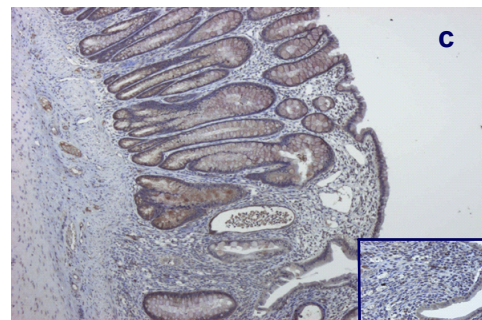
**Figura 38.** Inmunotinción para iNOS realizada en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS.



(a) Grupo NC (X10)



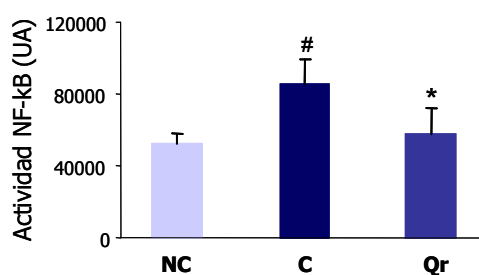
(b) Grupo C en el que se aprecia una inmunoexpresión aumentada (X5, detalle X10)



(c) Grupo Qr (1 mg/kg) presentando una débil tinción por la inmunoexpresión de TNFα(X 10, detalle X20)

**Figura 39.** Inmunotinción para TNF $\alpha$  realizada en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS.

Finalmente, dado que la quercitrina mostró una marcada inhibición de mediadores inflamatorios en cuya regulación se encuentra implicado el factor de transcripción NFκB (Kumar *et al.*, 2004), se determinó su grado de activación en el colon. Así, la inducción del proceso inflamatorio por DSS estuvo asociado con un incremento significativo de la actividad NFκB colónica cuando se comparó a la del tejido no inflamado (expresadas como unidades relativas de luminiscencia; 52160±5911 en ratas no colíticas *vs.* 85128±9007 en ratas colíticas;  $p < 0,05$ ) (Figura 40). Este aumento del factor de transcripción NFκB activado fue reducido hasta valores prácticamente normales después del tratamiento con quercitrina de las ratas colíticas (57554±11345) (Figura 40).



**Figura 40.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) sobre la actividad NFκB colónica en el modelo de colitis inducida por DSS en ratas.  $n=10$ , # $p < 0,05$  *vs.* grupo NC; \* $p < 0,05$  *vs.* grupo C.

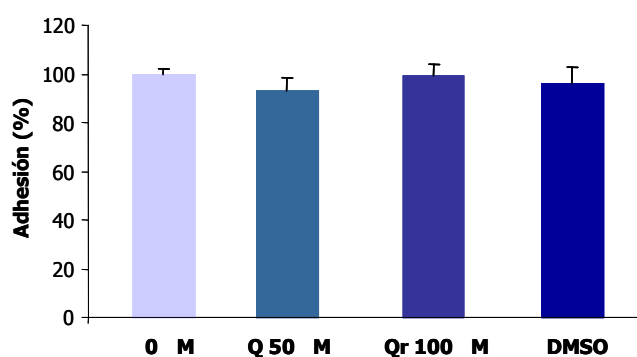
### Ensayos *in vitro*

Con el objeto de profundizar en el mecanismo de acción de la quercitrina, realizamos una serie de ensayos *in vitro* en macrófagos estimulados por LPS. En estas investigaciones, tratamos de determinar su capacidad para inhibir la producción de ciertas citocinas, como el TNFα y la IL-1β, así como la expresión de la isoforma inducible de la

enzima NOS. Igualmente, analizamos la posible modulación por parte de estos flavonoides de distintas vías de señalización, como la del NF $\kappa$ B o JNK/proteín kinasa, esta última como ejemplo de la vía de las MAPK.

Estos estudios fueron realizados tanto con la quercitrina como con la genina, ya que investigaciones previas demostraron que el efecto antidiarreico de este heterósido es como consecuencia de la liberación de la genina al lumen intestinal, constituyendo así la parte activa.

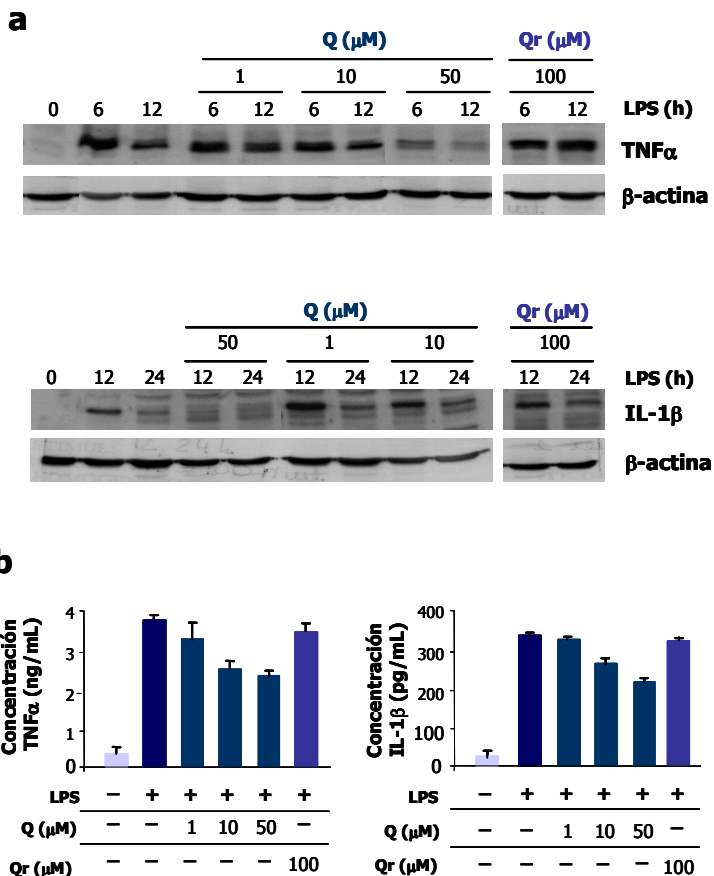
Las primeras pruebas se dirigieron a estudiar el posible efecto tóxico de ambos flavonoides mediante la técnica de cristal violeta, mostrando una ausencia total de toxicidad así como la del vehículo en el que fueron disueltos (DMSO) (Figura 41).



**Figura 41.** Efecto de la quercetina (Q), quercitrina (Qr) y DMSO sobre la viabilidad celular. Los datos están expresados como % de adhesión de los macrófagos. Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

La estimulación de los macrófagos con LPS, indujo la expresión de las dos citocinas proinflamatorias, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , alcanzando unos niveles máximos tras 6 y 12h respectivamente (Figura 42a). Esta diferencia en el tiempo puede ser explicada por el hecho de que la expresión de IL-1 $\beta$  se debe parcialmente a la liberación de TNF $\alpha$  (Locksley *et al.*, 2001).



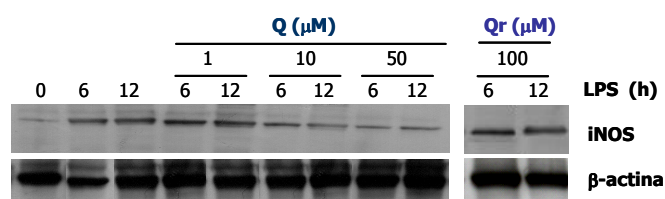


**Figura 42.** Efecto de la quercetina (Q) y la quercitrina (Qr) sobre la producción de citocinas inducidas por LPS. **(a)** La Q inhibió la expresión de TNFα e IL-1β. Las células fueron incubadas con Q (1, 10, 50 μM) durante 1h y después estimuladas con LPS (50 ng/mL) para los tiempos indicados. **(b)** La Q redujo la secreción de TNFα e IL-1β. Los macrófagos fueron tratados como se indica en (a) durante 24h. Las concentraciones fueron analizadas por Western blot (a) o ELISA (b). Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

La adición de quercetina (1-50 μM) antes de la estimulación con LPS inhibió de una forma dosis dependiente ambas expresiones, mostrando un efecto máximo a la concentración de 50 μM (Figura 42a). Estos resultados fueron confirmados cuando se

evaluó la producción de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes del cultivo celular, donde la quercetina también originó una inhibición dosis dependiente de la secreción de estas citocinas, con una disminución de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de un 40% y un 38% respectivamente, a la dosis de 50  $\mu$ M (Figura 42b).

La expresión de iNOS fue inducida en estas células tras 6 y 12h de la estimulación con LPS (Figura 43). Cuando los macrófagos fueron preincubados con diferentes concentraciones de quercetina (1-50  $\mu$ M), se observó de nuevo una inhibición dosis dependiente de la expresión de iNOS (Figura 43).



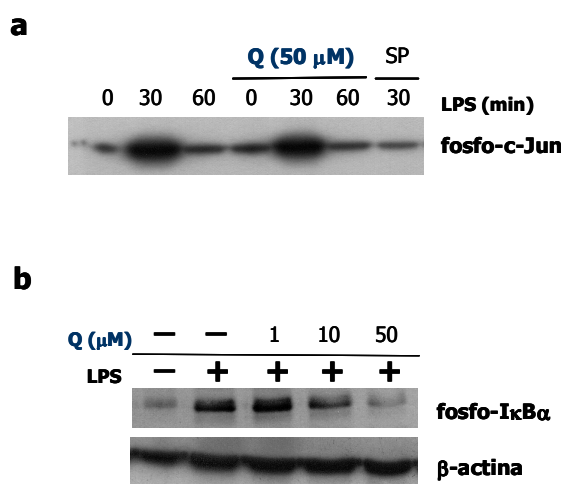
**Figura 43.** La quercetina (Q), pero no la quercitrina (Qr) inhibió la expresión de iNOS inducida por LPS en los macrófagos. Las células fueron incubadas con Q (1, 10, 50  $\mu$ M) y Qr (100  $\mu$ M) durante 1h y estimuladas con LPS (50 ng/mL) durante los tiempos indicados. La expresión de iNOS fue analizada por Western blot. Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

Concentraciones de quercitrina de hasta 100  $\mu$ M no modificaron ni la secreción ni la expresión del TNF $\alpha$  y la IL1 $\beta$  y tampoco manifestaron ningún tipo de actividad sobre los niveles de iNOS (Figura 42 y 43). Estos datos confirman nuestros resultados previos, en los que la genina era considerada la parte activa del heterósido.

En macrófagos de ratón, la respuesta celular a LPS origina la activación de diversos factores de transcripción involucrados en la producción de distintos mediadores inflamatorios (Akira, 2001). Dado que los promotores de TNF $\alpha$  e iNOS contienen regiones reguladoras con sitios de unión para el NF $\kappa$ B y la proteína activadora 1 (AP-1) (Davis, 2000;

Xie *et al.*, 1993), se decidió estudiar los efectos de la quercetina en estas vías de señalización.

El efecto de la quercetina sobre el factor de transcripción AP-1, se realizó mediante el estudio de la vía de la JNK/proteín kinasa, vía que es activada por LPS además de por estrés (Comalada *et al.*, 2003) (Figura 44a). Los resultados mostraron que la quercetina no afectó a esta vía, ya que fue incapaz de inhibir la fosforilación de c-Jun inducida por LPS (Figura 44a). Sin embargo, esta activación fue bloqueada por la preincubación con el inhibidor específico SP600125 (25  $\mu$ M; Figura 44a).



**Figura. 44.** La quercetina inhibió la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , pero no afectó a la actividad JNK, ambos procesos inducidos por LPS. **(a)** Los macrófagos quiescentes fueron incubados con quercetina (Q, 50  $\mu$ M) o SP600125 (SP, 25  $\mu$ M) durante 1h y estimulados con LPS durante los tiempos indicados. La activación JNK fue medida por la fosforilación *in vitro* de GST-c-Jun. **(b)** Los macrófagos quiescentes fueron pretratados con quercetina (Q, 1, 10, 50  $\mu$ M) durante 1h e incubados con LPS (50 ng/mL) durante 5 minutos. La fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  fue analizada por Western blot. Estos experimentos fueron realizados por triplicado, obteniendo resultados similares.

Para estudiar el efecto de la quercetina en la vía del NF $\kappa$ B, se analizó la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  por Western blot (Figura 44b). Los resultados indicaron que la quercetina inhibió de

una forma dosis dependiente la fosforilación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  inducida por el tratamiento con LPS, llegando a una inhibición prácticamente total a la concentración de 50  $\mu$ M (Figura 44b).

Estos resultados muestran que la quercetina ejerce un potente efecto inhibitor en la producción de citocinas e iNOS *in vitro* que podría estar mediado a través del bloqueo de la vía del NF $\kappa$ B.

#### **4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ASOCIACIÓN DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON AGPI $\omega$ 3 Y QUERCITRINA EN LA COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR DSS EN RATAS.**

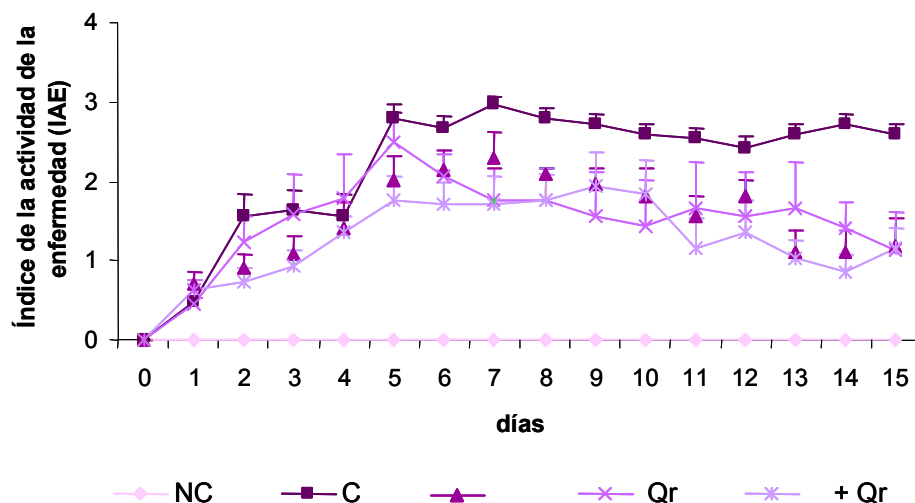
Para realizar el estudio de la asociación de la dieta enriquecida en APGI  $\omega$ 3 con quercitrina empleamos 5 grupos:

- Grupo NC: que recibió dieta estándar durante toda la experiencia y al que no se le indujo la inflamación intestinal.
- Grupo C: que fue alimentado con dieta estándar desde dos semanas previas al proceso colítico por DSS hasta su sacrificio.
- Grupo  $\omega$ : que consumió dieta enriquecida en aceite de pescado desde dos semanas previas al proceso colítico hasta su sacrificio.
- Grupo Qr: que recibió dieta estándar y fue tratado diariamente con quercitrina 1 mg/kg, a partir del quinto día de la administración del DSS.
- Grupo  $\omega$  + Qr: que fue alimentado con una dieta enriquecida en AGPI  $\omega$ 3 durante toda la experiencia y recibió además una dosis diaria de quercitrina de 1 mg/kg desde el quinto día de la inducción de la colitis.

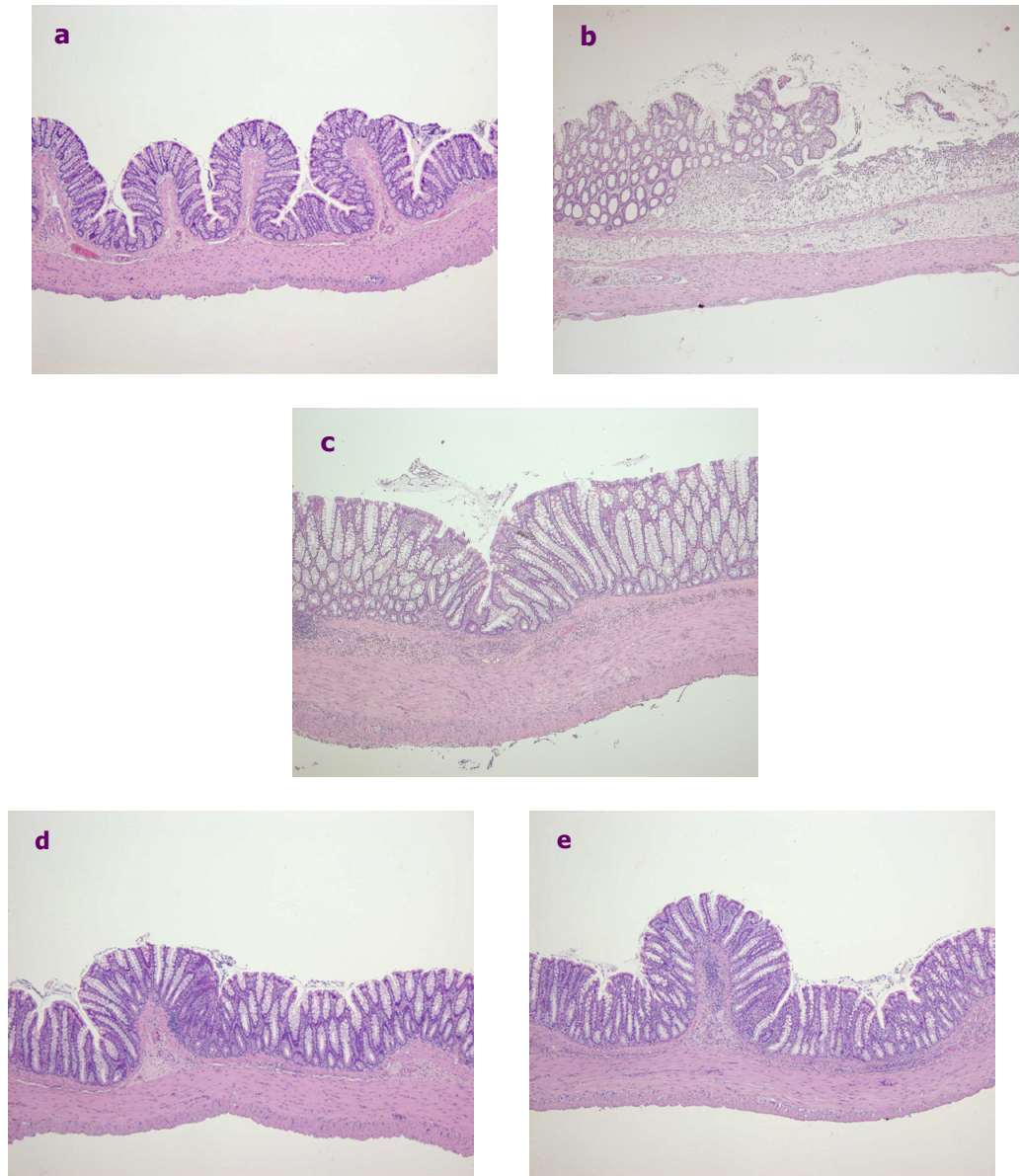
La asociación de una dieta suplementada con AGPI  $\omega$ 3 con quercitrina presentó un marcado efecto antiinflamatorio en el proceso colítico inducido por DSS. Esta actividad se demostró tanto en los parámetros de carácter general como histológicos y bioquímicos.

Al comparar el grupo que recibió el tratamiento combinado con los animales a los que se les administró únicamente quercitrina o dieta  $\omega$ , resaltamos:

1. En relación a los parámetros de carácter general, este grupo mostró una reducción significativa del IAE a partir del sexto día en adelante, reducción que fue lograda uno y dos días antes que en el grupo Qr y  $\omega$  respectivamente (Figura 45).
2. Histológicamente, la recuperación del daño fue evidente de modo que sólo se observaron pequeños infiltrados inflamatorios de carácter focal afectando a la lámina propia y la submucosa, pero sin llegar en ningún caso a las capas musculares (Figura 46). Esta restauración de la arquitectura colónica no presentó diferencias con respecto a los animales tratados con quercitrina y dieta  $\omega$  individualmente, puesto que la recuperación en estos grupos ya era muy manifiesta.



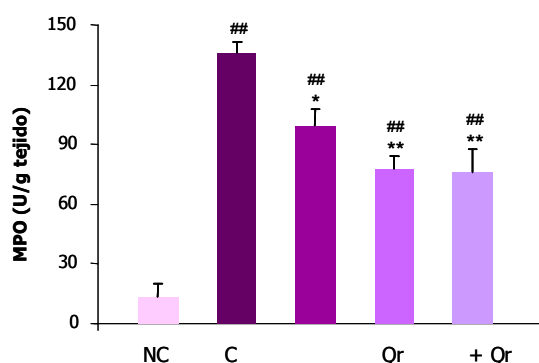
**Figura 45.** Evolución del índice de la actividad de la enfermedad en ratas no colíticas, ratas colíticas alimentadas con dieta estándar C, con o sin quercitrina, y alimentadas con dieta  $\omega$ , con o sin quercitrina (Qr) (1 mg/kg) basado en el criterio mostrado en la Tabla 4. n=10. Todos los grupos mostraron diferencias significativas con respecto al grupo no colítico ( $p < 0,01$ ). Los tratamientos presentaron diferencias significativas en relación al grupo C a partir de los siguientes días: día 8 en  $\omega$ , día 7 en Qr y día 6 en  $\omega + Qr$  ( $p < 0,05$ ).



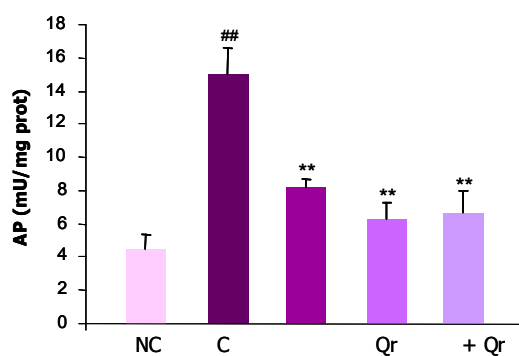
**Figura 46.** Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de la mucosa colónica donde se observa una gran recuperación del daño en el grupo tratado con la asociación de AGPI  $\omega$ 3 y quercitrina (1 mg/kg). **(a)** Grupo NC. **(b)** Grupo C. **(c)** Grupo  $\omega$ . **(d)** Grupo Qr. **(e)** Grupo  $\omega$  + Qr.

3. La mejora más importante presentada por la asociación de dieta  $\omega$  y quercitrina con respecto a los tratamientos individuales, se observó bioquímicamente:

3.1. En la mayoría de los parámetros se encontró un efecto sinérgico como resultado de la actividad antiinflamatoria de cada uno de los tratamientos por separado. Las actividades MPO y AP colónicas se vieron disminuidas a la mitad (Figuras 47 y 48), mostrando valores muy semejantes a los de las ratas colíticas tratadas únicamente quercitrina. También de forma similar a este grupo, el tratamiento combinado fue capaz de contrarrestar la depleción de glutatión inducida por el DSS (Figura 49). Tras determinar los niveles de dos enzimas inducidas por el proceso inflamatorio colónico, iNOS y COX-2, se comprobó que la asociación de AGPI  $\omega$ 3 y quercitrina logró reducir a la mitad la expresión de ambas, mostrando un comportamiento semejante a los tratamientos por separado (Figura 50). Además, la asociación originó una reducción en los niveles colónicos de LTB<sub>4</sub> y TNF , con un porcentaje de inhibición en torno al 65% en ambos parámetros (Figuras 51 y 52). La

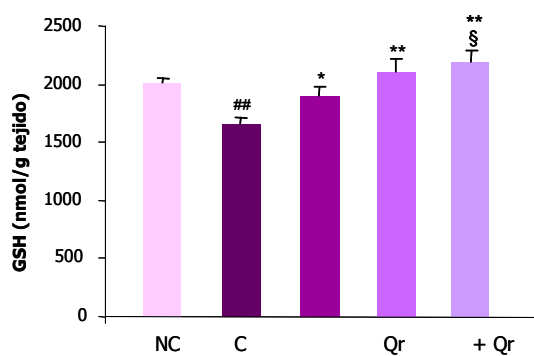


**Figura 47.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI  $\omega$ 3 en la actividad MPO colónica en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, ##p<0,01 vs. grupo NC; \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. grupo C.



**Figura 48.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI  $\omega$ 3 en la actividad AP colónica en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, ##p<0,01 vs. grupo NC; \*\*p<0,01 vs. grupo C.

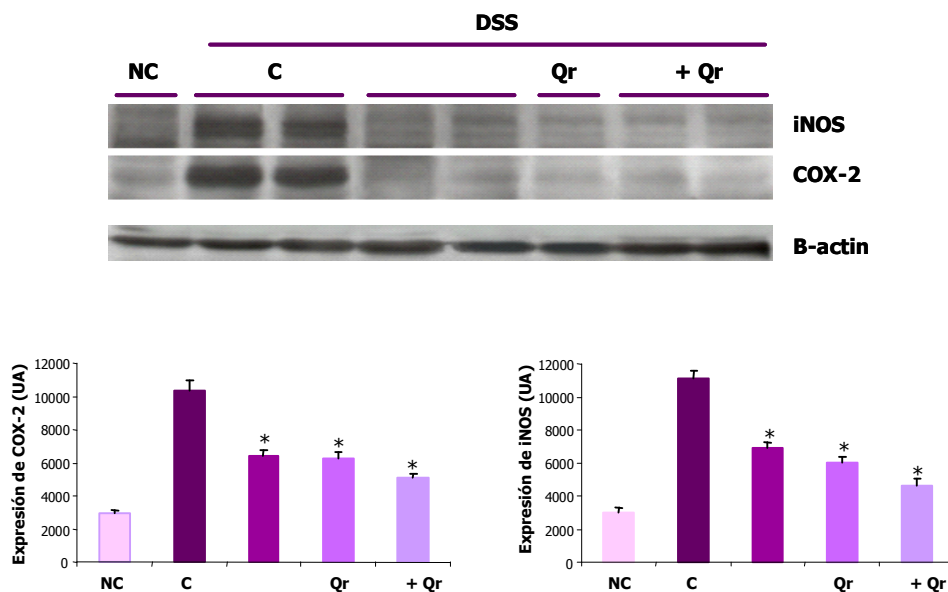
reducción del eicosanoide se debería exclusivamente a la dieta  $\omega$ , ya que no se observó ninguna modificación de este parámetro en los animales que recibieron quercitrina (Figura 51). Sin embargo, en la disminución de los niveles de TNF pudieron contribuir tanto la dieta  $\omega$  como el flavonoide, puesto que ambos tratamientos presentaron un perfil de inhibición semejante (Figura 52).



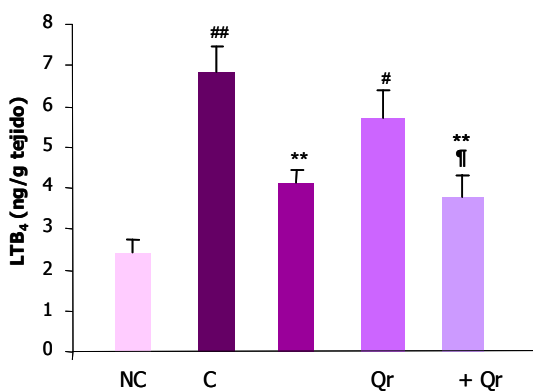
**Figura 49.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI  $\omega$ 3 en el contenido colónico de GSH total en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, ##p<0,01 vs. grupo NC; \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. grupo C; §p<0,05 vs. grupo  $\omega$ .

3.2. Finalmente, fue en los niveles colónicos de IL-1 $\beta$  donde la asociación de la dieta  $\omega$  y la quercitrina presentó un efecto potenciador en relación con los tratamientos individuales. Así, el tratamiento combinado fue capaz de producir una disminución de un 98% de los niveles de IL-1 $\beta$  en el colon, mostrando una normalización de los valores (Figura 53). Sin embargo, la suplementación con AGPI  $\omega$ 3 no afectó a la producción de esta citocina, mientras que la quercitrina provocó una reducción de un 72% (Figura 53).

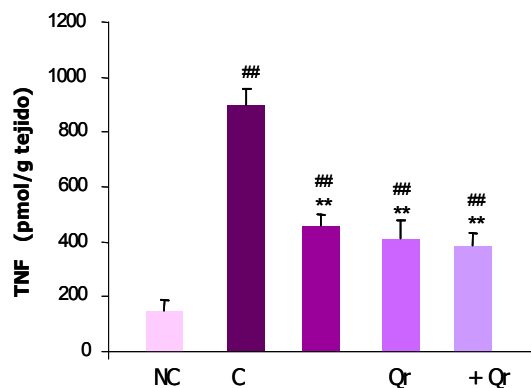




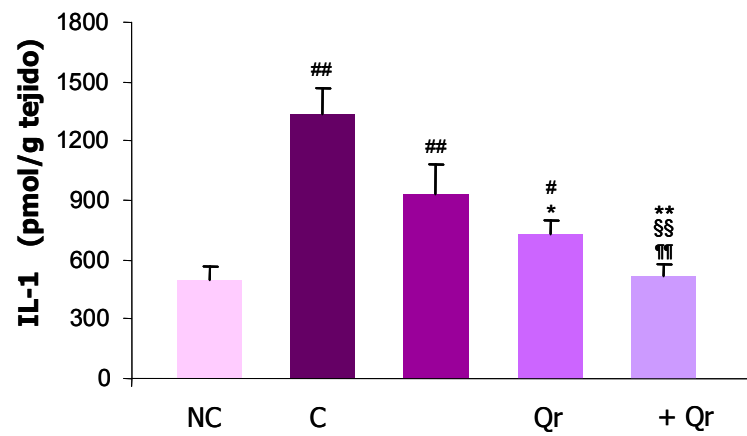
**Figura 50.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI ω3 en la expresión de iNOS y COX-2 colónicas en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, \*p<0,05 vs. grupo C.



**Figura 51.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI ω3 en la síntesis colónica de LTB<sub>4</sub> en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, #p<0,05, ##p<0,01 vs. grupo NC; \*\*p<0,01 vs. grupo C; †p<0,05 vs. grupo Qr.



**Figura 52.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI ω3 en la síntesis colónica de TNFα en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, ##p<0,01 vs. grupo NC; \*\*p<0,01 vs. grupo C.



**Figura 53.** Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI  $\omega$ 3 en la síntesis colónica de IL-1 $\beta$  en el modelo de colitis del DSS en ratas. n=10, #p<0,05, ##p<0,01 vs. grupo NC; \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. grupo C; \$\$p<0,01 vs. grupo  $\omega$ ; ¶¶p<0,01 vs. grupo Qr.

## **DISCUSIÓN**

---

El término enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende un grupo de patologías en las que existe una inflamación de la pared intestinal de etiología desconocida, con un curso crónico en el que se alternan períodos de remisión y de actividad de duración variables. Las dos principales enfermedades de este grupo son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Aunque la causa de la EII es todavía desconocida, es un hecho bien aceptado que en su desarrollo están involucrados varios mecanismos fisiopatológicos: una cierta predisposición genética, la acción de diversos factores ambientales y una respuesta inmune anormal (Podolsky, 2002). Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto un incremento gradual de la incidencia de estas patologías intestinales (Loftus, 2004), lo que justificaría el importante esfuerzo que se viene realizando por parte de la comunidad científica para la búsqueda de nuevos fármacos eficaces en el tratamiento de la EII y la prevención de las recidivas que la caracterizan. En la actualidad, prácticamente todos los fármacos utilizados presentan importantes reacciones adversas (Enns y Sutherland, 1998; Stein y Hanauer, 2000), por lo que resulta de gran interés el establecimiento de nuevas estrategias terapéuticas que, dotadas de actividad frente a estas patologías, presenten menos efectos secundarios (Kho *et al.*, 2001). Esto es de gran relevancia, dado que el tratamiento farmacológico en un elevado porcentaje de pacientes se realiza durante un prolongado período de tiempo.

El estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de la inflamación intestinal, pasa por la elección de un modelo experimental que reproduzca lo más fielmente posible las características de la enfermedad en humanos, y que permita la utilización de especies animales de fácil disponibilidad y manejabilidad. Son numerosos los modelos experimentales desarrollados que intentan reproducir la EII. La mayoría de ellos se caracterizan por una excesiva respuesta Th1, que parece guardar una gran similitud con la EC humana (Podolsky, 2002). Otros modelos pretenden, a través de un aumento de la actividad de células Th2, originar un tipo de inflamación que se asemeje, desde el punto de vista histológico, a la CU, aunque hay que destacar que en la enfermedad humana la activación de las vías inflamatorias es más compleja y no se corresponde con una activación Th2 pura (Podolsky, 2002).

El modelo experimental utilizado para la realización de esta tesis doctoral fue el modelo del sulfato de dextrano sódico (DSS), uno de los más utilizados para conocer los mecanismos involucrados en el proceso inflamatorio intestinal, así como para valorar inicialmente nuevos tratamientos potencialmente útiles en la EII en humanos.

El DSS es un polisacárido que contiene tres grupos sulfato por molécula de glucosa (Ishioka *et al.*, 1987). Su incorporación en el agua de bebida da lugar a un proceso inflamatorio intestinal que comparte numerosas características clínicas e histológicas con la CU humana (Gaudio *et al.*, 1999; Goldman, 1992; Jewel, 1993; Kullmann *et al.*, 2001; Roediger *et al.*, 1997). Entre ellas podemos destacar:

- pérdida de peso.
- diarrea con sangre en las heces.
- acortamiento del colon.
- inflamación principalmente del colon izquierdo y el recto y limitada básicamente a la mucosa.
- abscesos de criptas y depleción de mucina.
- infiltración leucocitaria.

El mecanismo por el que el DSS genera el proceso inflamatorio intestinal no es conocido con exactitud, y se piensa que es causado por la conjunción de distintos mecanismos, entre los que se incluyen un efecto tóxico directo sobre las células epiteliales, una inapropiada función de los macrófagos, una alteración en la normal interacción entre los linfocitos intestinales, las células epiteliales y la matriz extracelular, una modificación en la expresión de los receptores de integrinas y cambios en la población de la microflora intestinal (Ni *et al.*, 1996; Okayasu *et al.*, 1990).

Al igual que otros agentes químicos, el DSS provoca una alteración en la función protectora de la barrera epitelial colónica previa al establecimiento de la colitis,

incrementándose así la exposición de los macrófagos a la microflora de la mucosa (Kitajima *et al.*, 1999). Como consecuencia, se produce su activación y, por tanto, la liberación inespecífica de citocinas proinflamatorias conduciendo al desarrollo de la inflamación (Dieleman *et al.*, 1998). Sin embargo, el estudio de la participación de las bacterias intestinales en la colitis inducida por DSS ha dado lugar a resultados contradictorios. El hecho de que tanto antibióticos (Rath *et al.*, 2001) como probióticos (Rachmilewitz *et al.*, 2004; Setoyama *et al.*, 2003; Verdu *et al.*, 2000) presenten un efecto beneficioso en la colitis inducida por este agente, confirma un papel importante de la flora intestinal en este tipo de inflamación. En cambio, otros estudios mostraron que, en este modelo, ratones libres de gérmenes desarrollaron una colitis con las mismas características que la de ratones normales (Bylund-Fellenius *et al.*, 1994; Kitajima *et al.*, 2001), si bien se podría explicar por la activación directa de los macrófagos por el DSS.

También existen discrepancias sobre el papel de las células linfoides en la colitis experimental por DSS. Así, se ha establecido que las células T CD4<sup>+</sup> son importantes en la modulación de la respuesta inmunológica en este modelo (Shintani *et al.*, 1998); en cambio, ratones con inmunodeficiencia severa combinada sufren un proceso inflamatorio tras ser tratados con DSS, indicando que las células T y B no son indispensables para el desarrollo de la colitis aguda (Dieleman *et al.*, 1994).

Estos datos dan lugar a una hipótesis en la que se establece que la alteración de la barrera intestinal, debida al efecto citotóxico directo del DSS sobre el epitelio, facilitaría la entrada de productos luminare promoviendo inicialmente la activación de células no linfoides como macrófagos, con la consecuente producción de diferentes mediadores proinflamatorios (Dieleman *et al.*, 1998; Egger *et al.*, 2000). Posteriormente, existiría una respuesta de células T como un proceso secundario a la inflamación inducida por macrófagos (Okasayu *et al.*, 1990), indicando que los linfocitos podrían influir en la gravedad de la enfermedad, pero no serían esenciales para el inicio del proceso inflamatorio. En relación a los tipos celulares implicados, se ha establecido cómo la colitis aguda inducida por DSS está mediada fundamentalmente por macrófagos y una respuesta de células T con fenotipo Th1, con un incremento de TNF $\alpha$ , IL-1, IL-12, e INF- $\gamma$  (Egger *et*

*al.*, 2000); en cambio, en fases más crónicas de inflamación, se encuentra una respuesta Th1/Th2 caracterizada por un aumento en los niveles de INF- $\gamma$  e IL-4 (Dieleman *et al.*, 1998).

Además, se ha descrito que el proceso inducido por DSS se encuentra asociado con una activación del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B (Marrero *et al.*, 2000), que es considerado como un componente clave en la inducción de la transcripción de citocinas proinflamatorias en la EII (French y Pettersson, 2000). La eficacia de oligonucleótidos antisentido frente a NF $\kappa$ B en la colitis inducida por DSS ha confirmado la importancia de este factor de transcripción en este modelo (Murano *et al.*, 2000).

Aunque el modelo del DSS se encuentra bien caracterizado mostrando una progresión de la enfermedad predecible (Gaudio *et al.*, 1999), existe una variabilidad dependiente de la concentración y el peso molecular del DSS, de la duración del período de exposición al agente, así como de la susceptibilidad de las distintas especies y cepas de animales (Vowinkel *et al.*, 2004). Parece ser que la colitis inducida por DSS en ratas de la cepa Wistar, presenta las mayores semejanzas con la CU en relación a la distribución y morfología de las lesiones (Kishimoto *et al.*, 1992).

Se ha propuesto que la administración de DSS en el agua de bebida a roedores permite establecer tanto un proceso colítico de tipo agudo, que ocurre mientras el DSS es suministrado, como uno crónico, que aparece en un corto período de tiempo tras el contacto con este agente (Kullmann *et al.*, 2001), si bien esto último puede ser debido a un proceso de recuperación.

Con el objeto de lograr una cronicidad en el proceso inflamatorio intestinal, realizamos una modificación del modelo original de Stucchi *et al.* (2000). Así, el protocolo experimental utilizado en nuestros estudios consistió en la administración, disuelto en el agua de bebida, de DSS al 5% (p/v) durante 5 días y del 2% (p/v) durante los 10 días siguientes a ratas de la cepa Wistar, a diferencia del modelo original en el que los animales recibían DSS al 5% (p/v) durante 10 días. Este cambio fue llevado a cabo para lograr dos objetivos principalmente:

- reducir la mortalidad como consecuencia del proceso inflamatorio, ya que en investigaciones previas, la administración de DSS al 5% (p/v) descrita por Stucchi *et al.* (2000) produjo la muerte de hasta un 50% de los animales, a diferencia del 10% obtenido en nuestro estudio.

- permitir constatar la capacidad regenerativa de un agente terapéutico gracias al mantenimiento en el tiempo del proceso inflamatorio derivado de la administración del DSS al 2% durante 10 días.

Los resultados obtenidos con este protocolo demuestran que el proceso inflamatorio se mantuvo durante los 15 días en los que el DSS fue administrado, si bien la supervivencia fue del 90%. En este sentido, las principales manifestaciones fueron diarrea y presencia de sangre en las heces, que al final del experimento se convirtió en pérdida masiva de la misma por el recto, con la consiguiente alteración en el estado general de los animales: disminución de peso y anorexia. Tras su sacrificio pudimos comprobar que el daño intestinal se limitaba casi exclusivamente al colon, caracterizándose por un engrosamiento del tejido acompañado de hiperemia y zonas de ulceración en la región distal, así como un acortamiento del intestino.

El estudio microscópico confirmó la existencia de este daño inflamatorio en el tejido colónico. Estas preparaciones nos permitieron comprobar que la lesión inducida con el DSS se restringía fundamentalmente a la mucosa, lo que confirma que este modelo se asemeja en mayor medida a lo que ocurre en la CU en humanos (Goldman, 1992; Jewel, 1993). Los cambios en la mucosa incluían la presencia de ulceraciones y pérdida de la citoarquitectura normal de las criptas con necrosis y abscesos; las células caliciformes aparecían vacías de su contenido mucoso. También se observó la presencia de un importante infiltrado inflamatorio en las distintas capas intestinales, que estaba principalmente compuesto por neutrófilos y macrófagos, aunque estaban presentes eosinófilos y linfocitos. La existencia de este gran infiltrado se corroboró bioquímicamente por el incremento en la actividad MPO, dado que éste es considerado como un marcador de este proceso (Krawisz *et al.*, 1984), y que se encuentra incrementado en distintos modelos experimentales de inflamación intestinal (Yamada *et al.*, 1992).



En general, este modelo presenta un perfil semejante tanto en la evolución de la enfermedad, como en los parámetros histológicos y bioquímicos, al descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación, en el que las ratas de la cepa Wistar recibían DSS al 5% (p/v) durante 7 días (Camuesco *et al.*, 2004). Así, la relación peso/longitud colónicas, el IAE, la actividad AP y NOS, y los niveles tanto de GSH como de LTB<sub>4</sub> en el colon, mostraron un comportamiento similar en ambos protocolos de administración. Hay que destacar que la posterior disminución en la concentración de DSS produjo una reducción en la actividad MPO con respecto a la presentada por los animales tratados durante 7 días con DSS al 5%. Esto podría constituir un signo de la cronicación debido al aumento del tiempo de exposición al DSS, ya que se ha descrito que la fase aguda de este tipo de colitis se encuentra mediada por neutrófilos y macrófagos, siendo los primeros los fundamentales productores de MPO. Por tanto, la disminución de la actividad de esta enzima en el presente protocolo, podría deberse a un cambio en el perfil celular del infiltrado inflamatorio, con una menor presencia de neutrófilos, como causa de un proceso crónico.

Desde el punto de vista bioquímico, ya hemos citado anteriormente, que este proceso inflamatorio intestinal estuvo acompañado de un aumento significativo en la actividad MPO colónica (aproximadamente 10 veces superior a la de los animales no colíticos), tal y como se ha descrito en este modelo experimental (Hirata *et al.*, 2001; Stucchi *et al.*, 2000; Vowinkel *et al.*, 2004). El daño oxidativo colónico se vio reflejado por una disminución significativa de aproximadamente un 16% en los niveles de glutatión, péptido involucrado en la defensa antioxidante.

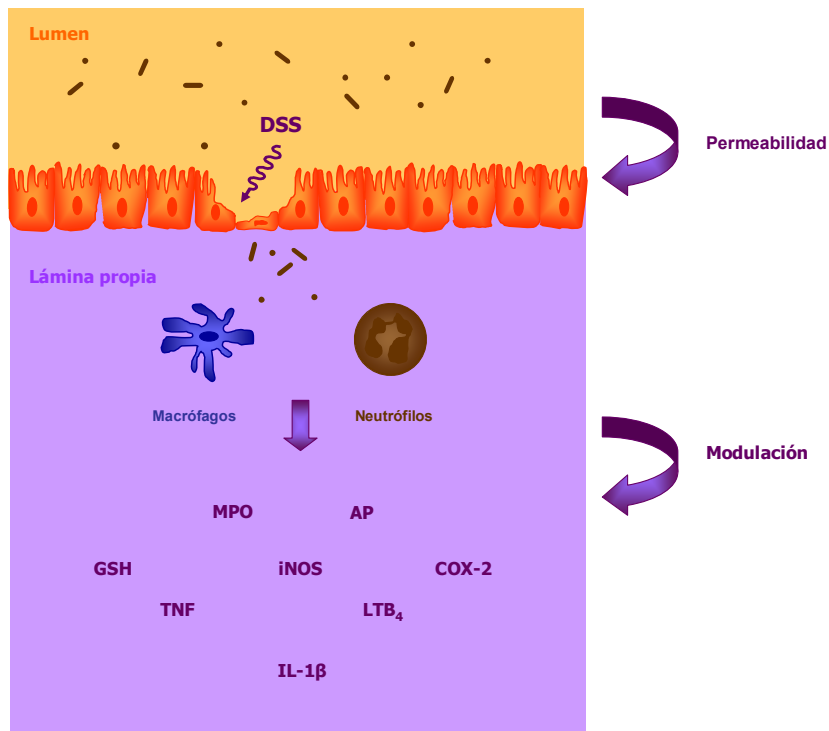
Este modelo de inflamación intestinal se caracterizó también por un incremento significativo de 2,5 veces en los niveles colónicos de LTB<sub>4</sub> y de 3,5 veces en la expresión de la COX-2, lo cual indica la existencia de un incremento en el metabolismo del ácido araquidónico de forma similar a lo que ocurre tanto en humanos (Lauritsen *et al.*, 1986; Sharon y Stenson, 1984) como en distintos modelos de inflamación intestinal (Fedorak *et al.*, 1992; Meenan *et al.*, 1996; Vilaseca *et al.*, 1990).

La mayor producción de las citocinas proinflamatorias TNF e IL-1 $\beta$  encontrada en los animales inflamados, superando en cuatro y dos veces respectivamente a la de los animales no colíticos, también ha sido constatada por otros autores en este mismo modelo de inflamación intestinal (Egger *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). El incremento de estos dos mediadores proinflamatorios probablemente se deba a la gran infiltración leucocitaria existente en la mucosa colónica, puesto que estos elementos celulares constituyen una de sus principales fuentes de producción (Bell *et al.*, 1995; Buell y Berin, 1994; Mitsuyama *et al.*, 2000).

Finalmente, dado que en estudios previos se había relacionado un incremento de la actividad NOS con la colitis inducida por DSS (Obermeier *et al.*, 1999), comprobamos si estos resultados se reproducían en este protocolo. Efectivamente, el proceso colítico inducido en nuestro estudio estuvo asociado a una mayor actividad NOS en el colon relacionada con la isoforma iNOS, como mostró el análisis por Western blot. Dos hallazgos experimentales confirmaron este hecho:

- la actividad NOS se vio reducida cuando homogenados colónicos de animales con inflamación fueron incubados en presencia de aminoguanidina ( $10^{-4}$  M), un inhibidor selectivo de iNOS (Griffiths *et al.*, 1993), alcanzando valores similares a las muestras de las ratas no colíticas.
- la expresión colónica de la isoforma constitutiva eNOS no fue modificada por el daño inflamatorio inducido por DSS, como se demostró por análisis de Western blot.

La figura 54 muestra los distintos parámetros que se encuentran modificados tras la colitis experimental inducida por DSS en ratas empleada en esta tesis.



**Figura 54.** La administración de DSS en el agua de bebida origina un proceso colítico caracterizado por la liberación de numerosos mediadores proinflamatorios, así como por la inducción de ciertas enzimas.

## 1. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON ACEITE DE OLIVA Y DE PESCADO EN LA COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR DSS EN RATAS.

En las últimas décadas se ha producido un gran incremento de la incidencia de numerosas enfermedades crónicas, hecho que se ha relacionado con el progresivo abandono de la llamada dieta mediterránea en favor de una alimentación excesivamente rica en grasa saturada. Por ello, todos los consejos dietéticos han ido dirigidos a reemplazar las grasas saturadas por aceites vegetales, como el de girasol o maíz, y grasas ricas en ácido linoleico, con la creencia de que éstas eran más saludables que las grasas animales. Sin embargo, esto ha llevado a un desequilibrio entre el aporte de AGPI  $\omega 6$  y

$\omega 3$ , provocando un gran excedente de  $\omega 6$  en detrimento de los  $\omega 3$ , que puede tener graves consecuencias en la incidencia de numerosas enfermedades tan frecuentes en nuestros días, como son las de tipo inflamatorio (Simopoulos, 2002). Aunque algunos aceites vegetales, como el aceite de linaza, la semilla de colza, la soja, el germen de trigo o las nueces son fuentes ricas en el AGPI  $\omega 3$  ácido linolénico, prácticas como la hidrogenación parcial de aceites de soja o de semilla de colza para uso como aceites de fritura, reducen el contenido en este ácido graso (Simopoulos, 1991). El desequilibrio entre AGPI  $\omega 6/\omega 3$  se encuentra favorecido además por el aporte de ácidos grasos  $\omega 6$  de la carne de origen animal, debido al uso de concentrados de cereales ricos en ellos para la elaboración de pienso (Trautwein, 2001). Finalmente, también contribuye el hecho de que el pescado, fuente principal de AGPI  $\omega 3$ , actualmente ve reducido su contenido en estos ácidos grasos como consecuencia de su crecimiento en piscifactorías y no en ambientes naturales (van Vilet y Katan, 1990), sumado al bajo consumo debido al mayor coste en el mercado en relación a las carnes.

Todo lo anterior ha conducido a un gran incremento en el consumo de ácido linoleico en los últimos años, por lo que actualmente su sustitución por aceites ricos en ácidos grasos monoinsaturados, como el aceite de oliva, y poliinsaturados  $\omega 3$ , como el de pescado, constituye una estrategia clave para alcanzar un patrón dietético más saludable.

La FAO y la OMS en su informe del año 2003 sobre dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas, recomiendan una ingesta de grasas saturadas menor al 10% y un consumo de grasa monoinsaturada que aporte entre un 15 y un 30% de la energía total. El consumo de grasa poliinsaturada debe representar un 6-10% de la energía, de los cuales los ácidos grasos  $\omega 3$  han de contribuir con un 1-2% (WHO, 2003).

Puesto que numerosos estudios epidemiológicos y experimentales establecen la influencia de los ácidos grasos de la dieta en muchas enfermedades inmunológicas e inflamatorias, incluida la EII (Calder, 2003; Yaqoob, 2004), planteamos investigar la repercusión de diferentes manipulaciones en el perfil lipídico de la dieta en el modelo de colitis experimental por DSS. Es difícil buscar un equilibrio o relación ideal entre el ácido monoinsaturado oleico  $\omega 9$  y los poliinsaturados  $\omega 6$  y  $\omega 3$ , pero sí se conoce que el primero

debe ser el más abundante, que el ácido linoleico debe disminuir acusadamente y que los ácidos  $\omega 3$  deben estar en cantidades superiores en relación a las que se ingieren actualmente en la dieta occidental. Para conseguir este objetivo y ensayar su posible efecto antiinflamatorio intestinal, diseñamos tres dietas (C, O y  $\omega$ ) con distintas relaciones entre los ácidos grasos insaturados  $\omega 6$ ,  $\omega 9$  y  $\omega 3$ . Todas las dietas presentaban el mismo contenido en grasa saturada, con el objeto de asegurarnos de que cualquier efecto observado fuese como consecuencia de la modificación en el perfil de los ácidos grasos insaturados. La principal diferencia entre las 3 dietas fue su contenido en ácido oleico (18:1  $\omega 9$ ), ácido linoleico (18:2  $\omega 6$ ), ácido linolénico (18:3  $\omega 3$ ), ácido eicosapentaenoico (20:5  $\omega 3$ ) y ácido docosahexaenoico (22:6  $\omega 3$ ):

- dieta C: basada en aceite de soja, en la que las relaciones  $\omega 6/\omega 9$  y  $\omega 6/\omega 3$  eran altas dado su alto contenido en ácido linoleico.
- dieta O: basada en aceite de oliva virgen, que presentaba una relación  $\omega 6/\omega 9$  menor, reflejo del bajo contenido en ácido linoleico y alto en oleico. El ácido linolénico derivado de la soja también se vio reducido, lo que mantuvo una relación  $\omega 6/\omega 3$  semejante a la dieta C ( $\sim 15$ ).
- dieta  $\omega$ : basada en aceite de oliva y de pescado, con una relación  $\omega 6/\omega 9$  y  $\omega 6/\omega 3$  baja. La proporción entre los AGPI  $\omega 6$  y  $\omega 3$  estuvo determinada por el aumento del contenido en ácidos grasos  $\omega 3$  EPA y DHA, a pesar de la disminución de ácido linolénico de la soja, y la reducción en ácido linoleico. Además mantuvo la relación  $\omega 6/\omega 9$  de la dieta O gracias a su contenido en aceite de oliva.

El perfil plasmático, hepático y colónico de ácidos grasos no se vio modificado como consecuencia del proceso inflamatorio inducido por el DSS, indicando que la absorción lipídica no se encuentra comprometida tras el daño intestinal. Sin embargo, el consumo de las distintas dietas sí que determinó, tanto en los animales no colíticos como colíticos, un cambio significativo en el perfil lipídico de estos tejidos, indicando así la absorción e incorporación de los ácidos grasos presentes en ellas.

### **1.1. Efecto antiinflamatorio de la dieta enriquecida en aceite de oliva: dieta O (relación AGPI $\omega$ 6/ $\omega$ 9 baja).**

El aceite de oliva es consumido ampliamente en las regiones mediterráneas mostrando grandes beneficios en la salud, con un importante papel en la modulación de las respuestas inmune e inflamatoria (Yaqoob, 1998).

El ácido oleico, ácido graso monoinsaturado, es el principal componente del aceite de oliva, aunque hay que destacar la presencia de un amplio grupo de compuestos polifenólicos (Tuck y Hayball, 2002), entre los que se encuentran potentes antioxidantes (Deiana *et al.*, 1999; Visioli *et al.*, 1995). Aún no se ha podido establecer si los efectos del aceite de oliva sobre la función inmune son como consecuencia de su composición en ácidos grasos, de sus componentes no lipídicos o de ambos. Un estudio realizado en animales mostró que el aceite de oliva y un aceite de girasol rico en oleico presentaron una actividad semejante en la respuesta inmune, indicando que al menos algunos de los efectos del aceite de oliva son debidos al ácido oleico (Jeffery *et al.*, 1996). No obstante, muchos de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva también han mostrado efectos antiinflamatorios importantes (Martinez-Dominguez *et al.*, 2001; Miles *et al.*, 2005).

A pesar de sus conocidas propiedades, poco se conoce sobre el papel del aceite de oliva en la inflamación intestinal, aunque se ha demostrado que el ácido oleico protege a las células de la musculatura intestinal humana de pacientes con EC del estrés oxidativo que caracteriza esta condición intestinal (Alzoghaibi *et al.*, 2003).

En el presente estudio, el tratamiento previo con la dieta O produjo un efecto antiinflamatorio tras la administración del DSS caracterizado macroscópicamente por una disminución en la relación peso/longitud colónica del 46% en comparación con los animales colíticos alimentados con dieta C. Este efecto se asocia con una mejora de la citoarquitectura de la mucosa colónica, ya que la mayoría de los animales tratados con dieta O mostraron una restauración del epitelio intestinal con presencia de una hiperplasia de las células basales de las criptas, indicando un proceso de recuperación, aunque con

cierta depleción de las células caliciformes. El infiltrado de la lámina propia fue de tipo focal formado principalmente por linfocitos y macrófagos, que incluía también polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos en las zonas donde sí se observó ulceración. La submucosa y la capa muscular no presentaron ni vascularización ni edema, y sólo se vieron afectadas de forma focal como una extensión de una zona de ulceración.

Esta actividad antiinflamatoria intestinal se pudo constatar bioquímicamente por una mejora en el estado oxidativo de este órgano, así como por una disminución de la expresión colónica de iNOS; sin embargo, no se vieron modificados ni las actividades MPO y AP ni los niveles de LTB<sub>4</sub> y TNF $\alpha$  colónicos.

La restauración de los niveles de GSH logrados tras la administración de la dieta O a los animales colíticos demuestra las propiedades antioxidantes atribuidas a los diferentes componentes del aceite de oliva (Nieto *et al.*, 2002; Owen *et al.*, 2000; Stark y Madar, 2002). Esta actividad puede desempeñar un papel clave en el efecto antiinflamatorio intestinal de la dieta O, ya que una situación de estrés oxidativo intestinal es una característica común compartida por la EII en humanos (Grisham, 1994; McKenzie *et al.* 1996) y por diferentes modelos de colitis experimental en ratas, incluyendo el del TNBS (Galvez *et al.*, 2001; Sanchez de Medina *et al.*, 1996) y el del DSS (Stucchi *et al.*, 2000), siendo además un importante mecanismo de daño tisular durante la inflamación crónica intestinal. La reducción en la expresión de iNOS en relación al grupo control alimentado con dieta, también puede estar asociado con las propiedades antioxidantes antes mencionadas, dada la relación establecida previamente entre el estrés oxidativo y el aumento en la expresión de iNOS (Hecker *et al.*, 1996). La consecuencia final de esta intervención dietética sería la disminución de la producción y liberación de dos mediadores proinflamatorios importantes en EII, los metabolitos reactivos del oxígeno y nitrógeno.

Por último, la dieta O no disminuyó los niveles de LTB<sub>4</sub>, lo que confirma la hipótesis de que el factor crítico que altera la biosíntesis de eicosanoides no es la cantidad absoluta de AGPI  $\omega$ 6 y  $\omega$ 3 ingerida, sino la adecuada relación entre ellos. La dieta O presentaba unas cantidades de ácido linoleico muy inferiores a las de la dieta C como consecuencia de su contenido en aceite de oliva. Sin embargo, la relación  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 no se

veía modificada con respecto a la dieta C, por lo que no existe competición por las enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides.

La determinación de los ácidos grasos en hígado, plasma y colon mostró un perfil lipídico semejante al de la composición de su dieta, caracterizado por una disminución del ácido graso  $\omega 6$  linoleico y un aumento del ácido oleico, dando lugar a una relación  $\omega 6/\omega 9$  baja y manteniéndose la proporción  $\omega 6/\omega 3$  presentada en los tejidos de los animales que recibieron la dieta C.

### **1.2 Efecto antiinflamatorio de la dieta enriquecida en aceite de pescado: dieta (relación $\omega 6/\omega 9$ y $\omega 6/\omega 3$ baja).**

Varios estudios epidemiológicos realizados en la población esquimal han mostrado una menor incidencia de EII en relación con la occidental, indicando así el importante papel protector del consumo de AGPI  $\omega 3$  en la dieta (Belluzzi, 2000). Su importancia se ve reforzada por el hecho de que pacientes con desórdenes intestinales crónicos, como la EII, presentan unos niveles plasmáticos AGPI alterados frente a los sujetos normales (Esteve-Comas *et al.*, 1992; 1993). Aunque los resultados obtenidos del tratamiento de la EII con AGPI  $\omega 3$  en ensayos clínicos son conflictivos, probablemente debido a discrepancias en la selección de pacientes, tipo de formulación o las dosis empleadas en los diferentes protocolos (Belluzzi, 2004), la mayoría de ellos apuntan a la existencia de la efectividad de estos ácidos grasos en la terapia de la CU y EC. Esto se ve ratificado por los efectos beneficiosos mostrados tras la administración de AGPI  $\omega 3$  en diferentes modelos experimentales de inflamación intestinal en rata, inducido por ácido acético (Campos *et al.*, 2002), TNBS (Nieto *et al.*, 2002; Yuceyar *et al.*, 1999; Andoh *et al.*, 2003), o DSS (Shimizu *et al.*, 2001).

Las propiedades antiinflamatorias de los AGPI  $\omega 3$  en estos procesos intestinales están asociadas con su capacidad para competir con los AGPI  $\omega 6$  en la producción de mediadores inflamatorios lipídicos, inhibiendo la producción de varios de carácter proinflamatorios, incluidos los eicosanoides como el  $\text{LTB}_4$ ,  $\text{TXA}_2$ , o  $\text{PGE}_2$  (Gil, 2002). Asimismo, la incorporación de ácidos grasos de la dieta en los fosfolípidos de las



membranas celulares no sólo influye en la producción de eicosanoides, también interviene en la modulación de procesos de señalización intracelular relacionados con segundos mensajeros o vías de transducción, como los receptores PPAR, las MAP kinasas, modificando la expresión genética (Calder, 2003) y por tanto la respuesta inflamatoria.

Existen dos vías a través de las cuales los AGPI  $\omega 3$  son incorporados a los lípidos celulares: 1. su síntesis a partir de su ácido graso esencial precursor, el ácido linolénico; 2. la deposición en el tejido tras su captación de la circulación desde las lipoproteínas o los complejos de ácidos grasos con albúmina. Aunque la conversión de ácido linolénico en los distintos AGPI  $\omega 3$  es importante para mantener unos niveles constantes de EPA y DHA, la síntesis de estos ácidos grasos desde su precursor C18 es un proceso limitado (Burdge y Calder, 2005). Por ello, para lograr una dieta con una relación  $\omega 6/\omega 3$  baja, principalmente entre AA y EPA, decidimos la incorporación directa de EPA Y DHA a través de su suplementación con aceite de pescado, en vez de con ácido linolénico.

Numerosos estudios han establecido una relación entre los AGPI  $\omega 6$  y el desarrollo y empeoramiento de la inflamación intestinal (Andoh *et al.*, 2003; Shoda *et al.*, 1996), probablemente como consecuencia tanto de ser precursores de eicosanoides de carácter proinflamatorio, aumentar los niveles de citocinas proinflamatorias (Nielsen *et al.*, 2005) o incluso activar el factor de transcripción NF $\kappa$ B (Camandola *et al.*, 1996). Estos datos apoyan el efecto positivo que una reducción del consumo de estos ácidos grasos podría tener en este tipo de enfermedades. No obstante, no es la cantidad absoluta la que está directamente implicada en sus efectos sino la relación  $\omega 6/\omega 3$  (Simopoulos, 2002), ya que ambos tipos de AGPI compiten por las mismas enzimas para producir los diferentes mediadores lipídicos inflamatorios (Gil, 2002). Actualmente, a pesar de que las autoridades nutricionales recomiendan una dieta con una relación  $\omega 6/\omega 3$  de aproximadamente 4:1, las poblaciones occidentales muestran un consumo de AGPI  $\omega 6$  del orden de 15 a 20 veces mayor que el de  $\omega 3$  (Simopoulos, 2002).

Dos hechos fundamentales influyeron en la elección de la proporción de aceite de pescado con la que debíamos suplementar la dieta:

- asegurar la incorporación tanto de EPA como de DHA en los diferentes tejidos, teniendo en cuenta la ingesta media de cada animal.
- reducir al máximo el contenido de aceite de pescado para evitar su problema de oxidación debido a la alta reactividad de los dobles enlaces de los ácidos grasos que contiene, aunque garantizando una relación  $\omega 6/\omega 3$  acorde con las recomendaciones.

Para ello, realizamos estudios preliminares con dos dosis distintas, de 4 mg de EPA y 2 mg de DHA, y otra del doble de la anterior. Puesto que la menor dosis permitió la incorporación de EPA y DHA en los tres tejidos analizados, plasma, hígado y colon, fue la seleccionada para llevar a acabo el resto de los ensayos y así evitar los problemas de enranciamiento probablemente asociados a dosis más altas. Aunque el contenido en aceite de pescado es más bajo que el empleado en algunos estudios previos (Nieto *et al.*, 2002), es suficiente para modificar la relación  $\omega 6/\omega 3$  en la dieta y en los tejidos de la rata. La proporción en ácidos grasos en los distintos tejidos fue similar al mostrado por la composición de la dieta, caracterizado por una relación  $\omega 6/\omega 3$  baja como consecuencia del aumento en EPA y DHA así como de la reducción del ácido linoleico, y una proporción  $\omega 6/\omega 9$  semejante a la dieta O, por su contenido en aceite de oliva.

La actividad antiinflamatoria intestinal mostrada por la dieta  $\omega$  fue superior al de la dieta O, lo que demuestra la importancia de la modulación de la relación  $\omega 6/\omega 3$  más que simplemente la reducción de los niveles de AGPI  $\omega 6$ . Esta observación concuerda con la derivada de un estudio sobre la administración parenteral de emulsiones lipídicas con diferentes proporciones en ácidos grasos  $\omega 3$  en ratas con colitis inducida por ácido acético (Campos *et al.*, 2002).

El efecto beneficioso del tratamiento con dieta  $\omega$  se manifestó por una mejora en los parámetros de carácter general: una menor incidencia de diarrea, sangre en heces y pérdida de peso de los animales, que resultó en un descenso significativo de los valores del IAE únicamente durante el período de ingestión del DSS al 2%. Esto indica que no logró prevenir la aparición de colitis, pero sí su mejora una vez establecida.

Esta propiedad antiinflamatoria se asoció con una reducción significativa de la relación peso/longitud colónica en comparación con los animales tratados con dieta C, sin mostrar diferencias con los datos obtenidos de la administración de la dieta O. La recuperación del daño causado mostrada por la dieta  $\omega$  fue muy evidente histológicamente con respecto a la dieta C y O, observándose únicamente un infiltrado de carácter focal en la lámina propia. Esta gran disminución del infiltrado leucocitario también se puso de manifiesto bioquímicamente por una reducción de la actividad MPO.

Desde el punto de vista bioquímico, la mejoría del proceso colítico mostrada por la dieta  $\omega$  se caracterizó por un restablecimiento de los niveles de GSH y una reducción en la expresión de iNOS colónicos. Así, la depleción de GSH se vio contrarrestada en un 85% y la disminución de los niveles de iNOS fue de un 47%.

La normalización de los valores de GSH y el descenso de los niveles de la enzima iNOS en la misma medida que en la dieta enriquecida en aceite de oliva, conduciría a pensar que se le pueden atribuir estos efectos a este aceite, dado su contenido en la dieta . Sin embargo, no se puede descartar una acción directa de los AGPI  $\omega$ 3 en la expresión de iNOS, ya que se ha determinado la inhibición del factor de transcripción NF $\kappa$ B por parte de estos ácidos grasos (Lo *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004), factor implicado en la regulación de su síntesis (Xie *et al.*, 1994). Además, los AGPI  $\omega$ 3 actúan como agonistas de los receptores PPAR (Krey *et al.*, 1997), cuya activación está relacionada con un efecto antiinflamatorio (Cabrero *et al.*, 2002); de hecho se ha establecido que ligandos del receptor PPAR- $\gamma$  son capaces de disminuir la expresión de esta enzima (Li *et al.*, 2000). Estos receptores han sido implicados en la represión de la actividad de los factores de transcripción claves en la inflamación AP-1 y NF $\kappa$ B (Glass y Ogawa, 2006; Ricote *et al.*, 1998). Este efecto de los AGPI  $\omega$ 3 sobre distintos factores de transcripción podría estar relacionado con la inhibición de la producción de TNF $\alpha$  colónico observada. Así, numerosos estudios *in vitro* han demostrado que las propiedades antininflamatorias atribuidas a emulsiones de aceite de pescado ricas en AGPI  $\omega$ 3 son ejercidas principalmente a través de la reducción de la expresión de TNF $\alpha$  por macrófagos,

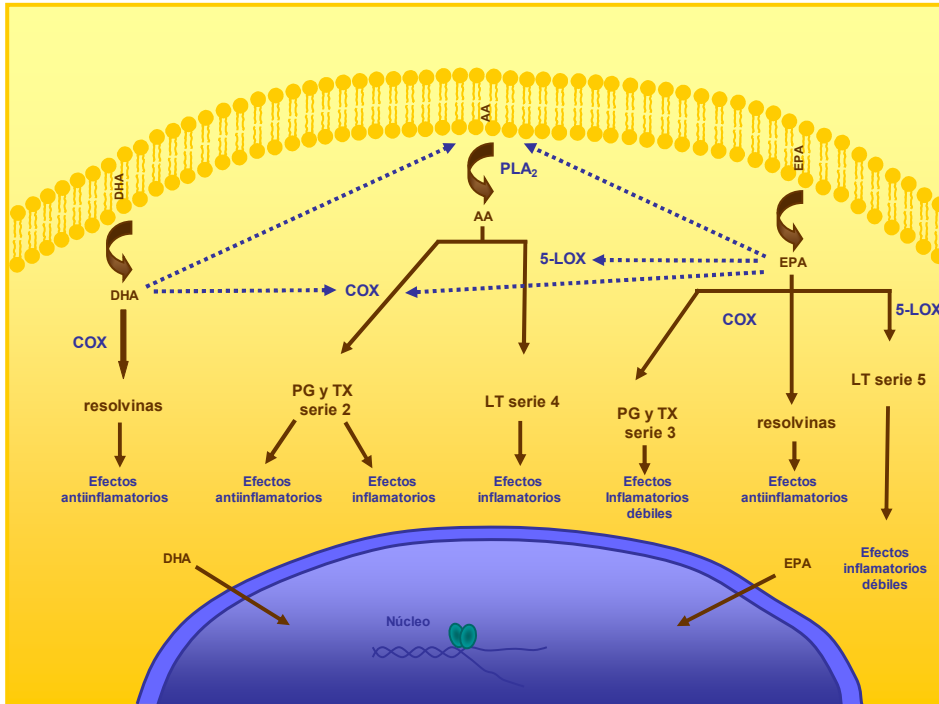
relacionada con la inhibición de la cascada de transducción del NFκB (Lo *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004).

El descenso significativo en los niveles de LTB<sub>4</sub> colónicos generado por la dieta está de acuerdo con observaciones previas tanto en humanos como en modelos experimentales de colitis (Stenson *et al.*, 1992; Nieto *et al.*, 2002). Los efectos de los AGPI ω<sub>3</sub> se han considerado que son consecuencia principalmente de su incorporación a los fosfolípidos de las membranas celulares, compitiendo con el ácido araquidónico como sustrato inicial para la producción de eicosanoides (Calder, 2005).

AA y EPA son los principales precursores de eicosanoides tras ser hidrolizados de la posición 2 de los fosfolípidos de membrana por la enzima PLA<sub>2</sub> cuando las células reciben ciertos estímulos. Ambos ácidos grasos son sustrato tanto para la COX como para la 5-LOX, estableciéndose una competición por tales enzimas para la síntesis de eicosanoides (Figura 55). Se ha descrito que la suplementación de la dieta en aceite de pescado provoca un descenso en la producción de eicosanoides de la serie 2 y 4 y un aumento en los de la serie 3 y 5 por células inflamatorias (Calder, 2005). En general, los eicosanoides sintetizados a partir de la familia de AGPI ω<sub>3</sub> presentan una escasa actividad proinflamatoria frente a los derivados de la familia ω<sub>6</sub>, por tanto, la proporción AA/EPA determina el tipo y la cantidad de estos mediadores en el organismo, y en consecuencia el tipo de respuesta.

El LTB<sub>4</sub> es un potente agente quimiotáctico que induce la adherencia de neutrófilos a la pared vascular y potencia los efectos de otros mediadores como el factor activador de plaquetas promoviendo la migración de neutrófilos a través de la monocapa endotelial con el consecuente daño tisular como resultado de su actividad celular (Foell *et al.*, 2003) así como aumentando la permeabilidad vascular mesentérica (Kubes *et al.*, 1991). De hecho, la síntesis de LTB<sub>4</sub> se encuentra aumentada en la mucosa colónica de pacientes con CU y EC (Sharon y Stenson, 1984), de forma que su inhibición puede contribuir al efecto terapéutico ejercido por diferentes fármacos como la sulfasalazina y el 5-ASA empleados en el tratamiento de la EII (Travis y Jewel, 1994). Por todo ello, la inhibición en la síntesis

de LTB<sub>4</sub> podría estar implicada en el efecto beneficioso ejercido por el consumo dietético de AGPI ω3 en este modelo de colitis experimental.



**Figura 55.** Mecanismos antiinflamatorios de los AGPI ω3, derivados principalmente del metabolismo de eicosanoides.

Analizando globalmente podemos establecer que el efecto beneficioso demostrado por la dieta con proporciones en AGPI ω6/ω3 y ω6/ω9 bajas podría ser consecuencia de la participación de diferentes mecanismos que pueden actuar sinérgicamente para mejorar el daño colónico inducido por DSS destacando:

- actividad antioxidante, probablemente relacionada con su contenido en aceite de oliva.
- inhibición de mediadores proinflamatorios como eicosanoides, NO y citocinas.

Esto puede ser de gran interés ya que en la mayoría de los estudios *in vivo* dirigidos a determinar la actividad antiinflamatoria intestinal de los AGPI presentes en el

aceite de pescado, se ha establecido una asociación entre este efecto y una reducción en la producción de LTB<sub>4</sub>, ofreciendo una escasa información con respecto a otros mediadores proinflamatorios también implicados en la respuesta inmune en la EII.

## **2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL FLAVONOIDE QUERCITRINA EN LA COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR DSS EN RATAS.**

Una vez demostrado el efecto antiinflamatorio intestinal de la dieta enriquecida en aceite de pescado, se planteó el problema de la alta susceptibilidad de los AGPI  $\omega$ 3 a la oxidación, lo cual tiene como consecuencia no sólo la aparición de enranciamiento, sino también la pérdida de actividad. Por tanto, persiguiendo la finalidad de esta tesis, que es la creación de un posible alimento funcional, planteamos la utilización de un antioxidante que cumpliera un doble objetivo:

- prevenir la peroxidación lipídica de la dieta .
- presentar una actividad antiinflamatoria *per se*.

Buenos candidatos pueden ser los flavonoides, productos naturales dotados de distintas actividades biológicas, principalmente relacionadas con su capacidad de inhibir actividades enzimáticas o con sus propiedades antioxidantes, habiéndose también descrito que son capaces de modular la respuesta inmune (Middleton *et al.*, 2000). Estas actividades podrían justificar el que los flavonoides puedan ser considerados como fármacos potencialmente aplicables en el tratamiento farmacológico de la EII. De hecho, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado la eficacia de distintos flavonoides, como la quercitrina, la rutina, la diosmina, la hesperidina y la morina, en el modelo de colitis experimental en ratas del TNBS (Crespo *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 1998; Galvez *et al.*, 2001; Sanchez de Medina *et al.*, 1996). Aunque el mecanismo de acción de los flavonoides para ejercer el efecto antiinflamatorio intestinal no es conocido con exactitud, una característica común en todos los casos estudiados es su capacidad de mejorar el estado oxidativo colónico que caracteriza al proceso inflamatorio

intestinal, probablemente relacionada con sus bien conocidas propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres atribuidas a estos compuestos. No obstante, mecanismos adicionales puedan contribuir probablemente en sus efectos beneficiosos. En este sentido, se ha podido comprobar que la morina disminuye la producción de mediadores involucrados en la respuesta inmune, tales como citocinas (IL-1 $\beta$ ) y NO (Galvez *et al.*, 2001). Recientemente, se ha descrito que los efectos de la quercitrina en la colitis crónica experimental inducida con TNBS pueden resultar de una inhibición en los procesos iniciales de la cascada inflamatoria, que se asocia con una mejora en las alteraciones del transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa colónica (Sanchez de Medina *et al.*, 2002b).

El objetivo de esta parte de la tesis fue estudiar con mayor profundidad los mecanismos responsables del efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina de nuevo en el modelo de colitis experimental del DSS en ratas, y ratificar que se trata de una candidata apropiada para ser asociada con una dieta enriquecida en AGPI  $\omega$ 3.

De todos los estudios realizados por nuestro grupo de investigación en relación a la actividad antiinflamatoria intestinal de distintos flavonoides, sin duda fue la quercitrina, heterósido de la quercetina, la que presentó la mayor eficacia a dosis muy bajas. Tras evaluar su efecto preventivo en el proceso colítico, los mejores resultados se obtuvieron con la administración de 1 mg/kg. Por ello, este flavonoide constituye un buen candidato para la terapia de la EII, aún más si consideramos la baja toxicidad asociada al consumo de este tipo de productos, que se encuentran presentes en la dieta en cantidades significativas (Middleton *et al.*, 2000).

Así, nos planteamos el estudio del efecto de la quercitrina a la dosis de 1 mg/kg en un proceso de colitis ya establecida, para evaluar su actividad desde el punto de vista curativo, puesto que la administración oral del flavonoide se inició tras los cinco días en los que las ratas recibieron DSS al 5%.

La administración diaria de quercitrina por vía oral inhibió de forma significativa la progresión del proceso inflamatorio intestinal inducido por la ingestión del DSS en las ratas, tal y como observó clínicamente por una menor pérdida del peso corporal de los

animales, una reducción en la incidencia de diarrea y pérdida de sangre. Este efecto beneficioso sobre la lesión colónica fue también demostrado histológicamente por una preservación en la citoarquitectura intestinal gravemente afectada por el proceso inflamatorio inducido con el DSS. Esto se puso de manifiesto por una reducción del grado de ulceración de la mucosa así como de infiltrado inflamatorio en la lámina propia y submucosa, en contraposición con la afectación casi total en los animales control. Además, las criptas mostraron una estructura prácticamente normal, con las células caliciformes repletas de moco, a diferencia de la pérdida casi total de éstas observada en el grupo colítico no tratado.

Los resultados obtenidos a partir de los distintos ensayos bioquímicos realizados con las muestras de tejido colónico nos informan sobre los mecanismos involucrados en el efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por la quercitrina. Así, el efecto beneficioso de la quercitrina puede estar relacionado con una inhibición en la generación de radicales libres, como consecuencia de la capacidad antioxidante descrita tanto para la quercitrina como para su genina la quercetina, en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Bors *et al.*, 1990; Galvez *et al.*, 1994). De hecho, estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han demostrado que las propiedades antioxidantes y/o captadoras de radicales libres de la quercitrina podría contribuir en los efectos beneficiosos ejercidos por este flavonoide en las fases iniciales del daño colónico inducido con el TNBS (Sanchez de Medina *et al.*, 1996; Sanchez de Medina *et al.*, 2002b). Análogamente, en el presente estudio, el tratamiento con quercitrina a ratas sometidas a colitis experimental con DSS fue capaz de contrarrestar la depleción del contenido en glutatión que tiene lugar en los animales del grupo colítico sin tratamiento. Este efecto antioxidante puede igualmente colaborar en la menor infiltración de neutrófilos que se genera en respuesta a la administración del DSS, tal y como se ha demostrado bioquímicamente por una reducción en la actividad MPO colónica, y que se confirma en los estudios histológicos. Así, la técnica de inmunofluorescencia indirecta mostró la importante existencia de polimorfonucleares neutrófilos en el infiltrado inflamatorio presente en el tejido intestinal, la cual se vio reducida gracias a la administración de quercitrina a los animales colíticos. Estas células constituyen una población leucocitaria que, aunque actúa como primera línea de defensa en las respuestas



inflamatorias agudas, también contribuye de forma importante en procesos crónicos como la EII (Caradonna *et al.*, 2000; Vainer *et al.*, 2000). Se trata de células muy activas, capaces de sintetizar numerosos mediadores en respuesta a estímulos inflamatorios y durante ciertas condiciones patológicas. Así, son productores de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 y de NO tras la inducción de la isoforma iNOS (Kasama *et al.*, 2005, Wheeler *et al.*, 1999). Además, los neutrófilos son capaces de liberar grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno, como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo e iones hipocloritos, que pueden dañar la matriz extracelular y son tóxicos para las células. La generación de radicales libres se ha propuesto que es clave en las fases tempranas del proceso inflamatorio intestinal, contribuyendo de forma decisiva en la patogénesis de la EII (Pavlick *et al.*, 2002), participando en los procesos iniciales relacionados con la infiltración de neutrófilos en la mucosa colónica inflamada. El reclutamiento y la posterior activación de estas células generan una producción masiva de radicales libres que supera a los mecanismos antioxidantes tisulares de carácter protector, dando lugar a una situación de estrés oxidativo, responsable en gran medida del mantenimiento de la inflamación colónica (Grisham, 1994). Por tanto, una rápida inhibición en la generación de radicales libres podría contribuir a una reducción en la infiltración de neutrófilos en el tejido inflamado, protegiéndolo del proceso inflamatorio. No obstante, es importante resaltar que la quercitrina puede disminuir la infiltración leucocitaria mediante la inhibición en la producción de otros mediadores con actividad quimiotáctica, dada la bien conocida capacidad de los flavonoides de modular la respuesta inmune gracias a sus propiedades inhibitoras de distintas actividades enzimáticas, como las relacionadas con el metabolismo del AA (Middleton *et al.*, 2000). Sin embargo, se puede descartar que la inhibición del flavonoide sobre la producción de LTB $_4$  contribuya en su efecto antiinflamatorio intestinal, dado que no se observó efecto significativo alguno sobre la producción colónica de este eicosanoide tras el tratamiento con quercitrina de los animales colíticos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos en los que demostramos que no existía una relación entre la capacidad de la quercitrina de inhibir la producción de LTB $_4$  y su efecto antiinflamatorio en la fase aguda del modelo de colitis experimental con TNBS (Sanchez de Medina *et al.*, 1996).

En relación al TNF $\alpha$ , tanto los ensayos bioquímicos como de inmunohistoquímica mostraron que el tratamiento con quercitrina redujo de forma significativa sus niveles colónicos. Esta citocina, además de desempeñar una función básica en los estadios iniciales del proceso inflamatorio, actúa amplificando esta respuesta al estimular la producción de otros mediadores y participando de manera importante en el proceso crónico característico de la EII. Es tan importante el papel que desempeña el TNF en la inflamación intestinal que ha promovido la investigación y desarrollo de compuestos capaces de bloquear las acciones de esta citocina. Estas investigaciones han conducido a la comercialización de un anticuerpo monoclonal quimérico frente al TNF, el infliximab (Chey, 2001; Rutgeerts *et al.*, 1999; Targan *et al.*, 1997). Análogamente, se están investigando otros compuestos con capacidad de inhibir la producción de esta citocina, como es el caso de la talidomida, que ha mostrado su efectividad en la EII en humanos (Ehrenpreis *et al.*, 1999; Vasiliauskas *et al.*, 1999). Por ello, la importante inhibición de la producción de TNF $\alpha$  mostrada por la quercitrina, puede constituir un mecanismo fundamental en su efecto antiinflamatorio intestinal.

Para comprobar si los efectos beneficiosos ejercidos por la quercitrina en el modelo de colitis con DSS podrían estar relacionados con un efecto sobre la producción colónica de NO, se valoró la actividad NOS y la expresión de su isoforma inducible, tanto por técnicas de Western blot como de inmunohistoquímica, en los diferentes grupos experimentales ensayados. La administración de quercitrina a los animales colíticos disminuyó significativamente la actividad NOS incrementada, al mismo tiempo que redujo la expresión de la iNOS, sin afectar a la isoforma eNOS.

En principio, la menor actividad NOS podría también estar relacionada con una inhibición directa de esta enzima por parte del flavonoide, dada la capacidad de estos compuestos polifenólicos de inhibir distintas actividades enzimáticas, incluida la actividad NOS (Middleton *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando se utilizaron como fuente de actividad NOS homogenados de colon inflamado de ratas colíticas que recibieron DSS al 5% (p/v) durante 5 días, tanto la quercitrina como su genina quercetina, liberada al lumen intestinal *in vivo*, presentaron sólo una débil inhibición (Camuesco *et al.*, 2004). Estos resultados

conuerdan con un estudio *in vitro* realizado con distintos flavonoides en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 que demuestra que, tanto la quercetina como sus heterósidos, carecen de un efecto inhibitor directo sobre la actividad iNOS (Kim *et al.*, 1999). Por tanto, y de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el efecto mostrado por la quercitrina está probablemente más relacionado con un efecto inhibitor sobre la expresión de esta enzima, aumentada como consecuencia del proceso inflamatorio colónico.

Finalmente, el tratamiento con quercitrina disminuyó, con respecto a los animales colíticos no tratados, la presencia de macrófagos en el tejido colónico, limitándose a aquellas zonas en las que existía un mínimo infiltrado local. Esta reducción constituye un mecanismo importante en la actividad antiinflamatoria intestinal presentada por el flavonoide, dada la gran importancia de estas células en este proceso (Caradonna *et al.*, 2000; Vainer *et al.*, 2000). Durante la EII activa existe un gran aumento de macrófagos en la mucosa intestinal derivados de monocitos que abandonan el torrente sanguíneo. Estos macrófagos reclutados son fenotípicamente diferentes a la población de células residentes y juegan un papel esencial en la modulación de la inflamación crónica intestinal presente en los enfermos de CU y EC. Así, secretan citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, y TNF , al igual que los neutrófilos son células implicadas en la producción de metabolitos reactivos del oxígeno y el nitrógeno, y liberan proteasas responsables de la degradación de la matriz extracelular (Mahida, 2000). Además, constituyen la principal población celular implicada en la presentación de antígenos en la mucosa intestinal, con la capacidad de determinar el tipo de respuesta de las células T desarrollada por los antígenos lumbinales.

El importante descenso en la producción de TNF $\alpha$  así como de la expresión de la isoforma iNOS observado tras el tratamiento con quercitrina de los animales colíticos podría ser como consecuencia de la disminución de la presencia de neutrófilos y macrófagos, puesto que son importantes productores de tales mediadores proinflamatorios; sin embargo, probablemente también podría ser el resultado de una disminución en su síntesis, como establecen los resultados de los ensayos *in vitro*.

En conclusión, el presente estudio ha permitido poner de manifiesto el efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina en un proceso colítico establecido tras la administración de DSS, corroborando el efecto beneficioso demostrado previamente por nuestro grupo de investigación (Camuesco *et al.*, 2004; Sanchez de Medina *et al.*, 2002b). Probablemente, las propiedades antiinflamatorias intestinales de la quercitrina estén relacionadas con su actividad antioxidante y captadora de radicales libres, de forma similar a lo descrito para otros fármacos de reconocida eficacia en el tratamiento de estas patologías intestinales, como son los derivados del ácido 5-aminosalicílico (Keshavarzian *et al.*, 1990; Grisham *et al.*, 1994). Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismos relacionados con la modulación de la respuesta inmune. Así, la quercitrina es capaz de reducir la migración leucocitaria y la producción por parte de estas células de mediadores proinflamatorios, limitando así un proceso de retroalimentación. Es difícil establecer la secuencia en la que el flavonoide ejerce tales efectos. Por una parte, se ha comprobado que la quercetina es capaz de disminuir la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos (Liu *et al.*, 2005), lo que conduciría a una reducción de su migración extravascular a los lugares de inflamación y, como consecuencia, a una menor producción de mediadores. Por el contrario, también se podría establecer que, debido a su acción antioxidante y a la inhibición de la síntesis de agentes quimiotácticos, como el TNF , que desempeñan un papel clave en el reclutamiento de leucocitos hacia el foco inflamatorio, se produzca una disminución de la presencia de éstos formando parte del infiltrado en el tejido intestinal. Probablemente se trate de la conjunción de varios procesos simultáneos que determinan la potente actividad antiinflamatoria intestinal de la quercitrina.

Los buenos resultados obtenidos de este estudio *in vivo* nos llevaron a profundizar en el mecanismo de acción de este flavonoide, para lo cual se desarrollaron distintos experimentos *in vitro* con el fin de facilitar el estudio de las posibles vías de señalización sobre las que podría actuar.

### **Ensayos *in vitro***

Varias fueron las causas que nos llevaron a elegir a los macrófagos para la realización de los ensayos *in vitro*:

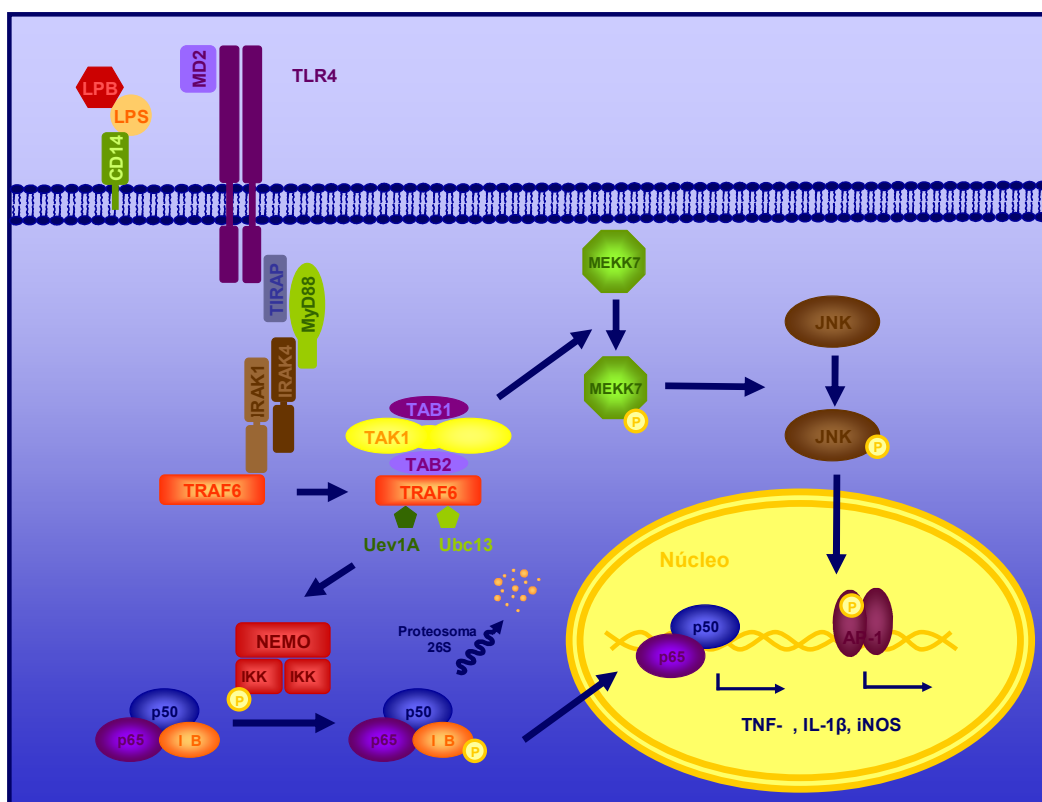
- es un tipo celular muy implicado en el proceso inflamatorio desarrollado en la EII (Mahida, 2000; Grip *et al.*, 2003).
- los ensayos de inmunohistoquímica mostraron su papel fundamental en el modelo de colitis experimental empleado en esta tesis.
- son importantes productores de TNF $\alpha$  y de NO (Mahida, 2000), mediadores sobre los que la quercitrina presentó un claro efecto inhibitor.

En nuestros estudios utilizamos macrófagos derivados de médula ósea de ratón, que muestran numerosas ventajas con respecto a las líneas celulares: son cultivos primarios, no transformados, que presentan una maquinaria intacta y responden a la presencia de factores que inducen su diferenciación y activación (Xaus *et al.*, 2001). Los macrófagos fueron obtenidos a partir de células pluripotenciales de médula ósea de fémur de ratón, en las que se indujo una diferenciación hacia este tipo celular gracias a su incubación con el factor estimulador de colonias de macrófagos M-SCF durante 5-6 días. Tras ese período de tiempo, las células alcanzaron un estado de semiconfluencia y fueron activadas con LPS para la realización de los distintos experimentos.

El LPS, un glicolípido complejo también conocido como endotoxina, es uno de los principales componentes estructurales de la membrana exterior de las bacterias *Gram* negativas y de los más potentes desencadenantes de inflamación de origen microbiano (Cohen, 2002; Raetz, 1990). Los macrófagos primarios empleados en este estudio proliferan en presencia de factor de crecimiento específico M-CSF y, tras su activación con LPS, detienen su proliferación y adquieren un fenotipo activado caracterizado por la expresión de citocinas tempranas, como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y la producción de NO, así como distintos cambios morfológicos (Xaus *et al.*, 2001). De esta forma, a las 6h ya se detectó un aumento en la expresión de TNF $\alpha$  así como de la enzima iNOS, mientras que los niveles máximos de IL-1 $\beta$  se alcanzaron a las 12h tras la estimulación con LPS.

En la figura 56 se representa la vía de señalización que, tras la unión del LPS a su receptor, conduce a la activación de distintos factores de transcripción.

El LPS induce la activación de los macrófagos gracias a su interacción con el receptor de membrana TLR4, el cual pertenece a una familia denominada receptores tipo *toll* (TLR). Los TLRs son proteínas transmembrana que presentan una alta homología en la región citoplasmática con los receptores de la IL-1 (IL-1R) ya que ambos presentan unos dominios conservados denominados TIR (*Toll/IL-1R homology*).



**Figura 56.** Vía de señalización del receptor del LPS.

Para que se produzca el reconocimiento del LPS, y posterior señalización intracelular por parte del receptor TLR4, es necesario que el LPS se encuentre unido a una proteína sérica denominada LBP (*LPS-binding protein*) (Viriyakosol y Kirkland, 1995). La LBP es una proteína que circula por el torrente sanguíneo donde reconoce y forma un complejo de alta afinidad con el LPS. Su función parece ser la de facilitar la unión de la

endotoxina con el CD14, una glicoproteína que se encuentra anclada a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) en la membrana del macrófago (Ulevitch y Tobias, 1995). El CD14 facilita la transferencia del LPS a un complejo proteico que incluye al TLR4 y una proteína accesoria denominada MD-2. MD-2 actúa como una proteína adaptadora extracelular esencial en la activación de TLR4 por LPS y, a pesar de carecer de dominio transmembrana, se mantiene asociada a la célula a través de su interacción con un dominio extracelular del TLR4. Parece ser que el complejo TLR4/MD-2 es el responsable del reconocimiento directo de diferentes estructuras del LPS, que varían en función de la especie, proporcionando una alta especificidad al receptor (Akashi *et al.*, 2000; Shimazu *et al.*, 1999).

Una vez el LPS interacciona con todo el complejo proteico del receptor TLR4, se produce su dimerización y el posterior reclutamiento de una proteína adaptadora, MyD88. MyD88 se une al receptor a través de un dominio TIR, mientras que su interacción con la serina/treonina kinasa IRAK-4 (*IL-1 receptor-associated kinase*) se realiza gracias a un "dominio de muerte" (DD, *death domain*). Recientemente, se ha descrito una segunda molécula adaptadora, denominada TIRAP o Mal (*MyD88-adaptor-like*), que también es reclutada en el complejo TLR4/MD2 (Fitzgerald *et al.*, 2001).

IRAK-4 activa a IRAK-1 por fosforilación (Li *et al.*, 2002), de forma que, una vez fosforilada, puede disociarse del complejo receptor y asociarse con una nueva molécula adaptadora, TRAF6 (*TNF-receptor-activated factor 6*) (Cao *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1998). Tras su activación, TRAF6 interacciona, a través de TAB2, con la MAPKK kinasa TAK-1 (*Transforming growth factor-activated kinase 1*), que a su vez se encuentra asociada constitutivamente con su proteína adaptadora TAB1 (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Shirakabe *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1995). A continuación, IRAK-1 es degradada, mientras que TRAF6, TAK1, TAB1 y TAB2 forman un gran complejo con otras proteínas como las ligasas E2 Ubc13 y Uev1A (Deng *et al.*, 2000) que catalizan la síntesis de una cadena de poliubiquitina en TRAF6, dando lugar a la activación de TAK1 (Wang *et al.*, 2001). A este nivel, TAK-1 actúa como un activador común de dos grandes vías que conducen a la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1.

La activación del NFκB comienza con el agrupamiento de un complejo proteico denominado IKK (IκB kinasa) formado por homodímeros o heterodímeros de las kinasas IKKα y IKKβ, y por una subunidad reguladora IKKγ, también llamada NEMO (*NFκB essential modulator*). TAK-1 origina la fosforilación de IKK (Takaesu *et al.*, 2001) y, a su vez, este complejo fosforila residuos específicos de serina de los inhibidores fisiológicos de NFκB, en especial de IκBα, induciendo su poliubiquitación y degradación por el proteasoma 26S (Zingarelli *et al.*, 2003). La degradación proteolítica de IκB permite la translocación de NFκB al núcleo, donde regula la expresión de numerosos genes importantes en la respuesta inmune e inflamatoria, como los de citocinas, enzimas, moléculas de adhesión o proteínas implicadas en la presentación de antígenos (Schottelius y Baldwin, 1999; Zingarelli *et al.*, 2003).

La activación de TAK-1 puede también transmitir la señal iniciada por el LPS a través de la fosforilación de MKK7, una MAPKK que a su vez fosforila en residuos treonina y tirosina a JNK (Tournier *et al.*, 2001), proteína implicada en la activación del factor de transcripción AP-1. AP-1 está constituido por dímeros de proteínas pertenecientes a las familias Jun (c-Jun, JunB y JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) y ATF (ATFa, ATF-2 y ATF3) y, mientras que Jun forma homo y heterodímeros, las proteínas Fos son incapaces de homodimerizarse, y sólo establecen uniones estables con las proteínas Jun. Al igual que NFκB, AP-1 juega un papel importante en la activación transcripcional de genes implicados en la respuesta inflamatoria (Karin, 1995) viéndose aumentada como consecuencia de su fosforilación. Así, JNK tras ser activada se dirige hacia el núcleo (Karin, 1995), donde puede fosforilar a c-Jun (Cavigelli *et al.*, 1995) y ATF2 (Gupta *et al.*, 1995) aumentando sus actividades.

Dado que son muchos los estudios que confirman a las cascadas del NFκB y MAP kinasas como las dos principales vías de señalización involucradas en la producción de citocinas inflamatorias inducidas por LPS (Hambleton *et al.*, 1996; Krappmann *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1994; Scherle *et al.*, 1998), centramos nuestras investigaciones en ambas vías.

Tras comprobar cómo la estimulación de macrófagos con LPS producía un incremento significativo en la expresión tanto de las citocinas proinflamatorias TNF e IL-



1 $\beta$ , como de la enzima iNOS, el siguiente objetivo fue estudiar su posible inhibición por parte de la quercitrina, así como de su genina. Decidimos estudiar también la quercetina, puesto que estudios anteriores determinaron que probablemente es la auténtica molécula responsable de la actividad del heterósido.

Inicialmente se comprobó la ausencia de toxicidad por parte de ambos flavonoides así como del DMSO, disolvente que se utilizó como vehículo. Posteriormente, los resultados mostraron que la quercetina, pero no la quercitrina, inhibió tanto la producción como la expresión de las citocinas y redujo los niveles de iNOS inducida por LPS en los macrófagos, en concordancia con resultados previos (Blonska *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1999; Jung y Sung, 2004).

Los resultados paradójicos obtenidos de los ensayos *in vivo* e *in vitro* en relación a la inhibición de la producción de mediadores proinflamatorios por parte de la quercitrina, podrían tener una explicación de carácter farmacocinético. Así, los heterósidos de flavonoide como la quercitrina no son absorbidos en los segmentos más altos del tracto gastrointestinal, alcanzando intactos el colon, donde son hidrolizados por la microbiota intestinal liberando la genina quercetina (Manach *et al.*, 2004). Por lo tanto, la quercitrina actúa como un profármaco que permite el transporte y liberación de la genina en el lumen colónico ejerciendo su efecto antiinflamatorio local necesario para el tratamiento de la EII. Sin embargo, la quercetina es absorbida en el intestino delgado, lo que le impediría llegar hasta la última porción del intestino, región principalmente afectada en el modelo de colitis inducida por DSS.

En la literatura científica ha sido ampliamente descrita la regulación de la expresión de las citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y de la enzima iNOS tanto por el factor de transcripción NF $\kappa$ B (Collart *et al.*, 1990; Hiscott *et al.*, 1993; Shakhov *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1994) como por la vía de las MAP kinasas (Chan y Riches, 1998; Chen *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1993; Kontoyiannis *et al.*, 1999; Swantek *et al.*, 1997). Por ello, estudiamos tanto la activación de NF $\kappa$ B como la actividad JNK en respuesta a la estimulación por LPS, y su posible inhibición por la quercetina.

El estudio de la influencia de este flavonoide sobre la fosforilación de c-Jun mostró que no presentaba ningún tipo de actividad a este nivel, sugiriendo que la activación de JNK no participa en la inhibición de la expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOs mostrada por la quercetina en estas células. La vía de la MAP kinasa JNK, frente al resto de MAP kinasas (ERK y p38), fue la escogida para realizar este ensayo puesto que es la principal vía que regula los niveles de TNF $\alpha$  tras su inducción por LPS. Mientras que la actividad de JNK regula la transcripción de TNF afectando tanto a los niveles de mRNA como a su secreción, ERK y p38 regulan su producción principalmente a través de mecanismos postranscripcionales, sin afectar significativamente a los niveles del mensajero inducidos tras la estimulación con LPS (Comalada *et al.*, 2003).

En relación a la vía del NF $\kappa$ B, nos centramos en el estudio de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , inhibidor de este factor de transcripción, considerada un proceso clave en la activación de esta cascada (Figura 56). La quercetina presentó un claro efecto inhibitorio de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , indicando un bloqueo de la vía del factor de transcripción NF $\kappa$ B. Estos resultados coinciden con los obtenidos *in vivo* en los que el tratamiento oral de las ratas colíticas con quercitrina produjo también una inhibición de esta vía, activada como consecuencia del proceso inflamatorio intestinal inducido por DSS.

### **3. EFECTO DE LA ASOCIACIÓN DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON AGPI $\omega$ 3 Y QUERCITRINA EN LA COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR DSS EN RATAS.**

La última experiencia fue encaminada a valorar el efecto conjunto que podría ejercer el flavonoide en asociación con la dieta enriquecida en AGPI  $\omega$ 3.

Distintas causas nos llevaron a pensar en esta asociación como una posible estrategia para el tratamiento de la EII:

- los AGPI son especialmente susceptibles a su degradación por oxígeno, calor y luz (Lawton y Donaldson, 1991). Así, en ausencia de antioxidantes adecuados puede producirse un deterioro del alimento rico en estos ácidos grasos y una disminución de sus valores nutricionales, junto con un mayor riesgo de

peroxidación lipídica, de lo que se podría derivar un potencial daño celular. Por esta razón, la adición de un antioxidante al aceite de pescado prevendría su oxidación y posteriores consecuencias como enranciamientos, malos olores e inestabilidad. Además, inhibiría la peroxidación lipídica (Eritsland, 2000) y la producción de radicales libres producidos como consecuencia de unos niveles aumentados de EPA y DHA en plasma (Harats *et al.*, 1991) y en las membranas celulares (Palozza *et al.*, 1996) tras el consumo de aceite de pescado (Allard *et al.*, 1997; Sevanian y Hochstein, 1985).

- los suplementos dietéticos a base de aceite de pescado con dosis altas de AGPI  $\omega$ 3 están asociados con un sabor desagradable, que puede generar halitosis y otros efectos adversos gastrointestinales, resultando difícil la aceptación por parte del consumidor. La asociación con el flavonoide permitiría la incorporación de una menor cantidad de AGPI, lo que resultaría en una mejora de las características organolépticas del alimento.
- se ha descrito que la suplementación dietética con AGPI  $\omega$ 3 en pacientes con EII se asocia con un descenso en el sistema antioxidante colónico, provocando un daño oxidativo en el lugar de la inflamación (Nieto *et al.*, 1998), pudiendo ser la causa del fracaso de estas estrategias terapéuticas obtenido en algunos estudios. Para evitar esto, podría plantearse un sinergismo entre los AGPI  $\omega$ 3 y la quercitrina.

En función de lo anterior planteamos el diseño de un futuro alimento funcional, en el que los efectos beneficiosos esperados por parte de los AGPI  $\omega$ 3 en la colitis experimental se vieran protegidos, e incluso incrementados, por la incorporación de la quercitrina.

Un alimento funcional sería aquel que, más allá de sus propiedades nutricionales, influye positivamente sobre la salud del individuo o sobre una determinada función fisiológica. Sin duda, una dieta enriquecida en aceite de pescado, conteniendo EPA y DHA,

asociada a la quercitrina, cumpliría los requisitos para ser considerado como alimento funcional.

La asociación de una dieta suplementada con AGPI  $\omega$ 3 con la administración de quercitrina produjo una marcada mejoría de todos los parámetros analizados en la colitis inducida por DSS, mostrándose en alguno de ellos un efecto sinérgico. Este efecto beneficioso ya se puso de manifiesto durante la propia evolución del daño colónico, al observar una disminución significativa del IAE desde el sexto día en adelante, superando la mejoría clínica mostrada por el tratamiento con quercitrina y la dieta  $\omega$  aisladamente, puesto que fue lograda uno y dos días antes que estos grupos respectivamente. El hecho de que este efecto fuese alcanzado antes con la combinación de la dieta  $\omega$  con el flavonoide sugiere la acción sinérgica de ambos componentes en esta estrategia terapéutica.

No obstante, desde el punto de vista histológico, la recuperación del tejido colónico tras la administración del tratamiento conjunto fue semejante a la mostrada por cada uno de ellos individualmente. Se observó una restauración casi completa de las capas intestinales, manteniéndose exclusivamente infiltrados inflamatorios focales en las más superficiales como único signo de haber existido un proceso colítico.

Como era de esperar, la actividad antiinflamatoria intestinal de esta combinación se vio reflejada por una disminución de los valores de actividad MPO y una restauración de los niveles de GSH colónicos. Si bien los valores correspondientes a estos parámetros fueron semejantes a los obtenidos con el tratamiento del flavonoide aislado, sí fue estadísticamente diferente con respecto a la dieta  $\omega$  en relación a los niveles de GSH en el colon. Este resultado apunta a la importante actividad antioxidante atribuida a la quercitrina, pudiendo ser superior a la que podrían presentar los componentes del aceite de oliva, y por tanto previniendo con mayor eficacia el daño de tipo oxidativo producido como consecuencia del proceso inflamatorio.

Dado que no se observó diferencias en la mayoría de mediadores analizados (MPO, GSH, iNOS, TNF $\alpha$ ) entre el tratamiento conjunto con respecto a los individuales,

ampliamos los estudios bioquímicos determinando la expresión de la enzima COX-2 y los niveles de la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  en el colon.

Las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) catalizan la conversión del ácido araquidónico dando lugar a los prostanoïdes, que se encuentran implicados en una gran variedad de procesos tanto fisiológicos como patológicos en el tracto gastrointestinal. COX-1 se encuentra constitutivamente en un amplio rango de células y tejidos, y su expresión permanece constante bajo la mayoría de las situaciones fisiológicas y patológicas, incluida la EII (Hendel y Nielsen, 1997). Por el contrario, la COX-2 es indetectable en condiciones normales, pero es inducida en macrófagos, fibroblastos y células vasculares, endoteliales y de músculo liso por varias citocinas, endotoxinas, factores de crecimiento o promotores de tumores (Smith y Langenbach, 2001). De hecho, el papel de la COX-2 en la EII ha sido evaluado en varios estudios mostrando que se encuentra inducida en el epitelio intestinal durante la inflamación intestinal activa (Singer *et al.*, 1998). Se ha documentado una correlación positiva entre la actividad endoscópica y la presencia relativa de ARNm de COX-2, de forma que la proporción de pacientes en que se detecta la presencia de ARNm de COX-2 aumenta significativamente en relación con la gravedad de la inflamación intestinal (Hendel y Nielsen, 1997). Los niveles de expresión de la enzima COX-2, que efectivamente se encontraba inducida tras el proceso inflamatorio provocado por el DSS, se vieron reducidos a la mitad en los animales que recibieron el tratamiento conjunto, mostrando unos valores semejantes a los de la dieta  $\omega$  y la quercitrina por separado. Este efecto se ve corroborado por estudios previos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que han establecido la inhibición de la actividad y expresión de COX-2 tanto por flavonoides (Jung y Sung, 2004; Kwon *et al.*, 2005; O'Leary *et al.*, 2004) como por AGPI  $\omega$  3, incluyendo EPA y DHA (Lee *et al.*, 2003; Nieto *et al.*, 2002), justificando así la inhibición de la expresión de esta enzima observada en todas las ratas colíticas tratadas en el presente estudio. Puesto que se ha establecido una relación entre el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), derivada del NO y el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), y la activación de COX-2 (Salvemini *et al.*, 1993; Watkins *et al.*, 1997), la inhibición de la expresión de iNOS en estos grupos puede también contribuir al efecto inhibitorio de la expresión colónica de COX-2 observada en las ratas colíticas tratadas. De acuerdo con esto, no existen diferencias en los niveles

de expresión de la iNOS entre el tratamiento asociado y la administración de la dieta  $\omega$  y la quercitrina de forma aislada. No obstante, cuando los niveles colónicos de LTB<sub>4</sub> fueron evaluados, se observó un descenso significativo en las ratas colíticas tratadas con la combinación de ambos compuestos. Es importante recordar que no se observó ningún efecto inhibitor en la producción de LTB<sub>4</sub> en las ratas colíticas tratadas únicamente con el flavonoide, por lo que la reducción observada podría ser debida a la presencia de AGPI 3 en la dieta  $\omega$ , mecanismo antiinflamatorio atribuido a estos ácidos grasos.

En el caso de la IL-1 $\beta$ , igualmente se ha descrito que juega un papel clave en la EII, como indican las altas concentraciones de IL-1 $\beta$  que se encuentran en el intestino tanto de enfermos con EC como CU (Mahida *et al.*, 1989) y que también se han observado en el modelo experimental de colitis empleado en esta tesis. La IL-1 es una citocina producida principalmente por células mononucleares locales (Youngman *et al.*, 1993). Su principal función, al igual que el TNF, es ser mediadora de la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad innata, y sus efectos biológicos dependen de la cantidad de citocina liberada. A bajas concentraciones, su principal función es ser mediador de la inflamación local: la IL-1 actúa sobre las células endoteliales, favoreciendo la coagulación y aumentando la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión leucocitaria. La IL-1 no actúa directamente sobre los leucocitos inflamatorios, si bien estimula la producción de quimiocinas por otras células que los activan. Cuando se secreta en cantidades mayores, la IL-1 entra en la circulación y ejerce efectos endocrinos: junto con el TNF, comparte la capacidad de producir fiebre, inducir la síntesis hepática de proteínas plasmáticas de fase aguda de la inflamación, e iniciar el desgaste metabólico. Se trata por tanto de una citocina que afecta a casi todos los tipos celulares y que actúa induciendo la producción de otros mediadores que amplificarían la respuesta inflamatoria (Fiocchi, 1992), por lo que algunos autores han propuesto que la IL-1 puede ser considerada, al igual que sucede con la MPO, como un marcador del proceso inflamatorio intestinal (Rachmilewitz *et al.*, 1989).

En nuestro estudio, tras determinar los niveles colónicos de esta citocina, se observó que el tratamiento combinado mostró un mayor efecto inhibitor en relación a la

administración de ambos agentes por separado. Así, se obtuvo una práctica normalización de los niveles de IL-1 $\beta$  con un porcentaje de inhibición de un 98%, mientras que la quercitrina produjo un descenso de un 72%, y la dieta  $\omega$  no mostró ningún efecto. Los flavonoides han demostrado ser capaces de descender los niveles de IL-1 $\beta$  tanto en ensayos *in vitro* (Blonska *et al.*, 2003) como en el tejido colónico inflamado (Galvez *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2005), contribuyendo así a su efecto antiinflamatorio intestinal. En contraposición a los resultados obtenidos en este estudio, ensayos en cultivos celulares han demostrado que el EPA y el DHA son capaces de inhibir la producción de IL-1 $\beta$  por monocitos (Chu *et al.*, 1999) y que el consumo de aceite de pescado reduce la producción *ex vivo* de esta citocina por macrófagos de ratón (Yaqoob y Calder, 1995). Otros estudios han determinado que la suplementación de la dieta con aceite de pescado produce una disminución de IL-1 $\beta$ , tanto en individuos sanos (Caughey *et al.*, 1996; Endres *et al.*, 1989) como en enfermos con EII (Whiting *et al.*, 2005). Una posible explicación para este resultado contradictorio puede estar relacionada con las cantidades de EPA y DHA consumidas por los animales, puesto que en el presente estudio empleamos cantidades de aceite de pescado menores a las utilizadas en estudios previos (Nieto *et al.*, 2002). Quizás este hecho ha sido el que nos ha permitido observar la potenciación en la disminución de los niveles colónicos de IL-1 $\beta$ ) obtenida en los animales tratados conjuntamente con la dieta  $\omega$  y el flavonoide.

En conclusión, el efecto antiinflamatorio intestinal mostrado por esta estrategia terapéutica, constituida por una dieta suplementada con aceite de pescado junto con la administración de quercitrina, puede ser explicado por la participación de diferentes mecanismos a través de los cuales la quercitrina (inhibición de la producción colónica de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , actividad antioxidante) y la dieta  $\omega$  (inhibición de la producción colónica de TNF $\alpha$  y LTB $_4$ , actividad antioxidante) ejercen su acción. Ambos pueden actuar sinérgicamente mejorando el daño colónico inducido por el DSS. La principal ventaja del tratamiento combinado estuvo relacionada con la reducción en los niveles de IL-1 $\beta$ , que podría ser responsable de la mayor rapidez en la recuperación en relación con la administración de aceite de pescado y quercitrina aisladamente. Esta nueva estrategia puede presentar un gran potencial en el tratamiento de la EII, no sólo debido a su efecto

antiinflamatorio, sino también mejorando la estabilidad de una posible fórmula inmunomoduladora que contuviera AGPI  $\omega$ 3 y antioxidantes.



## **CONCLUSIONES**

---

1. La incorporación de aceite de oliva en la dieta, con la consiguiente modificación de la relación AGPI 6/ 9, ejerce un efecto beneficioso en la colitis inducida por DSS en ratas. Esta actividad está relacionada con las propiedades antioxidantes que caracterizan a este aceite. Cuando a esta dieta se le adiciona aceite de pescado, la actividad antiinflamatoria intestinal se ve incrementada al modificarse la relación AGPI  $\omega 6/\omega 3$  en el tejido colónico. La incorporación de los AGPI 3, EPA y DHA, en el tejido intestinal se traduce en una reducción de los niveles de mediadores de carácter proinflamatorio, como  $LTB_4$  o  $TNF\alpha$ .

2. El tratamiento con quercitrina facilita la recuperación del daño colónico inducido por DSS en ratas. Este efecto se asocia con una mejora del estado oxidativo intestinal, derivada de sus propiedades antioxidantes, y con una menor producción de mediadores proinflamatorios, como  $TNF$  ,  $IL-1\beta$  y  $NO$ . Esta actividad antiinflamatoria intestinal está relacionada con la inhibición de la actividad del factor de transcripción  $NF B$  generada por el flavonoide.

3. Cuando la administración de la quercitrina se asocia con la ingesta de una dieta enriquecida en aceite de pescado se observa un efecto sinérgico en la actividad antiinflamatoria intestinal en el modelo de colitis experimental inducida por DSS en ratas. A este efecto contribuye la participación de distintos mecanismos de acción:

- actividad antioxidante e inhibición de la producción colónica de  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  atribuidas a la quercitrina.

- reducción de los niveles colónicos de  $TNF\alpha$  y  $LTB_4$  producida por los AGPI 3.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Abbas AK. Inmunología celular y molecular. Madrid: Elsevier, 2004.
- Agrawal A, Rhodes JM. Smoking and IBD. *IBD Monitor* 2003; 4: 114-119.
- Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, Panayotidis P, Pilling D, Bofill M, Krajewski S, Reed JC, Salmon M. Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol* 1996; 26(2):294-299.
- Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M y Miyake, K. Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Tolllike receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 3471-3475.
- Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77:373-382.
- Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol* 2001; 78:1-56.
- Allard JP, Kurian R, Aghdassi E, Muggli R, Royall D. Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans. *Lipids* 1997; 32(5):535-541.
- Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10(5):666-676.
- Almallah YZ, Richardson S, O'Hanrahan T, Mowat NA, Brunt PW, Sinclair TS, Ewen S, Heys SD, Eremin O. Distal procto-colitis, natural cytotoxicity, and essential fatty acids. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(5):804-809.
- Almallah YZ, Richardson S, O'Hanrahan T, Almallah YZ, El-Tahir A, Heys SD, Richardson S, Eremin O. Distal procto-colitis and n-3 polyunsaturated fatty acids: the mechanism(s) of natural cytotoxicity inhibition. *Eur J Clin Invest* 2000a; 30(1):58-65.
- Almallah YZ, Ewen SW, El-Tahir A, Mowat NA, Brunt PW, Sinclair TS, Heys SD, Eremin O.

Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ. *J Clin Immunol* 2000b; 20(1):68-76.

Alstead EM. The pill: safe sex and Crohn's disease? *Gut* 1999; 45(2):165-166.

Alzoghaibi MA, Walsh SW, Willey A, Fowler AA 3rd, Graham MF. Linoleic acid, but not oleic acid, upregulates the production of interleukin-8 by human intestinal smooth muscle cells isolated from patients with Crohn's disease. *Clin Nutr* 2003; 22(6):529-535.

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 1985; 113:548-555.

Andoh A, Tsujikawa T, Ishizuka I, Araki Y, Sasaki M, Koyama S, Fujiyama Y. N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *Int J Mol Med* 2003; 12(5):721-725.

Ardizzone S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002; 252(6):475-496.

Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(21):7671-7676.

Arrington JL, Chapkin RS, Switzer KC, Morris JS, McMurray DN. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modulate purified murine T-cell subset activation. *Clin Exp Immunol* 2001; 125(3):499-507.

Asfaha S, MacNaughton WK, Appleyard CB, Chadee K, Wallace JL. Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(3):G635-G644.

Aslan A, Triadafilopoulos G. Fish oil fatty acid supplementation in active ulcerative colitis: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Am J Gastroenterol* 1992; 87(4):432-437.

- Babcock TA, Kurland A, Helton WS, Rahman A, Anwar KN, Espat NJ. Inhibition of activator protein-1 transcription factor activation by omega-3 fatty acid modulation of mitogen-activated protein kinase signaling kinases. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27(3):176-180; discussion 181.
- Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347(12):911-920.
- Bajaj Elliott M, Poulsom R, Pender SL, Wathen NC, MacDonald TT. Interactions between stromal cell--derived keratinocyte growth factor and epithelial transforming growth factor in immune-mediated crypt cell hyperplasia. *J Clin Invest* 1998; 102(8):1473-1480.
- Balamuth F, Leitenberg D, Unternaehrer J, Mellman I, Bottomly K. Distinct patterns of membrane microdomain partitioning in Th1 and th2 cells. *Immunity* 2001; 15(5):729-738.
- Barret KE. Integrate regulation of intestinal epithelial transport: intracellular pathways. *Am J Physiol* 1997; 272:C1069-C1076.
- Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268(4 Pt 1):G622-G630.
- Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 1996; 334(24):1557-1560.
- Belluzzi A, Boschi S, Brignola C, Munarini A, Cariani G, Miglio F. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1 Suppl):339S-342S.
- Belluzzi A. Polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) and inflammatory bowel disease (IBD): pathogenesis and treatment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004; 8(5):225-229.
- Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996; 4(11):430-435.
- Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. Card15 gene

overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003; 52(6):840-846.

Bertran X, Mane J, Fernandez-Banares F, Castella E, Bartoli R, Ojanguren I, Esteve M, Gassull MA. Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 1996; 38(6):899-904.

Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *J Biol Chem* 1946; 164: 321-329.

Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med* 1995; 43(3):227-235.

Bjornsson S, Johannsson JH. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(1):31-38.

Blonska M, Czuba ZP, Krol W. Effect of flavone derivatives on interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA expression and IL-1beta protein synthesis in stimulated RAW 264.7 macrophages. *Scand J Immunol* 2003; 57(2):162-166.

Bomba A, Nemcova R, Gancarcikova S, Herich R, Pistl J, Revajova V, Jonecova Z, Bugarsky A, Levkut M, Kastel R, Baran M, Lazar G, Hluchy M, Marsalkova S, Posivak J. The influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 pufa) on lactobacilli adhesion to the intestinal mucosa and on immunity in gnotobiotic piglets. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2003; 116(7-8):312-316.

Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124(2):521-536.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990; 186:343-355.

Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease.

---

*Nat Rev Immunol* 2003; 3(7):521-533.

Brandzaeg P, Haraldsen L, Baekkevold ES, Jahnsen FL, Nilsen EM. Intestinal Mucosa and its Diseases. Pathophysiology and Clinics. Domschke W, Stoll R, Brasitus TA, Kagnoff MF, eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999: 383-400.

Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002; 51(1):21-25.

Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:375-396.

Buell MG, Berin MC. Neutrophil-independence of the initiation of colonic injury. Comparison of results from three models of experimental colitis in the rat. *Dig Dis Sci* 1994; 39(12):2575-2588.

Burdge GC, Calder PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45(5):581-597.

Bylund-Fellenius AC, Landström E, Axelsson LG, Midtvedt T. Experimental colitis induced by dextran sulfate in normal and germfree mice. *Microb Ecol Health Dis* 1994; 7:207-215.

Cabrero A, Laguna JC, Vazquez M. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1(3):243-248.

Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Adv Enzyme Regul* 1997a; 37:197-237.

Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann Nutr Metab* 1997b; 41(4):203-234.

Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 1:S31-S48.



Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids* 2003; 38(4):343-352.

Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 2):423-427.

Camandola S, Leonarduzzi G, Musso T, Varesio L, Carini R, Scavazza A, Chiarpotto E, Baeuerle PA, Poli G. Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229(2):643-647.

Campieri M, Gionchetti P. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterology* 1999; 116(5):1246-1249.

Campos FG, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Logullo AF, Noronha IL, Jancar S, Torrinhas RS, Furst P. Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 1:S83-S88.

Camuesco D, Comalada M, Rodriguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, Zarzuelo A, Galvez J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2004; 143(7):908-918.

Cao Z, Henzel WJ, Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 1996; 271(5252):1128-1131.

Caradonna L, Amati L, Lella P, Jirillo E, Caccavo D. Phagocytosis, killing, lymphocyte-mediated antibacterial activity, serum autoantibodies, and plasma endotoxins in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(6):1495-1502.

Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68(12):7010-7017.

Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor

necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(1):116-122.

Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J* 1995; 14(23):5957-5964.

Celada A, Gray PW, Rinderknecht E, Schreiber RD. Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med* 1984; 160(1):55-74.

Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, Bui TH, Giovannini M, Zaehring U, Penard-Lacronique V, Sansonetti PJ, Hugot JP, Thomas G. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(6):3455-3460.

Chan ED, Riches DW. Potential role of the JNK/SAPK signal transduction pathway in the induction of iNOS by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(3):790-796.

Chan MM, Fong D, Ho CT, Huang HI. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol* 1997; 54(12):1281-1286.

Chan VW, Kothakota S, Rohan MC, Panganiban-Lustan L, Gardner JP, Wachowicz MS, Winter JA, Williams LT. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 1999; 93(11):3610-3616.

Chang CJ, Geahlen RL. Protein-tyrosine kinase inhibition: mechanism-based discovery of antitumor agents. *J Nat Prod* 1992; 55(11):1529-1560.

Chen C, Chen YH, Lin WW. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. *Immunology* 1999; 97(1):124-129.

Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hou WC, Yang LL, Lee TJ. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene

expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 2001; 82(4):537-548.

Chey WY. Infliximab for patients with refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7 Suppl 1:S30-S33.

Chin AC, Vergnolle N, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Buret AG. Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(19):11104-11109.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Merkal RS, Coutu JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29(12):1073-1079.

Cho JH. The Nod2 gene in Crohn's disease: implications for future research into the genetics and immunology of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7(3):271-275.

Cho JH. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3 Suppl 1:S18-S22.

Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY, Jeong WI, Ryu SY, Do SH, Lee CS, Song JC, Jeong KS. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem* 2003; 243(1-2):153-160.

Chow SC, Ansotegui IJ, Jondal M. Inhibition of receptor-mediated calcium influx in T cells by unsaturated non-esterified fatty acids. *Biochem J* 1990; 267(3):727-732.

Chu AJ, Walton MA, Prasad JK, Seto A. Blockade by polyunsaturated n-3 fatty acids of endotoxin-induced monocytic tissue factor activation is mediated by the depressed receptor expression in THP-1 cells. *J Surg Res* 1999; 87(2):217-224.

Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of

helper T cell responses. *J Immunol* 2000; 164(3):1364-1371.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420(6917):885-891.

Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1990; 10(4):1498-1506.

Collins SM. Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280(3):G315-G328.

Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lopez-Lopez C, Pennington DJ, Celada A. PKC epsilon is involved in JNK activation that mediates LPS-induced TNF-alpha, which induces apoptosis in macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285(5):C1235-C1245.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69(2):238-249.

Cope GF, Heatley RV, Kelleher JK. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293(6545):481.

Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 2001; 6:D1321-D1357.

Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, Di Paolo M, Riegler G, Rigo GP, Ferrau O, Mansi C, Ingrosso M, Valpiani D. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 1998; 27(3):397-404.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 1998; 61(1):71-76.

Coulie B, Camilleri M, Bharucha AE, Sandborn WJ, Burton D. Colonic motility in chronic ulcerative proctosigmoiditis and the effects of nicotine on colonic motility in patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(5):653-663.

Crespo ME, Galvez J, Cruz T, Ocete MA, Zarzuelo A. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med* 1999; 65(7):651-653.

Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina L-H F, Zarzuelo A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci* 1998; 62(7):687-695.

Cruz T, Galvez J, Crespo E, Ocete MA, Zarzuelo A. Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med* 2001; 67(1):94-96.

Cucino C, Sonnenberg A. Occupational mortality from inflammatory bowel disease in the United States 1991-1996. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(4):1101-1105.

Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004; 3(5):394-400.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103(2):239-252.

Deiana M, Aruoma OI, Bianchi ML, Spencer JP, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu FP. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(5-6):762-769.

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103(2):351-361.

Denys A, Hichami A, Khan NA. n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C- $\alpha$  and - $\epsilon$  and the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J Lipid Res* 2005; 46(4):752-758.

Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001; 193(7):827-838.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20(5):649-688.

Diaz O, Berquand A, Dubois M, Di Agostino S, Sette C, Bourgoin S, Lagarde M, Nemoz G, Prigent AF. The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *J Biol Chem* 2002; 277(42):39368-39378.

Dichi I, Frenhane P, Dichi JB, Correa CR, Angeleli AY, Bicudo MH, Rodrigues MA, Victoria CR, Burini RC. Comparison of omega-3 fatty acids and sulfasalazine in ulcerative colitis. *Nutrition* 2000; 16(2):87-90.

Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994; 107(6):1643-1652.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114(3):385-391.

DuBois RN, Gupta R, Brockman J, Reddy BS, Krakow SL, Lazar MA. The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis* 1998; 19(1):49-53.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102(3):448-455.

Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Buschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 1999; 44(6):812-818.

Duerr RH. Update on the genetics of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37(5):358-367.

Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Buchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 2000; 62(4):240-248.

Ehrenpreis ED, Kane SV, Cohen LB, Cohen RD, Hanauer SB. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial. *Gastroenterology* 1999; 117(6):1271-1277.

Ekbom A, Daszak P, Kraaz W, Wakefield AJ. Crohn's disease after in-utero measles virus exposure. *Lancet* 1996; 348(9026):515-517.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109(4):1344-1367.

Empey LR, Jewell LD, Garg ML, Thomson AB, Clandinin MT, Fedorak RN. Fish oil-enriched diet is mucosal protective against acetic acid-induced colitis in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69(4):480-487.

Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC, Schaefer EJ, Wolff SM, Dinarello CA. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 1989; 320(5):265-271.

Enns R, Sutherland L. Adverse events in medical therapy for treatment for inflammatory bowel disease. En: Campieri M, Bianchi-Porro G, Fiocchi C, Schömerich J, eds. *Clinical*

---

*challenges in inflammatory bowel diseases. Diagnosis, prognosis and treatment.* London: Kluwer Academic Publishers, 1998: 113-123.

Eritslund J. Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1 Suppl):197S-201S.

Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 2004; 24: 851-874

Esteve-Comas M, Ramirez M, Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Gil A, Cabre E, Gonzalez-Huix F, Moreno J, Humbert P, Guilera M, Boix J, Gassull MA. Plasma polyunsaturated fatty acid pattern in active inflammatory bowel disease. *Gut* 1992; 33(10):1365-1369.

Esteve-Comas M, Nunez MC, Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Gil A, Cabre E, Gonzalez-Huix F, Bertran X, Gassull MA. Abnormal plasma polyunsaturated fatty acid pattern in non active inflammatory bowel disease. *Gut* 1993; 34(10):1370-1373.

Esteve-Comas M, Ramirez M, Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Gil A, Cabre E, Gonzalez-Huix F, Bertran X, Gassull MA. Determinants of plasma fatty acid abnormalities in patients with active inflammatory bowel disease: a multivariate analysis. *Inflam Bowel Dis* 1995; 1, 95–100.

Esteve M, Navarro E, Klaassen J, Abad-Lacruz A, Gonzalez-Huix F, Cabre E, Ramos E, Condom E, Fernandez-Banares F, Pastor C, Humbert P, Marti-Rague J, Gassull MA. Plasma and mucosal fatty acid pattern in colectomized ulcerative colitis patients. *Dig Dis Sci* 1998; 43(5):1071-1078.

Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40(5):619-622.

Evans MJ, Eckert A, Lai K, Adelman SJ, Harnish DC. Reciprocal antagonism between



estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo. *Circ Res* 2001; 89(9):823-830.

Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 1993; 54(4):248-255.

Fan YY, McMurray DN, Ly LH, Chapkin RS. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J Nutr* 2003; 133(6):1913-1920.

Fedorak RN, Empey LR, Walker K. Verapamil alters eicosanoid synthesis and accelerates healing during experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1992; 102(4 Pt 1):1229-1235.

Ferriola PC, Cody V, Middleton E Jr. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(10):1617-1624.

Fiocchi C. Cytokines. En: MacDermott RP, W Stenson, eds. *Inflammatory Bowel Disease*, New York: Elseiver, 1992: 137-162.

Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115(1):182-205.

Fiocchi C. The normal intestinal mucosa: a state of "controlled inflammation". En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003: 101-120.

Fisher NC, Yee L, Nightingale P, McEwan R, Gibson JA. Measles virus serology in Crohn's disease. *Gut* 1997; 41(1):66-69.

Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413(6851):78-83.

Foell D, Kucharzik T, Kraft M, Vogl T, Sorg C, Domschke W, Roth J. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52(6):847-853.

French N, Pettersson S. Microbe-host interactions in the alimentary tract: the gateway to understanding inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47(2):162-163.

Fretland DJ, Widomski D, Tsai BS, Zemaitis JM, Levin S, Djuric SW, Shone RL, Gaginella TS. Effect of the leukotriene B4 receptor antagonist SC-41930 on colonic inflammation in rat, guinea pig and rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255(2):572-576.

Galsanov ShB, Tourova AD, Klimenko ED. Effect of quercitrin on structural changes in the large and small intestines in experimental enterocolitis. *Biull Eksp Biol Med* 1976; 81(5):623-625.

Galvez J, de la Cruz JP, Zarzuelo A, Sanchez de Medina F Jr, Jimenez J, Sanchez de la Cuesta F. Oral administration of quercitrin modifies intestinal oxidative status in rats. *Gen Pharmacol* 1994; 25(6):1237-1243.

Galvez J, Cruz T, Crespo E, Ocete MA, Lorente MD, Sanchez de Medina F, Zarzuelo A. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Med* 1997; 63(5):409-414.

Galvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, 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* 2000a; 130(8):1949-1959.

Galvez J, Sanchez de Medina F, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of Polypodium leucotomos on acute, chronic and reactivated trinitrobenzene sulphonic acid colitis in rats. *Inflammopharmacology* 2000b; 8:89-105.

Galvez J, Coelho G, Crespo ME, Cruz T, Rodriguez-Cabezas ME, Concha A, Gonzalez M, Zarzuelo A. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in

the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(12):2027-2039.

Gasche C. Complications of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(31):49-56.

Gasche C, Alizadeh BZ, Pena AS. Genotype-phenotype correlations: how many disorders constitute inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15(6):599-606.

Gassull MA, Cabré E. Clinical guidelines for the diagnosis of IBD. En: *Management of inflammatory bowel disease*. Barcelona: Prous Science, 1994: 7-12.

Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 1999; 44(7):1458-1475.

Geboes K. The role of histological studies in IBD. En: Gassull MA, Obrador A, Chantar C, eds. *Management of Inflammatory Bowel Disease*. Barcelona: Prous Science, 1994: 45-66.

Geller SA. Pathology of inflammatory bowel disease: a critical appraisal in diagnosis and management. En: Targan SR, Shanagan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994: 336-351.

Geng Y, Zhang B, Lotz M. Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. *J Immunol* 1993; 151(12):6692-6700.

Ghosh S, Armitage E, Wilson D, Minor PD, Afzal MA. Detection of persistent measles virus infection in Crohn's disease: current status of experimental work. *Gut* 2001; 48(6):748-752.

Gibson P, Rosella O, Nov R, Young G. Colonic epithelium is diffusely abnormal in ulcerative colitis and colorectal cancer. *Gut* 1995; 36(6):857-863.

Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother* 2002; 56(8):388-396.

- Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003; 24(12):652-658.
- Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(1):44-55.
- Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37(5):668-673.
- Goebel J, Forrest K, Morford L, Roszman TL. Differential localization of IL-2- and -15 receptor chains in membrane rafts of human T cells. *J Leukoc Biol* 2002; 72(1):199-206.
- Goldman H. Ulcerative colitis and Crohn's colitis. En: Ming SC, Goldman H, eds. *Pathology of the Gastrointestinal Tract*. Philadelphia: WB Saunders, 1992: 643-688.
- Goldyne ME. Lymphocytes and arachidonic acid metabolism. *Prog Allergy* 1988; 44:140-152.
- Gordon JI, Hooper LV, McNevin MS, Wong M, Bry L. Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol* 1997; 273(3 Pt 1):G565-G570.
- Gray JG, Chandra G, Clay WC, Stinnett SW, Haneline SA, Lorenz JJ, Patel IR, Wisely GB, Furdon PJ, Taylor JD, Kost TA. A CRE/ATF-like site in the upstream regulatory sequence of the human interleukin 1 beta gene is necessary for induction in U937 and THP-1 monocytic cell lines. *Mol Cell Biol* 1993; 13(11):6678-6689.
- Greenfield SM, Green AT, Teare JP, Jenkins AP, PUNCHARD NA, Ainley CC, Thompson RP. A randomized controlled study of evening primrose oil and fish oil in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1993; 7(2):159-166.
- Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1993; 110(3):963-968.

Griffiths RJ. Prostaglandins and inflammation. En: Gallin JI, Snyderman R, eds. *Inflammation. Basic Principle and Clinical Correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Press, 1999: 34960.

Grip O, Janciauskiene S, Lindgren S. Macrophages in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2(2):155-160.

Grisham MB, MacDermott RP, Deitch EA. Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation* 1990; 14(6):669-680.

Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994; 344(8926):859-861.

Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276(2 Pt 1):G315-G321.

Guarner F, Vilaseca J, Malagelada JR. Dietary manipulation in experimental inflammatory bowel disease. *Agents Actions* 1992; Spec No:C10-C14.

Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 39(3):237-238.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361(9356):512-519.

Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1995; 267(5196):389-393.

Guslandi M, Tittobello A. Pilot trial of nicotine patches as an alternative to corticosteroids in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1996; 31(4):627-629.

Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002; 277(44):41701-41705.

- Habtemariam S. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha in L-929 tumor cells. *J Nat Prod* 1997; 60(8):775-778.
- Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(3):591-593.
- Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, DeFranco AL. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(7):2774-2778.
- Hanauer SB, Sandborn W. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(3):635-643.
- Harats D, Dabach Y, Hollander G, Ben-Naim M, Schwartz R, Berry EM, Stein O, Stein Y. Fish oil ingestion in smokers and nonsmokers enhances peroxidation of plasma lipoproteins. *Atherosclerosis* 1991; 90(2-3):127-139.
- Hart A, Kamm MA. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(12):2017-2028.
- Hawthorne AB, Daneshmend TK, Hawkey CJ, Belluzzi A, Everitt SJ, Holmes GK, Malkinson C, Shaheen MZ, Willars JE. Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut* 1992; 33(7):922-928.
- Hecker M, Preiss C, Klemm P, Busse R. Inhibition by antioxidants of nitric oxide synthase expression in murine macrophages: role of nuclear factor kappa B and interferon regulatory factor 1. *Br J Pharmacol* 1996; 118(8):2178-2184.
- Hendel J, Nielsen OH. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(7):1170-1173.
- Herbert TB, Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med* 1993; 55(4):364-379.

Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 1998; 102(4):792-803.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 1993; 20(1):21-29.

Hirata I, Murano M, Nitta M, Sasaki S, Toshina K, Maemura K, Katsu K. Estimation of mucosal inflammatory mediators in rat DSS-induced colitis. Possible role of PGE(2) in protection against mucosal damage. *Digestion* 2001; 63 Suppl 1:73-80.

Hiscott J, Marois J, Garoufalidis J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G, Fenton M. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 1993; 13(10):6231-6240.

Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122(1):7-14.

Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 2003; 52(1):144-151.

Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* 2003; 278(17):14677-14687.

Horejsi V. The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev* 2003; 191:148-164.

Hughes DA, Pinder AC, Piper Z, Johnson IT, Lund EK. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. *Am J Clin Nutr* 1996a; 63(2):267-272.

Hughes DA, Southon S, Pinder AC. (n-3) Polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro. *J Nutr* 1996b; 126(3):603-610.

Hughes DA, Pinder AC. N-3 polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes and inhibit antigen-presentation in vitro. *Clin Exp Immunol* 1997; 110(3):516-523.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379(6568):821-823.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999; 274(21):14560-14567.

Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5(1):76-80.

Inui K, Fukuta Y, Ikeda A, Kameda H, Kokuba Y, Sato M. The nutritional effect of a-linolenic acid-rich emulsion with total parenteral nutrition in a rat model with inflammatory bowel disease. *Ann Nutr Metab* 1996; 40(4):227-233.

Ioku K, Tsushida T, Takei Y, Nakatani N, Terao J. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1234(1):99-104.

Isaacs KL, Sartor RB. Treatment of inflammatory bowel disease with antibiotics.



*Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33(2):335-345.

Ishikawa Y, Sugiyama H, Stylianou E, Kitamura M. Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear factor-kappaB. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(11):2290-2296.

Ishioka T, Kuwabara N, Oohashi Y, Wakabayashi K. Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides. *Crit Rev Toxicol* 1987; 17(3):215-244.

Jain S, Pulikuri S, Zhu Y, Qi C, Kanwar YS, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Differential expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its coactivators steroid receptor coactivator-1 and PPAR-binding protein PBP in the brown fat, urinary bladder, colon, and breast of the mouse. *Am J Pathol* 1998; 153(2):349-354.

Janeway CA Jr, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994; 76(2):275-285.

Janowitz HD, Croen EC, Sachar DB. The role of the fecal stream in Crohn's disease: an historical and analytic review. *Inflamm Bowel Dis* 1998; 4(1):29-39.

Jaschonek K, Clemens MR, Scheurlen M. Decreased responsiveness of platelets to a stable prostacyclin analogue in patients with Crohn's disease. Reversal by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Thromb Res* 1991; 63(6):667-672.

Jeffery NM, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions appear to be due to oleic acid. *Ann Nutr Metab* 1996; 40(2):71-80.

Jewel DP. Ulcerative colitis. En: Sleisenger MH, Fordtran JS, eds. *Gastrointestinal Diseases*. Philadelphia: WB Saunders, 1993: 1305-1330.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391(6662):82-86.

Johansen K, Stintzing G, Magnusson KE, Sundqvist T, Jalil F, Murtaza A, Khan SR, Lindblad BS, Mollby R, Orusild E, *et al.* Intestinal permeability assessed with polyethylene glycols in children with diarrhea due to rotavirus and common bacterial pathogens in a developing community. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; 9(3):307-313.

Jolly CA, Jiang YH, Chapkin RS, McMurray DN. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J Nutr* 1997; 127(1):37-43.

Jones DC, Ding X, Daynes RA. Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J Biol Chem* 2002; 277(9):6838-6845.

Jones VA, Dickinson RJ, Workman E, Wilson AJ, Freeman AH, Hunter JO. Crohn's disease: maintenance of remission by diet. *Lancet* 1985; 2(8448):177-180.

Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13(2):155-164.

Jung WJ, Sung MK. Effects of major dietary antioxidants on inflammatory markers of RAW 264.7 macrophages. *Biofactors* 2004; 21(1-4):113-117.

Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997; 100(1):6-10.

Kankaanpaa PE, Salminen SJ, Isolauri E, Lee YK. The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 194(2):149-153.

Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995; 270(28):16483-16486.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:621-663.

- Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M, Kunkel SL. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4(3):273-279.
- Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut* 1990; 31:786-790.
- Kho YH, Pool MO, Jansman FG, Harting JW. Pharmacotherapeutic options in inflammatory bowel disease: an update. *Pharm World Sci* 2001; 23(1):17-21.
- Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1999; 58(5):759-765.
- Kim YS, Son M, Ko JI, Cho H, Yoo M, Kim WB, Song IS, Kim CY. Effect of DA-6034, a derivative of flavonoid, on experimental animal models of inflammatory bowel disease. *Arch Pharm Res* 1999; 22(4):354-360.
- Kinsella JE, Lokesh B, Broughton S, Whelan J. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* 1990; 6(1):24-44; discussion 59-62.
- Kishimoto S, Kobayashi H, Shimizu S, Haruma K, Tamaru T, Kajiyama G, Miyoshi A. Changes of colonic vasoactive intestinal peptide and cholinergic activity in rats with chemical colitis. *Dig Dis Sci* 1992; 37(11):1729-1737.
- Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* 1999; 48(3):137-143.
- Kitajima S, Morimoto M, Sagara E, Shimizu C, Ikeda Y. Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. *Exp Anim* 2001; 50(5):387-395.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298(Pt 2):249-258.

- Kobuchi H, Roy S, Sen CK, Nguyen HG, Packer L. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt 1):C403-C411.
- Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999; 10(3):387-398.
- Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, Esen M, Thiel A, Mordmuller B, Scheidereit C. The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol Cell Biol* 2004; 24(14):6488-6500.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87(6):1344-1350.
- Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997; 11(6):779-791.
- Kubes P, Grisham MB, Barrowman JA, Gaginella T, Granger DN. Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery. *Am J Physiol* 1991; 261(6 Pt 2):H1872-H1879.
- Kucharzik T, Lugering N, Rautenberg K, Lugering A, Schmidt MA, Stoll R, Domschke W. Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915:171-183.
- Kullmann F, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Scholmerich J, Ruschoff J. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16(4):238-246.
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and

disease. *J Mol Med* 2004; 82(7):434-448.

Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(3):395-406.

Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125(1):47-57.

Lauritsen K, Laursen LS, Bukhave K, Rask-Madsen J. Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E2 and leukotriene B4 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1986; 91(4):837-844.

Lawton LJ, Donaldson WE. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res* 1991; 28(2):83-97.

Leach MW, Davidson NJ, Fort MM, Powrie F, Rennick DM. The role of IL-10 in inflammatory bowel disease: "of mice and men". *Toxicol Pathol* 1999; 27(1):123-133.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLuaghlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372(6508):739-746.

Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G, Hwang DH. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 2003; 44(3):479-486.

Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J 3rd, Spur BW, Robinson DR, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and

- neutrophil function. *N Engl J Med* 1985; 312(19):1217-1224.
- Lefer AM, Lefer DJ. Nitric oxide. II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276(3 Pt 1):G572-G575.
- Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986; 27(1):114-120.
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(5):1213-1220.
- Levine DS. Clinical features and complications of Crohn's disease. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994: 296-319.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2001; 2(7):612-619.
- Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000; 20(13):4699-7407.
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(8):5567-5572.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999; 20(10):1945-1952.
- Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett* 2001; 496(1):12-18.

Lichtman SN, Balfour Sartor R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: clinical aspects and natural history. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994: 317-335.

Liu JJ, Song CW, Yue Y, Duan CG, Yang J, He T, He YZ. Quercetin inhibits LPS-induced delay in spontaneous apoptosis and activation of neutrophils. *Inflamm Res* 2005; 54(12):500-507.

Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Lo R, Helton S. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J Surg Res* 1999; 82(2):216-221.

Lochs H, Steinhardt HJ, Klaus-Wentz B, Zeitz M, Vogelsang H, Sommer H, Fleig WE, Bauer P, Schirrmeyer J, Malchow H. Comparison of enteral nutrition and drug treatment in active Crohn's disease. Results of the European Cooperative Crohn's Disease Study. IV. *Gastroenterology* 1991; 101(4):881-888.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104(4):487-501.

Loeschke K, Ueberschaer B, Pietsch A, Gruber E, Ewe K, Wiebecke B, Heldwein W, Lorenz R. n-3 fatty acids only delay early relapse of ulcerative colitis in remission. *Dig Dis Sci* 1996; 41(10):2087-2094.

Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut* 2000; 46(3):336-343.

Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126(6):1504-1517.

Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, del Vecchio Blanco C. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental

colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1996; 41(6):1204-1211.

Lorenz-Meyer H, Bauer P, Nicolay C, Schulz B, Purrmann J, Fleig WE, Scheurlen C, Koop I, Pudel V, Carr L. Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. A randomized controlled multicenter trial. Study Group Members (German Crohn's Disease Study Group). *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(8):778-785.

Lorenz R, Weber PC, Szimnau P, Heldwein W, Strasser T, Loeschke K. Supplementation with n-3 fatty acids from fish oil in chronic inflammatory bowel disease--a randomized, placebo-controlled, double-blind cross-over trial. *J Intern Med Suppl* 1989; 731:225-232.

MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 1990; 81(2):301-305.

MacLean CH, Mojica WA, Newberry SJ, Pencharz J, Garland RH, Tu W, Hilton LG, Gralnek IM, Rhodes S, Khanna P, Morton SC. Systematic review of the effects of n-3 fatty acids in inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82(3):611-619.

Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989; 83(2):724-727.

Mahadevan U, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(4):910-914.

Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 1989; 30(6):835-838.

Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6(1):21-33.



- Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 197(1):111-119.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(5):727-747.
- Manthey JA, Grohmann K, Montanari A, Ash K, Manthey CL. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor-alpha expression by human monocytes. *J Nat Prod* 1999; 62(3):441-444.
- Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, Bazan NG. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278(44):43807-43817.
- Marotta F, Chui DH, Safran P, Rezakovic I, Zhong GG, Ideo G. Shark fin enriched diet prevents mucosal lipid abnormalities in experimental acute colitis. *Digestion* 1995; 56(1):46-51.
- Marrero JA, Matkowskyj KA, Yung K, Hecht G, Benya RV. Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF-kappaB and increases galanin-1 receptor expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278(5):G797-G804.
- Martinez-Dominguez E, de la Puerta R, Ruiz-Gutierrez V. Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflamm Res* 2001; 50(2):102-106.
- Maunder RG, Lancee WJ, Greenberg GR, Hunter JJ, Fernandes BJ. Insecure attachment in a subgroup with ulcerative colitis defined by ANCA status. *Dig Dis Sci* 2000; 45(11):2127-2132.
- May CL, Southworth AJ, Calder PC. Inhibition of lymphocyte protein kinase C by unsaturated

fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195(2):823-828.

Mayer L, Shlien R. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med* 1987; 166(5):1471-1483.

Mayer L, Eisenhardt D. Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1990; 86(4):1255-1260.

Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 100(1):3-12.

McAlindon ME, Gray T, Galvin A, Sewell HF, Podolsky DK, Mahida YR. Differential lamina propria cell migration via basement membrane pores of inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115(4):841-848.

McCafferty DM, Rioux KJ, Wallace JL. Granulocyte infiltration in experimental colitis in the rat is interleukin-1 dependent and leukotriene independent. *Eicosanoids* 1992; 5(3-4):121-125.

McCall TB, O'Leary D, Bloomfield J, O'Morain CA. Therapeutic potential of fish oil in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1989; 3(5):415-424.

McCarty MF. Current prospects for controlling cancer growth with non-cytotoxic agents--nutrients, phytochemicals, herbal extracts, and available drugs. *Med Hypotheses* 2001; 56(2):137-154.

McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996; 98(1):136-141.

Meenan J, Hommes DW, Mevissen M, Dijkhuizen S, Soule H, Moyle M, Buller HR, ten Kate FW, Tytgat GN, van Deventer SJ. Attenuation of the inflammatory response in an animal colitis model by neutrophil inhibitory factor, a novel beta 2-integrin antagonist. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(8):786-791.

Merlin D, Si-Tahar M, Sitaraman SV, Eastburn K, Williams I, Liu X, Hediger MA, Madara JL. Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *Gastroenterology* 2001; 120(7):1666-1679.

Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998; 439:175-182.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4):673-751.

Middleton SJ, Naylor S, Woolner J, Hunter JO. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of essential fatty acid supplementation in the maintenance of remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(6):1131-1135.

Miles EA, Calder PC. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc* 1998; 57(2):277-292.

Miles EA, Wallace FA, Calder PC. Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages. *Atherosclerosis* 2000; 152(1):43-50.

Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 2005; 21(3):389-394.

Miller MJ, Sandoval M. Nitric Oxide. III. A molecular prelude to intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276(4 Pt 1):G795-G799.

Mitchell JA, Sheng H, Forstermann U, Murad F. Characterization of nitric oxide synthases in non-adrenergic non-cholinergic nerve containing tissue from the rat anococcygeus muscle. *Br J Pharmacol* 1991; 104(2):289-291.

- Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 1999; 128(6):1121-1132.
- Mitsuyama K, Toyonaga A, Sata M. Cytokine-targeted therapeutic approaches for inflammatory bowel disease. *Drugs Today (Barc)* 2000; 36(5):281-293.
- Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001; 108(4):601-609.
- Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002; 50 Suppl 3:III60-III64.
- Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1990; 40(4):793-797.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96(3):795-803.
- Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(22):8491-8496.
- Mullin JM, Snock KV. Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability. *Cancer Res* 1990; 50(7):2172-2176.
- Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K, Kudo I. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* 1997; 17(3-4):225-283.
- Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp*

*Immunol* 2000; 120(1):51-58.

Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998; 187(12):2097-2101.

Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998; 43(6):856-860.

Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996; 39(2):234-241.

Nielsen AA, Jorgensen LG, Nielsen JN, Eivindson M, Gronbaek H, Vind I, Hougaard DM, Skogstrand K, Jensen S, Munkholm P, Brandslund I, Hey H. Omega-3 fatty acids inhibit an increase of proinflammatory cytokines in patients with active Crohn's disease compared with omega-6 fatty acids. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(11-12):1121-1128.

Nieto N, Fernandez MI, Torres MI, Rios A, Suarez MD, Gil A. Dietary monounsaturated n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids affect cellular antioxidant defense system in rats with experimental ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *Dig Dis Sci* 1998; 43(12):2676-2687.

Nieto N, Torres MI, Rios A, Gil A. Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr* 2002; 132(1):11-19.

Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999; 398(6724):252-256.

Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(6):1210-1218.

Noroozi M, Burns J, Crozier A, Kelly IE, Lean ME. Prediction of dietary flavonol consumption

from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54(2):143-149.

Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284(1):L84-L89.

O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res* 2004; 551(1-2):245-254.

Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Scholmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 116(2):238-245.

Obrador A, Riera J. Definitions. En: Gassull MA, Obrador A, Chantar C, eds. *Management of Inflammatory Bowel Disease*. Barcelona: Prous Science, 1994: 1-6.

Ocete MA, Galvez J, Crespo ME, Cruz T, Gonzalez M, Torres MI, Zarzuelo A. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. *Pharmacology* 1998; 57(5):261-270.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001; 276(7):4812-4818.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98(3):694-702.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalter B, Bartsch H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* 2000; 1:107-112.

Pacheco S, Hillier K, Smith C. Increased arachidonic acid levels in phospholipids of human

colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Lond)* 1987; 73(4):361-364.

Palozza P, Sgarlata E, Luberto C, Piccioni E, Anti M, Marra G, Armelao F, Franceschelli P, Bartoli GM. n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am J Clin Nutr* 1996; 64(3):297-304.

Panes J, Gerritsen ME, Anderson DC, Miyasaka M, Granger DN. Apigenin inhibits tumor necrosis factor-induced intercellular adhesion molecule-1 upregulation in vivo. *Microcirculation* 1996; 3(3):279-286.

Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(3):311-322.

Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36(5):471-475.

Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53(11):1556-1558.

Plevy S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31(1):77-92.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6):417-429.

Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(31):57-70.

Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C, Thomas GA, Sawe U. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1994; 330(12):811-815.

- Purasiri P, Mckechnie A, Heys SD, Eremin O. Modulation in vitro of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogens and cytokine production by essential fatty acids. *Immunology* 1997; 92(2):166-172.
- Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1989; 97(2):326-337.
- Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut* 1995; 37(2):247-255.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004; 126(2):520-528.
- Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:129-170.
- Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Scholmerich J, Sartor RB. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001; 69(4):2277-2285.
- Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40(6):754-760.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16(3):144-150.
- Renier G, Skamene E, DeSanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb* 1993; 13(10):1515-1524.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and



penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2(4):361-367.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391(6662):79-82.

Roediger WE, Moore J, Babidge W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42(8):1571-1579.

Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124(4):1001-1009.

Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 97(4):900-904.

Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(8):855-862.

Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, Mayer L, Van Hogezand RA, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Van Deventer SJ. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117(4):761-769.

Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, Pique JM, Panes J. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2002; 82(5):597-607.

Salomon P, Kornbluth AA, Janowitz HD. Treatment of ulcerative colitis with fish oil n--3-omega-fatty acid: an open trial. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12(2):157-161.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(15):7240-7244.

Sanchez de Medina F, Galvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278(2):771-779.

Sanchez de Medina F, Perez R, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Lorente MD, Galvez J, Zarzuelo A. Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. *Pflugers Arch* 2002a; 444(3):378-388.

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* 2002b; 70(26):3097-3108.

Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Ballester I, Nieto A, Galvez J, Zarzuelo A. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(12):2317-2326.

Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(12 Suppl):5S-11S.

Sartor RB. Clinical applications of advances in the genetics of IBD. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3 Suppl 1:S9-S17.

Sartor RB. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21(1):44-50.

Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 2002; 196(8):1079-1090.

Scherle PA, Jones EA, Favata MF, Daulerio AJ, Covington MB, Nurnberg SA, Magolda RL, Trzaskos JM. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J Immunol* 1998; 161(10):5681-5686.

Schottelius AJ, Baldwin AS Jr. A role for transcription factor NF-kappa B in intestinal

inflammation. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14(1):18-28.

Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 2000a; 192(8):1197-1204.

Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Gronert K, Chiang N. Anti-microinflammatory lipid signals generated from dietary N-3 fatty acids via cyclooxygenase-2 and transcellular processing: a novel mechanism for NSAID and N-3 PUFA therapeutic actions. *J Physiol Pharmacol* 2000b; 51(4 Pt 1):643-654.

Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 2002; 196(8):1025-1037.

Setoyama H, Imaoka A, Ishikawa H, Umesaki Y. Prevention of gut inflammation by Bifidobacterium in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with Bacteroides strains isolated from ulcerative colitis patients. *Microbes Infect* 2003; 5(2):115-122.

Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985; 5:365-390.

Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990; 171(1):35-47.

Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6(2):107-115.

Sharon P, Stenson WF. Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984; 86(3):453-460.

- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189(11):1777-1782.
- Shimizu T, Igarashi J, Ohtuka Y, Oguchi S, Kaneko K, Yamashiro Y. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E on colonic mucosal leukotriene generation, lipid peroxidation, and microcirculation in rats with experimental colitis. *Digestion* 2001; 63(1):49-54.
- Shintani N, Nakajima T, Okamoto T, Kondo T, Nakamura N, Mayumi T. Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action. *Gen Pharmacol* 1998; 31(3):477-481.
- Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Moriguchi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E. TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(13):8141-8144.
- Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* 2000; 76(898):473-478.
- Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Therapeutic efficacy of N-3 polyunsaturated fatty acid in experimental Crohn's disease. *J Gastroenterol* 1995; 30 Suppl 8:98-101.
- Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(5):741-745.
- Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AJ, Bonomo RP. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub><sup>-</sup>(·). *Free Radic Biol Med* 1991; 11(1):1-8.
- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387(6633):569-572.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(3):438-463.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002; 56(8):365-379.

Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115(2):297-306.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1):76-85.

Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001; 107(12):1491-1495.

Sonnenberg A. Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* 1988; 41(3):161-171.

Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991; 100(1):143-149.

Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(5):372-377.

Speizer LA, Watson MJ, Brunton LL. Differential effects of omega-3 fish oils on protein kinase activities in vitro. *Am J Physiol* 1991; 261(1 Pt 1):E109-E114.

Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest* 1993; 91(2):651-660.

Srivastava ED, Russell MA, Feyerabend C, Rhodes J. Effect of ulcerative colitis and smoking on rectal blood flow. *Gut* 1990; 31(9):1021-1024.

Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal

inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 2003; 52(10):1522-1529.

Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. Microbial-gut interactions in health and disease. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(2):255-270.

Stark AH, Madar Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev* 2002; 60(6):170-176.

Stein RB, Hanauer SB. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf* 2000; 23(5):429-448.

Stenson WF, McDermott RP. Inflammatory Bowel Disease. En: Yamada T, ed. *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: Lippincott Company, 1991: 1588-1645.

Stenson WF, Cort D, Rodgers J, Burakoff R, DeSchryver-Kecskemeti K, Gramlich TL, Beeken W. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 1992; 116(8):609-614.

Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36(5):476-480.

Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997; 18(2):61-64.

Strober W, Ludviksson BR, Fuss IJ. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Ann Intern Med* 1998; 128(10):848-856.

Stocchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran

sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(6):G1298-G1306.

Stulnig TM, Berger M, Sigmund T, Raederstorff D, Stockinger H, Waldhausl W. Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J Cell Biol* 1998; 143(3):637-644.

Stulnig TM, Huber J, Leitinger N, Imre EM, Angelisova P, Nowotny P, Waldhausl W. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J Biol Chem* 2001; 276(40):37335-37340.

Sutherland LR. Clinical course and complications of ulcerative colitis and ulcerative proctitis. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994: 279-295.

Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 1997; 17(11):6274-6282.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122(1):44-54.

Switzer KC, McMurray DN, Morris JS, Chapkin RS. (n-3) Polyunsaturated fatty acids promote activation-induced cell death in murine T lymphocytes. *J Nutr* 2003; 133(2):496-503.

Szulc P, Meunier PJ. Is vitamin K deficiency a risk factor for osteoporosis in Crohn's disease? *Lancet* 2001; 357(9273):1995-1996.

Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol* 2003; 326(1):105-115.

- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997; 337(15):1029-1035.
- Taugog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994; 180(6):2359-2364.
- Teahon K, Smethurst P, Levi AJ, Menzies IS, Bjarnason I. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut* 1992; 33(3):320-323.
- Theis MK, Boyko EJ. Patient perceptions of causes of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(10):1920.
- Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking--a review. *Am J Gastroenterol* 1998a; 93(2):144-149.
- Thomas GA, Swift GL, Green JT, Newcombe RG, Braniff-Mathews C, Rhodes J, Wilkinson S, Strohmeyer G, Kreuzpainter G. Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut* 1998b; 42(4):497-500.
- Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996; 312(7023):95-96.
- Tournier C, Dong C, Turner TK, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 2001; 15(11):1419-1426.
- Toy LS, Yio XY, Lin A, Honig S, Mayer L. Defective expression of gp180, a novel CD8 ligand on intestinal epithelial cells, in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997; 100(8):2062-2071.



Trautwein EA. N-3 fatty acids-physiological and technical aspects for their use in food. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2001; 103:45-55

Travis SP, Jewell DP. Salicylates for ulcerative colitis--their mode of action. *Pharmacol Ther* 1994; 63(2):135-161.

Trebble T, Arden NK, Stroud MA, Wootton SA, Burdge GC, Miles EA, Ballinger AB, Thompson RL, Calder PC. Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. *Br J Nutr* 2003; 90(2):405-412.

Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* 2002; 13(11):636-644.

Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:437-457.

Vainer B, Nielsen OH, Horn T. Comparative studies of the colonic in situ expression of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, -2, and -3), beta2 integrins (LFA-1, Mac-1, and p150,95), and PECAM-1 in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(8):1115-1124.

Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med* 1989; 55(5):420-422.

Van Den Bogaerde J, Cahill J, Emmanuel AV, Vaizey CJ, Talbot IC, Knight SC, Kamm MA. Gut mucosal response to food antigens in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(11):1903-1915.

van Dijk APM, Keuskamp ZJ, Wilson JHP, Zijlstra FJ. Sequential release of cytokines lipid mediators and nitric oxide in experimental colitis. *Mediators Inflamm* 1995; 4:186-190.

van Montfrans C, Peppelenbosch M, te Velde AA, van Deventer S. Inflammatory signal transduction in Crohn's disease and novel therapeutic approaches. *Biochem Pharmacol*

---

2002; 64(5-6):789-795.

van Vliet T, Katan MB. Lower ratio of n-3 to n-6 fatty acids in cultured than in wild fish. *Am J Clin Nutr* 1990; 51(1):1-2.

Vasiliauskas EA, Kam LY, Abreu-Martin MT, Hassard PV, Papadakis KA, Yang H, Zeldis JB, Targan SR. An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117(6):1278-1287.

Verdu EF, Bercik P, Cukrowska B, Farre-Castany MA, Bouzourene H, Saraga E, Blum AL, Corthesy-Theulaz I, Tlaskalova-Hogenova H, Michetti P. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 2000; 120(1):46-50.

Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Martinez M, Malagelada JR. Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut* 1990; 31(5):539-544.

Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Orjales A, La Casa C. A new flavonoid derivative, dosmalfate, attenuates the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Int Immunopharmacol* 2003a; 3(13-14):1731-1741.

Villegas I, La Casa C, Orjales A, Alarcon de la Lastra C. Effects of dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2003b; 460(2-3):209-218.

Viriyakosol S, Kirkland T. Knowledge of cellular receptors for bacterial endotoxin--1995. *Clin Infect Dis* 1995; 21 Suppl 2:S190-S195.

Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995; 117(1):25-32.

Vowinkel T, Kalogeris TJ, Mori M, Kriegelstein CF, Granger DN. Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2004;

49(4):556-564.

Wadsworth TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact* 2001; 137(1):43-58.

Wadsworth TL, McDonald TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(7):963-974.

Wakefield AJ, Sawyerr AM, Dhillon AP, Pittilo RM, Rowles PM, Lewis AA, Pounder RE. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet* 1989; 2(8671):1057-1062.

Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, Pounder RE. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* 1993; 39(4):345-353.

Walker WA, Isselbacher KJ. Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders. *Gastroenterology* 1974; 67(3):531-550.

Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine* 2000; 12(9):1374-1379.

Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr* 2003; 89(5):679-689.

Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 96(1):29-36.

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412(6844):346-351.

- Wang QY, Chen CL, Wang JD, Lai ZS, Ma Q, Zhang YL. Expression of pro-inflammation cytokines and activation of nuclear factor kappaB in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003; 23(11):1202-1205.
- Watkins DN, Garlepp MJ, Thompson PJ. Regulation of the inducible cyclo-oxygenase pathway in human cultured airway epithelial (A549) cells by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1997; 121(7):1482-1488.
- Wheeler MA, Smith SD, Garcia-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest* 1997; 99(1):110-116.
- Whiting CV, Bland PW, Tarlton JF. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(4):340-349.
- WHO Study Group. Report of a Joint Expert Consultation: Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases. *Technical Repor Series*, 2003; No. 916.
- Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(1):69-75.
- Wollenweber E. Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties. Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A, eds. New York: A.R. Liss, 1988: 45-55.
- Woywodt A, Ludwig D, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Jantschek G, Kirchner H, Stange EF. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11(3):267-276.
- Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993; 341(8858):1437-1439.
- Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. Luteolin

inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296(1):181-187.

Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the luteolin. *Br J Pharmacol* 2002; 136(7):1058-1064.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardo M, Herrero C, Soler C, Lloberas J, Celada A. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, activation or apoptosis. *Immunobiology* 2001; 204(5):543-550.

Xi S, Cohen D, Barve S, Chen LH. Fish oil suppressed cytokines and nuclear factor-kB induced by murine AIDS virus infection. *Nutr Res* 2001; 21:865-878.

Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 177(6):1779-1784.

Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269(7):4705-4708.

Yamada T, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative study of two models of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1992; 102, 1524-1534.

Yamada T, Grisham MB. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994: 133-150.

Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 1995; 270(5244):2008-2011.

Yamashita N, Maruyama M, Yamazaki K, Hamazaki T, Yano S. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on natural killer cell activity in human peripheral blood lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 59(3):335-345.

- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 2000; 275(7):4541-4544.
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett* 1994a; 41(2-3):241-247.
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 1994b; 82(4):603-610.
- Yaqoob P. Monounsaturated fats and immune function. *Proc Nutr Soc* 1998; 57(4):511-520.
- Yaqoob P, Calder P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol* 1995; 163(1):120-128.
- Yaqoob P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. *Proc Nutr Soc* 2004; 63(1):89-104.
- Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 1993; 104(3):749-758.
- Yuceyar H, Ozutemiz O, Huseyinov A, Saruc M, Alkanat M, Bor S, Coker I, Batur Y. Is administration of n-3 fatty acids by mucosal enema protective against trinitrobenzene-induced colitis in rats? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999; 61(6):339-345.
- Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J Am Coll Nutr* 2004; 23(1):71-78.
- Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* 2003; 9(8):1646-1656.

Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* 2003; 31(1 Suppl):S105-S111.

**ANEXOS**

---



**ABREVIATURAS**

AA	Ácido araquidónico
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
AGMI	Ácido graso monoinsaturado
AINE	Antiinflamatorio no esteroídico
AP	Fosfatasa alcalina
AP-1	Proteína activadora 1 ( <i>Activator protein 1</i> )
BCA	Ácido bicinchonínico
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea ( <i>bone marrow-derived macrophages</i> )
CD	Célula dendrítica
CMH-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
COX	Ciclooxigenasa
CPA	Célula presentadora de antígeno
CU	Colitis ulcerosa
DHA	Ácido docosahexaenoico ( <i>docosahexaenoic acid</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Ácido docosapentaenoico ( <i>docosapentaenoic acid</i> )
DSS	Sulfato de dextrano sódico ( <i>dextran sulfate sodium</i> )
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético ( <i>ethylene glycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic</i> )
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EPA	Ácido eicosapentaenoico ( <i>eicoapentaenoic acid</i> )
GSH	Glutation reducido
IAE	Índice de la actividad de la enfermedad

---

Ig	Inmunoglobulina
IκB	Subunidad inhibidora κB
IKK	IκB kinasa
IL	Interleucina
INF-	Interferón
JNK	Kinasa aminoterminal de c-Jun ( <i>c-Jun NH<sub>3</sub> terminal kinase</i> )
LOX	Lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
MAPK	Proteín kinasa activada por mitógeno ( <i>mitogen activated protein kinase</i> )
MPO	Mieloperoxidasa
M-SCF	Factor estimulador de colonias de monocitos-macrófagos ( <i>macrophage-colony stimulating factor</i> )
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NFκB	Factor de transcripción nuclear kappa B
NK	Células asesinas naturales ( <i>natural killer</i> )
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
eNOS	NOS endotelial
iNOS	NOS inducible
PAF	Factor activador de plaquetas
PBS	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffer saline</i> )
PG	Prostaglandina
PK	Proteín kinasa
PL	Fosfolipasa
PMN	Polimorfonuclear neutrófilo
PPAR	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas ( <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )

---

SDS	Dodecil sulfato sódico ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida
TBS	Tampón tris salino ( <i>Tris buffer saline</i> )
TCA	Ácido tricloroacético
TCR	Receptor de células T ( <i>T cell receptor</i> )
TGF-	Factor de crecimiento transformante ( <i>transforming grown factor</i> )
Th	Célula T colaboradora ( <i>T helper</i> )
TLR	Receptor tipo <i>toll</i> ( <i>toll like receptor</i> )
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
TX	Tromboxano

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Características diferenciales entre la EC y la CU .....	4
<b>Tabla 2.</b> Ensayos clínicos de AGPI $\omega$ 3 en la EII .....	53
<b>Tabla 3.</b> Contenido en ácidos grasos de las dietas C (aceite de soja), O (aceite de oliva) y $\omega$ (96% aceite de oliva y 4% aceite de pescado del contenido en grasa) .....	74
<b>Tabla 4.</b> Escala de valoración del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en el modelo de colitis experimental inducida por DSS .....	77
<b>Tabla 5.</b> Escala de valoración del daño histológico en el modelo de colitis experimental inducida por sulfato de dextrano sódico .....	86
<b>Tabla 6.</b> Efecto de la administración del DSS en la actividad mieloperoxidasa (MPO), actividad fosfatasa alcalina (AP) y contenido en glutation (GSH) en el modelo de colitis en ratas .....	103
<b>Tabla 7.</b> Efecto de la administración del DSS en la síntesis de LTB <sub>4</sub> , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ en el modelo de colitis en ratas. ....	104
<b>Tabla 8.</b> Efecto de la administración de las dietas O y $\omega$ en la relación peso/longitud y valoración microscópica colónicas en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	109
<b>Tabla 9.</b> Contenido en ácidos grasos en plasma de ratas con colitis inducida por DSS alimentadas con las dietas C, O y $\omega$ .....	116
<b>Tabla 10.</b> Contenido en ácidos grasos en hígado de ratas con colitis inducida por DSS alimentadas con las dietas C, O y $\omega$ .....	117
<b>Tabla 11 .</b> Contenido en ácidos grasos en colon de ratas con colitis inducida por DSS alimentadas con las dietas C, O y $\omega$ .....	118

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Componentes implicados en la etiopatogénesis de la EII .....	7
<b>Figura 2.</b> Microambiente intestinal y genes involucrados en el sistema inmune de la mucosa cuya mutación se intenta relacionar con la EII .....	8
<b>Figura 3.</b> Vías de captación de antígenos en el intestino .....	21
<b>Figura 4.</b> Activación de células dendríticas .....	24
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de tolerancia oral .....	26
<b>Figura 6.</b> Patogénesis de la EII .....	30
<b>Figura 7.</b> Vía del factor nuclear $\kappa$ B .....	33
<b>Figura 8.</b> Vía de las proteín kinasas activadas por mitógenos. ....	35
<b>Figura 9.</b> Estructura y nomenclatura tradicional de ácidos grasos .....	37
<b>Figura 10.</b> Ruta biosintética de los ácidos grasos .....	38
<b>Figura 11.</b> Mecanismos antiinflamatorios de los ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ 3 .....	46
<b>Figura 12.</b> Estructura química de la quercetina y la quercitrina .....	56
<b>Figura 13.</b> Mecanismos antiinflamatorios de los flavonoides .....	63
<b>Figura 14.</b> Diseño experimental .....	76
<b>Figura 15.</b> Evolución del índice de la actividad de la enfermedad a lo largo del período experimental en el modelo de colitis inducida por DSS basado en el criterio descrito en la Tabla 4 .....	96
<b>Figura 16.</b> Cortes histológicos de colon teñidos con hematoxilina y eosina .....	98
<b>Figura 17.</b> Medida de la expresión de COX-2 por Western blot de muestras colónicas de ratas no colíticas y tratadas con DSS .....	105
<b>Figura 18.</b> Medida de la expresión de iNOS por Western blot de muestras colónicas de ratas no colíticas y tratadas con DSS .....	106

---

<b>Figura 19.</b> Evolución del índice de la actividad de la enfermedad en ratas no colíticas, ratas con colitis inducida por DSS y alimentadas con dieta estándar C, dieta O y dieta $\omega$ basado en el criterio mostrado en la Tabla 4 .....	108
<b>Figura 20.</b> Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de la mucosa colónica de ratas no colíticas alimentadas con dieta C, y colíticas por inducción con DSS que recibieron dieta C, O y $\omega$ .....	110
<b>Figura 21.</b> Efecto de las dietas O y $\omega$ en la actividad mieloperoxidasa colónica en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	111
<b>Figura 22.</b> Efecto de las dietas O y $\omega$ en la actividad fosfatasa alcalina colónica en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	111
<b>Figura 23.</b> Efecto de las dietas O y $\omega$ en el contenido colónico de glutation total en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	113
<b>Figura 24.</b> Efecto de las dietas O y $\omega$ en la expresión colónica de iNOS determinada por Western blot, en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	113
<b>Figura 25.</b> Efecto de las dietas O y $\omega$ en la síntesis colónica de TNF $\alpha$ en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	114
<b>Figura 26.</b> Efecto de las dietas O y $\omega$ en la síntesis colónica de LTB $_4$ en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	114
<b>Figura 27.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la evolución del índice de la actividad de la enfermedad en el modelo de colitis inducida por DSS en ratas basado en el criterio mostrado en la Tabla 4 .....	119
<b>Figura 28.</b> Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de la mucosa colónica de ratas no colíticas y colíticas por inducción con DSS, mostrando los efectos del tratamiento con quercitrina (1mg/kg) tras el daño colítico inicial con el agente inflamatorio .....	120
<b>Figura 29.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la actividad mieloperoxidasa colónica en el modelo del DSS en ratas .....	121

---

<b>Figura 30.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la actividad fosfatasa alcalina en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	121
<b>Figura 31.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/mL) en el contenido colónico de glutathion total en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	122
<b>Figura 32.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la síntesis colónica de TNF $\alpha$ en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	122
<b>Figura 33.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) en la síntesis colónica de LTB $_4$ en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	122
<b>Figura 34.</b> Efecto de la quercitrina (1mg/kg) en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	123
<b>Figura 35.</b> Inmunofluorescencia de linfocitos CD3 realizada con el anticuerpo anti-CD3 clon G4.18 en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS .....	124
<b>Figura 36.</b> Inmunofluorescencia de macrófagos realizada con anticuerpo anti-macrófago clon 1C7 en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS .....	125
<b>Figura 37.</b> Inmunofluorescencia de polimorfonucleares neutrófilos realizada con el anticuerpo anti-granulocito clon RP-1 en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS .....	126
<b>Figura 38.</b> Inmunotinción para iNOS realizada en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS .....	128
<b>Figura 39.</b> Inmunotinción para TNF $\alpha$ realizada en secciones histológicas de mucosa colónica de ratas en el modelo de colitis del DSS .....	129
<b>Figura 40.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) sobre la actividad NF $\kappa$ B colónica en el modelo de colitis inducida por DSS en ratas .....	130
<b>Figura 41.</b> Efecto de la quercetina (Q), quercitrina (Qr) y DMSO sobre la viabilidad celular .....	131

<b>Figura 42.</b> Efecto de la quercetina (Q) y la quercitrina (Qr) sobre la producción de citocinas inducidas por LPS .....	132
<b>Figura 43.</b> La quercetina (Q), pero no la quercitrina (Qr) inhibió la expresión de iNOS inducida por LPS en los macrófagos .....	133
<b>Figura 44.</b> La quercetina inhibió la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , pero no afectó a la actividad JNK, ambos procesos inducidos por LPS .....	134
<b>Figura 45.</b> Evolución del índice de la actividad de la enfermedad en ratas no colíticas, ratas colíticas alimentadas con dieta estándar C, con o sin quercitrina, y alimentadas con dieta , con o sin quercitrina (Qr) (1 mg/kg) basado en el criterio mostrado en la Tabla 4 .....	136
<b>Figura 46.</b> Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de la mucosa colónica donde se observa una gran recuperación del daño en el grupo tratado con la asociación de AGPI $\omega$ 3 y quercitrina (1 mg/kg) .....	137
<b>Figura 47.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI $\omega$ 3 en la actividad MPO colónica en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	138
<b>Figura 48.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI $\omega$ 3 en la actividad AP colónica en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	138
<b>Figura 49.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI $\omega$ 3 en el contenido colónico de GSH total en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	139
<b>Figura 50.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI $\omega$ 3 en la expresión de iNOS y COX-2 colónicas en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	140
<b>Figura 51.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI $\omega$ 3 en la síntesis colónica de LTB $_4$ en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	140
<b>Figura 52.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI $\omega$ 3 en la síntesis colónica de TNF $\alpha$ en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	140
<b>Figura 53.</b> Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) y AGPI $\omega$ 3 en la síntesis colónica de IL-1 $\beta$ en el modelo de colitis del DSS en ratas .....	141



**Figura 54.** La administración de DSS en el agua de bebida origina un proceso colítico caracterizado por la liberación de numerosos mediadores proinflamatorios, así como por la inducción de ciertas enzimas ..... 152

**Figura 55.** Mecanismos antiinflamatorios de los AGPI  $\omega$ 3, derivados principalmente del metabolismo de eicosanoides ..... 162

**Figura 56.** Vía de señalización del receptor del LPS ..... 171