

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Farmacología

**Programa Oficial de Posgrado en Inmunología**



**Mecanismo molecular y farmacocinético del  
efecto de los flavonoides en inflamación  
intestinal**

Tesis doctoral para aspirar al grado de doctor presentada por

**Cristina Mascaraque Molina**

Bajo la dirección de los Doctores

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Olga Martínez Augustin

Antonio Zarzuelo Zurita

**Granada, 2014**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Cristina Mascaraque Molina  
D.L.: GR 1355-2014  
ISBN: 978-84-9028-997-6

D. Julio J. Gálvez Peralta, Director del Departamento Farmacología de la Universidad de Granada,

Certifica: que la Tesis Doctoral titulada: “Mecanismo molecular y farmacocinético del efecto de los flavonoides en inflamación intestinal”, ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia Dña. Cristina Mascaraque Molina.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 10 de febrero de 2014.

Dr. Julio J. Gálvez Peralta



El doctorando CRISTINA MASCARAQUE MOLINA y los directores de la tesis FERMÍN SÁNCHEZ DE MEDINA LÓPEZ-HUERTAS, OLGA MARTÍNEZ AUGUSTIN y ANTONIO ZARZUELO ZURITA, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

GRANADA, 10 de Febrero de 2014

Director/es de la Tesis

Dr. Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Dra. Olga Martínez Augustin

Dr. Antonio Zarzuelo Zurita

Doctorando: Cristina Mascaraque Molina

A mi padre

## INDICE

### RESUMEN

1. Introduction
2. Aims
3. Material and Methods
4. Results
5. Conclusions

### INTRODUCCIÓN

1. FLAVONOIDES
  - 1.1. Generalidades
  - 1.2. Farmacocinética
  - 1.3. Flavonoides e inflamación
    - 1.3.1. Estudios *in vivo*
    - 1.3.2. Estudios *in vitro*
  - 1.4. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal (EII)
2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)
  - 2.1. Generalidades
  - 2.2. Epidemiología
  - 2.3. Etiología
    - 2.3.1. Factores genéticos
    - 2.3.2. Factores ambientales
    - 2.3.3. Factores inmunológicos
      - Inmunohomeostasis en el intestino sano
      - Disfunción del sistema inmunológico intestinal
3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RELACIONADAS CON EII
  - 3.1. NF- $\kappa$ B
    - 3.1.1. Señalización de TLR, IL-1R y TNFR hacia NF- $\kappa$ B
  - 3.2. JAK-STAT
  - 3.3. MAPK
4. MODELOS EXPERIMENTALES EN EII
  - 4.1. Modelos experimentales de colitis inducida químicamente
  - 4.2. Modelos espontáneos de colitis
  - 4.3. Modelos de colitis en animales transgénicos
  - 4.4. Modelos de colitis inducida por transferencia celular
5. TRATAMIENTO EN LA EII
  - 5.1. Aminosalicilatos
  - 5.2. Glucocorticoides
  - 5.3. Azatioprina y 6-mercaptopurina
  - 5.4. Metotrexato
  - 5.5. Ciclosporina y tacrolimus
  - 5.6. Terapia biológica
  - 5.7. Terapia génica

### OBJETIVOS

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. REACTIVOS
2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*
  - 2.1. Animales de experimentación
  - 2.2. Inducción de colitis por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)
  - 2.3. Inducción de colitis mediante transferencia linfocitaria
  - 2.4. Inducción de ileítis por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)
  - 2.5. Diseño experimental *in vivo*
    - 2.5.1. Modelo de colitis por TNBS en rata
    - 2.5.2. Modelo de ileítis por TNBS en rata
    - 2.5.3. Modelo de colitis por transferencia linfocitaria en ratón
  - 2.6. Estudio farmacocinético en animales sanos
  - 2.7. Obtención de plasma sanguíneo
3. EVALUACIÓN DEL DAÑO INTESTINAL
  - 3.1. Cuantificación del daño colónico
  - 3.2. Cuantificación del daño ileal
  - 3.3. Histología
  - 3.4. Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) y fosfatasa alcalina (AP) en colon e íleon
4. EXPERIMENTOS *IN VITRO*
  - 4.1. Diseño experimental *in vitro*
  - 4.2. Cultivo de líneas celulares de enterocitos
  - 4.3. Cultivos primarios de células mononucleares
  - 4.4. Purificación celular magnética
  - 4.5. Cocultivo en Transwell® de enterocitos-linfocitos T
  - 4.6. Ensayo de diferenciación de linfocitos hacia Th1
  - 4.7. Silenciamiento de la expresión de genes mediante partículas lentivirales
  - 4.8. Medición de la resistencia transepitelial (TEER)
  - 4.9. Inmunoensayo mediante técnica Multiplex®
  - 4.10. Análisis de flavonoides por HPLC-MS
5. PERMEABILIDAD EPITELIAL CON FITC-DEXTRANO
  - 5.1. Ensayo de permeabilidad epitelial en colon distal de ratón
  - 5.2. Ensayo de permeabilidad epitelial *in vitro*
6. TOXICIDAD Y VIABILIDAD CELULAR
  - 6.1. Ensayo de proliferación por incorporación de timidina triada
  - 6.2. Ensayo de proliferación por WST1
  - 6.3. Ensayo de citotoxicidad por fluorescencia con yoduro de propidio
7. TÉCNICAS GENERALES
  - 7.1. Determinación de la secreción de citoquinas
  - 7.2. Extracción y cuantificación del contenido protéico
  - 7.3. Western Blot
  - 7.4. Extracción de RNA y reacción de retrotranscripción
  - 7.5. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real
  - 7.6. Citometría de flujo
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO



## **RESULTADOS**

1. ESTUDIOS *IN VIVO*
  - 1.1. Efecto de la vía de administración en la actividad antiinflamatoria colónica de rutina y quercetina
  - 1.2. Efecto de la rutina y quercetina en ileítis inducida por TNBS
  - 1.3. Análisis farmacocinético de rutina y quercetina en la mucosa intestinal sana
  - 1.4. Efecto de la rutina por vía oral en el modelo de colitis inducida por transferencia linfocitaria
2. ESTUDIOS *IN VITRO*
  - 2.1. Efecto de los flavonoides sobre enterocitos
    - 2.1.1. Acciones moduladoras de los flavonoides sobre COX2 y NF- $\kappa$ B en enterocitos
    - 2.1.2. Acciones moduladoras de los flavonoides sobre la activación de PRRs, IL-1R y TNFR en enterocitos
  - 2.2. Efecto de la quercetina y rutina sobre linfocitos T
    - 2.2.1. Acciones moduladoras de la quercetina y rutina sobre linfocitos T y Th1
    - 2.2.2. Acciones moduladoras de la quercetina y rutina en un sistema cocultivo enterocitos-linfocitos T

## **DISCUSIÓN**

## **CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONS**

## **REFERENCIAS**

## **ANEXO**

1. Abreviaciones
2. Índice de tablas
3. Índice de imágenes y esquemas
4. Índice de figuras

## **AGRADECIMIENTOS**



# SUMMARY

## 1. INTRODUCTION

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic relapsing inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that encompasses two idiopathic and major inflammatory diseases: Crohn's disease and ulcerative colitis. Both forms of IBD significantly impair quality of life, and require prolonged medical and/or surgical interventions. What makes it particularly challenging is its still unknown cause, its unpredictable presentations and symptoms, the less than optimal treatments, and a rise in its incidence and prevalence in many areas of the world. Several nutraceutical agents have been described to present intestinal antiinflammatory activity.

Flavonoids are polyphenolic compounds of natural origin that are consumed as part of the normal human diet. As much as 200-500 mg may be ingested daily in Western countries (1, 2). There are many different flavonoids in nature, which differ in their degree of oxidation, substituents, polymerization, etc. Many different biological properties have been ascribed to these compounds, including immunomodulatory/antiinflammatory activity (3). Quercetin is a major flavonoid species in vegetables included in the human diet, although it is mostly present in its glycosylated forms, such as quercitrin and rutin. Rutin is a quercetin rhamnoside whose antiinflammatory properties have been documented using *in vivo* experimental models of IBD, asthma and rheumatoid arthritis (3). Since flavonoids in general, and rutin in particular, are considered to have very low toxicity, they may be valuable alternatives for the management of intestinal inflammation.

A number of aglycones, including apigenin, kaempferol, daidzein, genistein or chrysin have been shown to exert intestinal antiinflammatory effects in preclinical models of IBD (4-11). However, a characteristic regarding the use of quercetin is that oral administration of this flavonoid is essentially inactive on experimental models of colitis (12, 13). Instead, the glycoside derivatives of quercetin, rutin (13) and quercitrin (12, 14) exert significant effects in similar *in vivo* models.

The commonly accepted hypothesis is that these compounds are hydrolysed by bacterial enzymes in the colon to yield quercetin (12, 15). Thus rutin (and quercitrin) would act effectively as a prodrug, preventing premature absorption of the flavonoid in the small intestine but releasing it in the colon, where quercetin antiinflammatory ability goes into action. According to this hypothesis, quercetin should be therapeutically active if administered intrarectally, and indeed this is what happens (15). Quercetin is also predicted on this basis to be effective in ileitis, while rutin ought to be inactive. In this study we set out to verify mechanistic aspects of rutin intestinal antiinflammatory action by assessing the influence of the inflammatory site (ileitis vs. colitis), and route of administration (p.o. vs. i.p.) on its anticolitic effect, plus the levels of the flavonoid in the intestinal tissue.

In general, flavonoids target different cell types including macrophages, lymphocytes or intestinal epithelial cells (IEC) and regulate the expression of a plethora of inflammation related molecules. The antiinflammatory effect of many flavonoids has been largely connected to the inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPKs. Nevertheless, stimulation of these signal transduction pathways by those has been observed in basal, noninflammatory conditions (3, 16). In spite of

flavonoids share that profile in most of cellular populations, the information available on IEC is more diverse. The intestinal mucosa, the innermost layer of the intestine, plays an important physiological role by mediating water and nutrient transport and acting as interface with the complex luminal milieu, which comprises a combination of diverse bacteria and their products as well as derivative products of the diet. Specific perturbation of the intestinal epithelium can lead to intestinal inflammation (17).

Thus intestinal epithelial cells (IEC) express various immune receptors and accordingly, they can produce a wide array of immunomodulatory substances such as cytokines and complement factors. Intestinal epithelial cells express cyclooxygenase (COX2) when stimulated by pro-inflammatory factors, including lipopolysaccharide (LPS), tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), oxidative stress, etc. (18). Epithelial prostaglandins seem to be involved in the resolution of inflammation and the healing process (19) as well as in intestinal homeostasis (20). Hence it is possible that agents that promote COX2 induction could be useful in the therapy of inflammatory bowel disease by hastening the resolution of the inflammatory process. Because of the need to clarify the effects of flavonoids on IEC and the mechanism of action of these flavonoids we study the effects and structure-activity relationship of nine different flavonoids (Table 1) on COX-2 expression in IEC18 cells, a non-tumour model IEC line. The different categories of flavonoids assayed differ mainly in the presence or absence of a double bond between C2 and C3, the 3-hydroxyl, and the position of the phenol group (also known as B ring). The substitutions in these basic structures give rise to the different flavonoid compounds.

The role of microbiota in inflammatory bowel disease has been long established. Sensing microbiota antigens involves the stimulation of a series of non specific receptors that mediate the innate immunity. These receptors are termed pathogen-recognition receptors (PPRs) and bind, not specific molecules, but types of molecules that substantially differ from those of eukaryotic cells. PPRs comprise Toll-like receptors (TLRs), nucleotide-binding and oligomerization domains (NODs)-like receptors (NLRs) and the helicase family (retinoic inducible gene I (RIG-I) and differentiation associated gene or MDA5). Although activation of NOD2 and TLRs leads to an inflammatory response, mainly mediated by NF- $\kappa$ B and MAPK, the role and regulation of these receptors is much more complex since their absence leads in many cases to intestinal inflammation, as described for NOD2 mutations in Crohn's disease patients or in knockout mice for different TLRs.

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are proinflammatory cytokines of the innate immune system whose effects are mediated through their respective receptors. As in the case of NODs, the MAPK and NF- $\kappa$ B are activated after the stimulation of these receptors. Inhibition of the activation of these receptors has been widely used as a therapeutic tool. In fact, antibodies against TNF are successfully used to treat inflammatory conditions like inflammatory bowel disease or rheumatoid arthritis. In order to characterize the effect of flavonoids in modulating the activity of different receptors that finally signal through NF- $\kappa$ B and MAPK we chose to study two proinflammatory cytokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and chemokine C-X-C motif ligand 1 (GRO- $\alpha$  or CXCL-1) and the regulation of TLR2, 4, 5, 9, TNF receptor (TNFR), IL1 receptor (IL1R) and NOD2. Furthermore we aimed to ascertain the structural requirements for these effects.

## 2. AIMS

Based on all the above, we proposed 3 main objectives in this Doctoral Thesis:

1. To study the rutin and quercetin pharmacokinetic and their anti-inflammatory effect relationship on small and large intestine.
2. To validate the anti-inflammatory effect of rutin, by using a chronic model of intestinal inflammation T lymphocyte-dependent.
3. To characterize the molecular and cellular mechanism of action, and structure-activity relationship of flavonoids.

## 3. MATERIAL AND METHODS

To carry out these objectives, we use a number of techniques, including tissue culture techniques, RT-qPCR, magnetic cell separation, histology techniques, flow cytometry, shRNA gene silencers, gel electrophoresis and ELISAs as well as experimental models of colitis (TNBS, DSS, lymphocyte transfer model).

## 4. RESULTS

Our results can be divided into two main parts:

### ***IN VIVO.***

Rutin is active in both ileitis and colitis, while quercetin showed only marginal effects. Furthermore, rutin retained much of its colonic antiinflammatory activity when administered by the intraperitoneal rather than the oral route. Parallel experiments carried out in noncolitic rats showed that oral rutin gavage results in significant levels of both rutin and quercetin in the ileal mucosa, while only quercetin was detected in the colonic mucosa. In contrast, i.p. rutin administration increases the levels of both rutin and quercetin in the ileum and colon alike. Orally administered quercetin was found to reach both the ileal and colonic mucosa. To validate the anti-inflammatory effect of rutin, we carry out an *in vivo* experiment in a T cell transfer colitis model. Treatment of mice with 57 mg/Kg rutin improved colitis, as evidenced by a lower body weight loss ( $-0.2 \pm 1.1\%$  vs.  $-1.8 \pm 0.8\%$ , Rut vs. Control,  $p < 0.05$ ), colonic myeloperoxidase ( $42.9 \pm 6.6$  vs.  $64.3 \pm 6$  mU·mg protein<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ ) and alkaline phosphatase activities ( $76.5 \pm 12.4$  vs.  $117.1 \pm 10.2$  mU·mg protein<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ ). In addition, a decreased secretion of proinflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) by mesenteric lymph node cells was observed *ex vivo*. The colonic expression of proinflammatory genes including IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXCL1, S100A8 and IL-1 $\beta$  was significantly reduced with rutin as assessed by RT-PCR. Rutin treatment additionally ameliorated ion transport and reduced activation of STAT4 and IFN- $\gamma$  in the spleen. The 28.5 mg dose resulted only in lower body weight loss and reduced TNF- $\alpha$  release by mesenteric lymph node cells.

## ***IN VITRO.***

- Effects of flavonoids on enterocytes

The effect of flavonoids on COX2 expression by IEC18, depended on the experimental conditions tested [non-stimulated and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated]. Flavonoids caused an increase in COX2 expression and NF- $\kappa$ B-dependent gene transcription under basal conditions. Conversely, under LPS stimulation flavonoids increased, decreased or did not affect COX2 levels depending on the specific type. Variable effects were observed on extracellular signal regulated kinase/p38/c-Jun N-terminal kinase phosphorylation and p50/65 nuclear translocation. In order to assess the effects of flavonoids on enterocyte cytokine secretion, we studied in IEC18 cells, the structure/activity relationship of 9 flavonoids on the regulation of Toll Like Receptors (TLR) 2, 4, 5, and 9, the Nucleotide-binding and Oligomerization Domain 2 (NOD2), the TNF receptor (TNFR) and the IL-1 $\beta$  receptor (IL-1R). Chrysin and diosmetin alone stimulated GRO- $\alpha$  and MCP-1 production. Quercetin, daidzein and genistein inhibited it. Silencing TLR4 and MyD88 with sh-mRNA in IEC18 indicated that the effect of chrysin was independent of TLR4 but depended of MyD88. While flavones only inhibited TLR stimulated GRO- $\alpha$  and MCP-1 production, isoflavones inhibited the activation of all the receptors. Finally, flavonols had a lower inhibitory action than their correspondent flavones.

- Effects of flavonoids on T lymphocytes

Previous studies have been established a proapoptotic/antiproliferative effect of several flavonoids on splenocytes at 50  $\mu$ M under concanavalin A induction. Because lymphocytes are the main population on splenocytes and because concanavalin A is a T cell receptor unspecific activator, we tested the possible immunomodulatory effects of quercetin and its glycoside, rutin, on immunomagnetic isolated T cells at non toxic concentrations. Under these conditions, quercetin only showed lymphocyte immunomodulation in an epithelium-dependent manner; however, rutin showed antiproliferative effects on immunomagnetic isolated T cells. None of the mediators tested seems to be the responsible of those epithelium-dependent effects of quercetin.

## **5. CONCLUSIONS**

1. Rutin shows intestinal antiinflammatory activity in both the colon and ileum, which is favored by oral administration of the flavonoid.
2. The advantage of rutin vs. quercetin in this regard is not related so much to prevention of absorption in the small intestine as to lower metabolism coupled to luminal secretion by the intestinal epithelium, thus extending quercetin presence in the lumen.
3. Rutin is active in a T cell colitis model, giving an additional validation of its therapeutic efficiency.
4. Quercetin exerts antiproliferative effects on rat T lymphocytes at concentrations higher than 30  $\mu$ M and immunomodulatory effects at lower levels, potentiated by a paracrine action on IEC18 cells and, arguably, on the intestinal epithelium in general. Conversely,

rutin has no major direct effects on IEC18 cells or rat T lymphocytes. *In vivo* data support the biological relevance of this mechanism in the antiinflammatory effect of rutin.

5. Flavonoids have modulatory actions on IEC18 cells function, which result in distinct changes in COX2, MCP-1 and GRO- $\alpha$  expression, signaling pathways and barrier function protein levels. These effects depend on the structural features of the flavonoids assayed.



# INTRODUCCIÓN

## 1. FLAVONOIDES

### 1.1. Generalidades

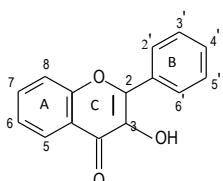
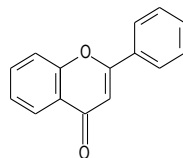
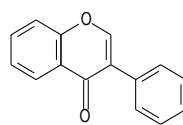
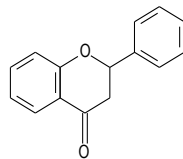
Los flavonoides constituyen una familia de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en frutas, verduras, semillas y flores, donde son producidos como metabolitos secundarios y ejercen diversas funciones entre las que cabe destacar: acción fungicida y bactericida, quelación de metales, protección frente a la radiación ultravioleta, coloración y control de las auxinas reguladoras del crecimiento y de la diferenciación en los vegetales. Debido a su amplia distribución, son consumidos como parte de la dieta por los humanos en cantidades significativas. Los flavonoides fueron descubiertos en los años 30, pero el interés inicial por ellos decayó en los años 50 al constatarse que no eran micronutrientes esenciales para el hombre (Joint-Committee-Nomenclature-ASBC-AIN, 1950). Sin embargo, a partir de los años 90, tras la publicación de varios estudios epidemiológicos que demostraban una correlación inversa entre el consumo diario de flavonoides y las tasas de incidencia y mortalidad de enfermedades cardiovasculares y cáncer (21-24), se produjo una gran expansión en el estudio de estos compuestos. Hoy en día, se han publicado más de 30.000 estudios sobre flavonoides.

La estructura clásica de los flavonoides está constituida por un esqueleto difenilpirano (C3-C6-C3), compuesto por dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B del 2' al 6' (Tabla 1). Este esqueleto es común a todos ellos, y la clasificación básica de los cuatro subtipos flavonoides se basa en la posición del anillo B, en la presencia o ausencia de un doble enlace en 2-3 del anillo C y en la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C (Tabla 1). Además, la mayoría de los flavonoides se encuentran en forma de heterósidos, lo que en sí constituye otra variante estructural. Entre los azúcares que forman parte de su estructura se incluyen la D-glucosa, L-ramnosa, glucoramnosa, galactosa y arabinosa. Así, se pueden resumir los tipos más importantes de flavonoides en:

1. Flavonoles: representados por la quercetina y el kaempferol. Poseen un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonas: como la diosmetina, apigenina, luteolina y crisina. Carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
3. Isoflavonas: representados por la genisteína y la daidzeína. Posee el anillo B en posición 3 o *iso*, a diferencia del resto de los grupos.
4. Flavanonas: representados por la hesperetina y la naringenina. Carecen de doble enlace en posición 2-3.

La presencia generalizada de flavonoides en los alimentos implica su consumo regular en una dieta normal (25), aunque el consumo diario varía dependiendo de los hábitos dietéticos de una población determinada. Entre los flavonoides, los flavonoles son los más abundantes y están ampliamente distribuidos en la naturaleza y entre ellos la quercetina es el mayoritario en alimentos vegetales. Recientemente, Noroozi y col. (26) han establecido que la ingesta media de flavonoles está comprendida entre los 20 y 35 mg por día, de los cuales el 91% está constituido por la quercetina y sus glucósidos. De hecho, la quercitrina y la rutina, ambos

heterósidos de la quercetina, son los flavonoides más comunes en la dieta, siendo sus principales fuentes las cebollas (350-1200 mg/Kg), la col rizada, el puerro y los tomates(23).

Fórmula química	Nombre	Sustituciones			
		5	7	3'	4'
<b>Flavonoles</b>					
	Kaempferol	OH	OH	H	OH
	Quercetina	OH	OH	OH	OH
<b>Flavonas</b>					
	Apigenina	OH	OH	H	OH
	Crisina	OH	OH	H	H
	Diosmetina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
	Luteolina	OH	OH	OH	OH
<b>Isoflavonas</b>					
	Daidzeína	OH	H	H	OH
	Genisteína	OH	OH	H	OH
<b>Flavanonas</b>					
	Hesperetina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
	Naringenina	OH	OH	H	OH

**Tabla 1:** Estructura y numeración de los flavonoides.

## 1.2. Farmacocinética

### Absorción

La mayor parte de los flavonoides presentes en la dieta se encuentran en forma de glucósidos. De los aproximadamente 2000 glucósidos de flavonoides conocidos, quercitrina, rutina y robinina son los más comunes en la dieta, siendo la quercitrina y la rutina glucósidos de la quercetina y la robinina del kaempferol, ambos flavonoles. Clásicamente se ha asumido que los glucósidos no son absorbibles (27), su gran tamaño y alta polaridad los haría incapaces de ser absorbidos tras una administración oral; sin embargo, estos glucósidos sí podrían ser

hidrolizados mediante enzimas bacterianas, en las partes bajas del intestino, obteniéndose sus agliconas y éstas a su vez, podrían ser parcialmente absorbidas o biotransformadas por bacterias. En este sentido, en 1972 Griffiths y Barrow observaron que la ingesta de glucósidos de flavonoides por ratas desprovistas de microbiota intestinal daba lugar a la excreción de estos compuestos de forma no hidrolizada en heces (28).

Este paradigma fue cuestionado por Hollman et al. en 1995, los cuales propusieron que los glucósidos de los flavonoides podían ser absorbidos como tales en el intestino delgado, concluyendo además, que tal absorción era mejorada con la conjugación del flavonoide con glucosa (29). En este estudio utilizaron una dieta basada en cebolla que contiene una mezcla de glucósidos de quercetina. Este trabajo inició un intenso y controvertido estudio de este tema. Por un lado, se ha demostrado que esta hipótesis era correcta, asignando a diferentes receptores la capacidad de transportar los glucósidos desde la cara apical del epitelio, tales como SGLT1 (sodium-glucose transport protein 1) o MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) (30-32) pero por otro lado, se ha demostrado un eflujo de glucósidos en la línea celular de células epiteliales intestinales de adenocarcinoma humano Caco-2, pudiéndose ver reducida la eficiencia real de tal absorción (32).

Por otro lado, también existen discrepancias en cuanto a la hidrólisis que sufren los glucósidos previa a la absorción. Un elevado número de trabajos apoyan la idea de que los glucósidos no son absorbidos de forma intacta, en la medida en que no alcanzan la circulación sistémica como tales glucósidos, sino que son hidrolizados previamente, por medio de enzimas intestinales (33, 34) o de la microbiota (27, 28, 35, 36). Sin embargo, otros trabajos han demostrado la presencia de glucósidos como tales en circulación sistémica sugiriendo una absorción intacta de estos compuestos (37, 38).

En el caso de las agliconas sin embargo, existe un acuerdo generalizado en su capacidad para ser absorbidas como tales, tras generarse mediante hidrólisis de sus correspondientes glucósidos a lo largo del tracto gastrointestinal.

### **Metabolismo**

Los flavonoides comienzan a metabolizarse en el intestino. En este sentido, el flavonoide más estudiado es la quercetina, la cual es capaz de acceder a las células epiteliales intestinales, por un mecanismo aún en debate (39), y comienza a metabolizarse durante su absorción por enzimas de fase II presentes en dichas células generándose diversos derivados conjugados. Estudios *in vitro* con la línea celular Caco-2 han demostrado que las células epiteliales intestinales humanas presentan actividad fenol sulfotransferasa (PST), catecol-O-metil transferasa (COMT) y uridina 5`-difosfato-glucuronosiltransferasa (UGT) (40), con lo que una vez absorbida, la quercetina sufre procesos de sulfatación, metilación y conjugación con derivados del ácido glucurónico, respectivamente, en el interior del enterocito. La glucuronidación es un proceso que ocurre de forma rápida, generándose altas concentraciones de metabolitos, lo que justifica que los derivados glucurónidos sean más abundantes que los metilados y sulfatados. La isorramnetina es el derivado metilado en la posición 3` de la quercetina que, una vez generado, también es susceptible de conjugarse en el enterocito. En consecuencia la quercetina alcanza el dominio basolateral fundamentalmente como conjugados de quercetina, en segundo lugar como conjugados de isorramnetina, y en mucha menor medida como quercetina o isorramnetina libres (41-45). También se dan procesos de

secreción pero sólo se han observado quercetina, conjugados de quercetina y conjugados de isorramnetina, no isorramnetina aislada, en estas secreciones. Erlund et al. encontraron niveles aceptables de glucurónidos de quercetina y/o conjugados sulfatados en plasma, pero no de la aglicona libre (46).

Además de estas transformaciones por enzimas intestinales, las agliconas también son susceptibles de ser metabolizadas por las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal, produciéndose ácidos fenólicos y aromáticos, principalmente ácido 3, 4-dihidroxifenil acético, ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil acético y ácido 3-hidroxifenil acético (45, 47).

### **Distribución**

Gracias al empleo de flavonoides marcados radiactivamente se ha podido determinar la distribución de los mismos en animales de experimentación. De esta manera se puso de manifiesto que de 1 a 6 horas tras la administración de una dosis única en ratas o ratones, estos compuestos se encuentran principalmente distribuidos en sangre y en tejidos del sistema digestivo, como estómago, intestino e hígado (48, 49). De forma menos abundante, también se han detectado en otros tejidos como cerebro, células endoteliales, corazón, riñones, páncreas, huesos, pulmones, testículos y tejido adiposo blanco (50-52). Los metabolitos presentes en tejidos podrían ser diferentes de los encontrados en sangre, debido a la entrada o la eliminación tisular específica de algunos metabolitos, o a su metabolización intracelular. Aunque existen pocos estudios al respecto, no parece existir una relación directa entre las concentraciones plasmáticas y tisulares de los flavonoides, y además la distribución entre sangre y tejidos varía dependiendo del flavonoide en cuestión (53). Una característica de la biodisponibilidad de la quercetina, que la diferencia de la mayoría de los flavonoides, es la lenta eliminación de sus metabolitos, con una vida media entre 11 y 28 horas (54), lo que facilita su acumulación en plasma y tejidos tras dosis repetidas o un consumo frecuente de productos vegetales.

### **Excreción**

Los flavonoides pueden ser excretados por la vía urinaria o renal, dependiendo del tamaño y conjugación del metabolito en cuestión. En un estudio con quercetina [<sup>14</sup>C], la principal vía de excreción encontrada para la quercetina fue en forma de dióxido de carbono (23-81%), lo que enfatiza la importancia de las bacterias en la parte inferior del intestino como última etapa en la eliminación de éste y de otros muchos flavonoides (55).

Por otra parte, la excreción urinaria de la quercetina y sus glucósidos es del 0.3-1.4% de la dosis ingerida (54), o  $2.5 \pm 1.2\%$  según el resultado global de 97 estudios realizados sobre biodisponibilidad de flavonoides (56). Estos valores no están muy alejados entre sí e indican una importante excreción biliar, lo que concuerda con su intenso metabolismo.

## **1.3. Flavonoides e inflamación**

Los flavonoides son compuestos con una gran variedad de propiedades no sólo de carácter antiinflamatorio. Sin embargo, debido al tema principal de esta Tesis Doctoral, nos

centraremos en las propiedades de los flavonoides que son relevantes en los trastornos inflamatorios. Los estudios *in vivo* se clasificarán por enfermedades y los *in vitro* serán presentados por tipo celular.

### **1.3.1. Estudios *in vivo***

#### **Artritis reumatoide**

Un destacado número de flavonoides y polifenoles (incluyendo rutina, quercetina, resveratrol, hesperidina, catequina, entre otros) en general son activos en modelos de artritis reumatoide, tales como la artritis inducida por colágeno y adjuvantes (57-67). Los mecanismos de acción están actualmente poco definidos pero incluyen inhibición de la diferenciación y función de osteoclastos/macrófagos (62, 65), modulación estrogénica (58), inhibición de NFAT (nuclear factor of activated T-cells) (59), inhibición de ADAMTS (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif) (63) y depresión general del sistema inmunológico (60). Un reciente ensayo clínico con derivados de hesperidina de elevada solubilidad está dando resultados prometedores en este sentido (61).

#### **Encefalomiелitis alérgica experimental**

La encefalomiелitis alérgica experimental constituye un modelo de esclerosis múltiple ampliamente utilizado. Es inducida en ratones mediante una inyección de adjuvante de Freund y la glicoproteína mielina, produciendo una reacción inmunológica Th1/Th17. Algunos flavonoides han sido probados en este modelo, incluyendo resveratrol, baicalina, genisteína y silibinina (68-71). El resveratrol induce apoptosis de linfocitos T, preferentemente activados pero también quiescentes, mediante acciones en los receptores estrogénicos (70). Los mecanismos son de los otros flavonoides ensayados son esencialmente desconocidos.

#### **Asma**

El potencial antialérgico de los flavonoides ha sido revisado recientemente (72). Los parámetros clásicamente examinados en modelos de asma, como el modelo por sensibilización con ovoalbúmina, incluyen broncoconstricción, hiperreactividad bronquial, anti-IgE, infiltración eosinofílica y secreción de citoquinas como interleucina 4 (IL-4), IL-5, o interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Las flavonas y flavonoles resultan especialmente activos en este modelo. Específicamente la luteolina ha demostrado reducir los niveles de IgE específica para ovoalbúmina en suero, incrementar los niveles de IFN $\gamma$  y disminuir los de IL-4 e IL-5 en el fluido broncoalveolar a dosis de 0.1 mg/Kg (73). En el mismo modelo, dietas enriquecidas con apigenina o crisina disminuyeron la producción de IgE y citoquinas como IL-4 o IL-13 en esplenocitos *ex vivo* (74). En cuanto a los flavonoles, la quercetina y su glucósido rutina fueron ensayados en una variante del modelo por sensibilización con ovoalbúmina en cobayas, donde indujeron niveles reducidos de histamina, fosfolipasa A<sub>2</sub>, peroxidasa eosinofílica e infiltración neutrofílica/eosinofílica (75, 76). Derivados de la quercetina tales como O-metilquercetina 5, 7, 3', 4'-O-tetracetato y quercetina 3-O-metiléter son también activos, protegiendo frente a la broncoconstricción, reduciendo la infiltración eosinofílica y disminuyendo los niveles de IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ) (77).

#### **Aterosclerosis**

Debido a su protección antioxidante, los polifenoles en general y los flavonoides en particular, han recibido mucha atención en el contexto de la prevención de la enfermedad cardiovascular. Sin duda, el compuesto más estudiado en este sentido es el resveratrol y, aunque no es un flavonoide, por su naturaleza polifenólica merece atención en este apartado. Este polifenol ha demostrado efectos protectores en el modelo de aterosclerosis en ratones deficientes en ApoE, afectando a los niveles de lípidos en sangre y actuando sobre la placa de ateroma (78). El mecanismo, al menos en parte, parece ser antiinflamatorio ya que se han descrito niveles reducidos de ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular-1, intercelular adhesion molecule-1) y VCAM-1 (molécula de adhesión vascular-1, vascular cell adhesion molecule-1) en vasos sanguíneos ateroscleróticos. Apoyando estos resultados, la administración de resveratrol también moduló los niveles lipídicos en ratas Zucker, un modelo de obesidad que en estadios de avanzada edad presenta alteraciones similares a las encontradas en la diabetes tipo II (79). Sin embargo, en un estudio con conejos alimentados con dietas hipercolesterolémicas, el resveratrol no mostró ningún beneficio a este nivel (80). Entre los flavonoides, los flavonoles morina, miricetina y fisetina han mostrado proteger frente a la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad, low density lipoproteins) (81). Además, se ha demostrado que los macrófagos localizados en las placas ateroscleróticas son capaces de captar conjugados de la quercetina y convertirlos en la aglicona, considerada como la fracción activa a nivel de la aorta (51).

#### **Síndrome metabólico**

Además de los efectos mencionados a nivel circulatorio, varios flavonoides han demostrado limitar el componente inflamatorio de la obesidad en modelos animales. Así, la administración de quercetina vía oral a ratas Zucker mejoró el estado general de los animales, controló la hipertensión, la dislipemia y la hiperinsulinemia, y disminuyó los niveles de TNF- $\alpha$  e iNOS (óxido nítrico sintasa inducible, inducible nitric oxide synthase) de la grasa visceral (82). En este modelo, el resveratrol tuvo los mismos efectos beneficiosos que la quercetina, incluso más destacados en algunos casos (79). Parte de los efectos del resveratrol en el control de la resistencia a la insulina pueden derivar de la activación de PPAR- $\gamma$  (receptor activado por proliferadores de peroxisomas- gamma, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma), como se observó en adipocitos cultivados (83). Por su parte, la naringenina ha demostrado reducir la producción de citoquinas proinflamatorias en modelos *in vivo* e *in vitro* de obesidad (84).

#### **Miscelánea de actividades antiinflamatorias *in vivo***

Muchos flavonoides presentan una actividad anticancerosa directa, tema que no va a ser recogido extensamente en esta introducción. No obstante, sí merece la pena indicar que los flavonoides pueden contribuir a la defensa antineoplásica modulando la respuesta inmunológica. Así, la genisteína vía oral ha mostrado protección contra la carcinogénesis mediante inmunoregulación, disminuyendo los linfocitos T reguladores (Treg) y mejorando la citotoxicidad de células T y NK (natural killers) (85). Un alto número de flavonoides protegen frente al shock o estimulación inmunológica inducida por LPS (lipopolisacárido) en modelos con animales de experimentación, incluyendo rutina, apigenina o hesperidina (86-93). Estos efectos derivan fundamentalmente de la inhibición de la actividad de los monocitos. Y la quercetina protege contra el shock anafiláctico (94).

### 1.3.2. Estudios *in vitro*

Existe un impresionante número de estudios *in vitro* relacionados con las acciones antiinflamatorias/inmunomoduladoras de los flavonoides. Este tipo de experimentos resulta más simple de realizar que los estudios *in vivo*, explicando la gran cantidad de material presentada en esta sección. Nos centraremos en los efectos mecanísticos por tipo celular, extrapolando en caso de ser relevante, a efectos *in vivo*.

#### Efectos sobre macrófagos

Dada la gran variedad de trabajos que describen los diferentes efectos de los flavonoides sobre esta población celular, y con la finalidad de facilitar la lectura, se describirán tales efectos por subtipo de flavonoide.

Entre los flavonoles, Wang et al. observaron que la fisetina, la quercetina y el kaempferol inhiben de forma concentración dependiente la producción de óxido nítrico (NO) y la inducción de iNOS y COX2 (cyclooxygenase 2) en la línea celular de monocitos/macrófagos murina Raw264.7, siendo la inhibición alrededor del 70% a la concentración de 10  $\mu$ M (95). En este mismo trabajo, la miricetina y la morina presentaron menos actividad, sugiriendo que la presencia del grupo OH en posición 2' reduce la actividad. Ninguno de los flavonoides estudiados resultó tóxico a esas concentraciones, una observación por otra parte compartida en la mayoría de los estudios. Ya en este estudio se apunta que tales efectos pueden deberse a una inhibición de la unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear activador de la cadena ligera kappa de células B activadas, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) a los elementos de respuesta de genes diana, resultados que fueron confirmados por Kim et al. en esta misma línea celular y para el caso específico de la quercetina (96). En otra línea celular, en este caso monocítica humana, THP-1, examinaron los efectos de nuevo de la quercetina en la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, mostrando una inhibición en la producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1, monocyte chemotactic protein-1) e IP-10 (proteína inducida por interferon gamma 10, interferon gamma-induced protein 10) (97). Una reducción de la producción de citoquinas y quimioquinas también se observó al exponer quercetina a astrocitos humanos estimulados con IL-1 $\beta$ . En estos estudios se describió además una reducción del estrés oxidativo mediada por quercetina (98). También se pueden encontrar estudios con macrófagos derivados de médula ósea, un modelo celular más fisiológico, donde la quercetina, pero no el kaempferol, presenta efectos antiproliferativos e inhibidores de iNOS y TNF- $\alpha$  así como inductores a bajas concentraciones de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (99, 100). Estudios de nuestro grupo de investigación indican que la correlación entre la interferencia de la vía NF- $\kappa$ B la inhibición de TNF- $\alpha$  por parte de la quercetina no es perfecta (aunque sí en el caso de iNOS) sugiriendo que otras vías de señalización puedan estar involucradas. A este respecto, la quercetina se ha relacionado con una inhibición de las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos, mitogen-activated protein kinases) en macrófagos peritoneales de rata (101). Es interesante además destacar que la quercetina puede actuar en parte modulando el factor MNSFbeta (factor supresor no específico monoclonal beta, monoclonal non-specific supresor factor beta), regulador de ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares, extracellular signal-regulated kinases), una de las más conocidas MAPK (proteín quinasas activadas por mitógenos, mitogen-activated protein



kinases) en células Raw264.7 (102). Estos datos ayudan a concluir que los flavonoides inhiben la maduración de macrófagos, inhibiendo la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Esta inhibición depende en parte, aunque no exclusivamente, del NF- $\kappa$ B, destacando la quercetina como flavonol más activo.

Las flavonas son también muy activas. Así, luteolina y crisina inhiben la producción de prostaglandina E sintasa en la línea celular Raw264.7, pero solo la luteolina afecta a la expresión de COX2, sugiriendo diferentes mecanismos de inhibición para ambas flavonas (103). En concordancia con este efecto inhibitorio, la luteolina (5-25  $\mu$ M) también afecta a la producción de iNOS/NO, IL-6 y TNF- $\alpha$  dependiente de LPS en macrófagos alveolares de ratón, exhibiendo un espectro de efectos más amplio que los flavonoles. Estos efectos de la luteolina parecen estar mediados por la inhibición de NF- $\kappa$ B a diferentes niveles (fosforilación I $\kappa$ B- $\alpha$ , translocación y unión al DNA), junto con acciones sobre Akt (también conocida como proteína quinasa B) y AP-1 (proteína activadora-1, activator protein-1). En este estudio, la IL-10 no se vio afectada en ningún caso (104). Sin embargo en macrófagos derivados de médula ósea se ha descrito que la luteolina es capaz de aumentar la expresión de IL-10 a nivel de mRNA, pero sólo a concentraciones superiores a 50  $\mu$ M (99). Otra flavona muy activa, la apigenina, mostró efectos en la línea celular murina de la microglia BV-2, inhibiendo la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS) y COX2, efecto mediado por las MAPKs p38 y JNK (quinasa N-terminal de c-Jun, c-Jun N-terminal kinase), pero no por ERK (105). La apigenina también ha mostrado efectos inhibitorios, al menos a nivel transcripcional, sobre la producción de quimioquinas proinflamatorias como MCP-1 en células J774.2, una línea celular de monocitos/macrófagos derivada de ratones Balb-c.

Un estudio de relación estructura-actividad en macrófagos derivados de médula ósea estableció que los requerimientos estructurales de flavonoles y flavonas eran similares para su actividad, concretamente se describió que cuatro hidroxilaciones en las posiciones 5, 7, 3' y 4', junto con un doble enlace en C2-C3 y el anillo B en posición 2 potenciaban la actividad (99).

Las isoflavonas, a diferencia de los dos subtipos anteriores, presentan efectos más contradictorios sobre esta población celular. En el caso de la genisteína, se pueden encontrar estudios en células Raw264.7, donde la isoflavona inhibe la producción de NO así como la liberación de ácido araquidónico, aunque a concentraciones relativamente altas (50  $\mu$ M) (106). Por el contrario, en la misma línea celular, Nakaya et al. observaron un efecto potenciador a este mismo nivel, tanto de genisteína como de daidzeína, junto con un incremento en la producción de TNF- $\alpha$  (107). No obstante, Resultados contradictorios se describen en un estudio realizado con monocitos de pacientes de hemodiálisis, donde la genisteína bloqueó la expresión de TNF- $\alpha$  aunque no de IL-6 (108). En macrófagos derivados de médula ósea también se detectó una reducción en la secreción de TNF- $\alpha$  por parte de ambas isoflavonas, mediante un mecanismo de señalización poco claro, posiblemente no relacionado con la fosforilación de I $\kappa$ B (99). Esta variedad de resultados hace complicado el establecimiento de una conclusión precisa acerca del efecto de las isoflavonas sobre este tipo celular, sin embargo de forma muy general sobresale una actividad antiinflamatoria que en cualquier caso es mucho más limitada que en el caso de flavonoles y flavonas.

El último gran subtipo de flavonoides, las flavanonas, muestran la misma tendencia inhibitoria sobre macrófagos/monocitos. Concretamente, existen estudios en células Raw264.7 en los que la hesperetina y hesperidina bloquearon la expresión de COX2 inducida por LPS. En estos estudios se sugiere que tal efecto antiinflamatorio puede venir asociado a sus efectos antioxidantes. A nivel de secreción de citoquinas proinflamatorias las flavonas poseen carácter antiinflamatorio, ya que la hesperetina reduce la secreción de TNF- $\alpha$  en macrófagos derivados de médula ósea, mientras que la naringenina inhibe IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en macrófagos activados por LPS. Se ha sugerido que el factor de AP-1 podría estar involucrado en tal efecto (99, 109, 110). A pesar de que los trabajos al respecto son más escasos que en el caso de flavonoles y flavonas, al igual que en estos subtipos, se puede concluir que los efectos presentados por flavanonas sobre macrófagos son de carácter inhibitorio.

Finalmente, también encontramos estudios donde se examina el efecto de glucósidos sobre macrófagos. Aunque en general la glucosilación disminuye el efecto de los flavonoides (111), existen glucósidos que presentan actividad, tal es el caso de los glucósidos de la quercetina, quercitrina y rutina que han demostrado inhibir la producción de NO así como de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 en macrófagos peritoneales (112).

#### **Efectos sobre células dendríticas**

Varios estudios muestran que una gran variedad de polifenoles exhiben actividades inmunoregulatorias, particularmente en células dendríticas (113-115). Como ejemplo de ello, Yoon et al. demostraron por primera vez que la flavona apigenina es capaz de inhibir tanto la maduración fenotípica como funcional de células dendríticas murinas aisladas de médula ósea (BMDC) mediante la atenuación de la expresión de los marcadores CD80, CD86 y MHCII (complejos principales de histocompatibilidad I y II, major histocompatibility complexes I/II) e impidiendo la generación de la subunidad p70 de la IL-12 (IL-12p70), respectivamente. Como resultado, la capacidad para inducir una polarización Th1 se vio disminuida y como consecuencia células T naïve expuestas a células dendríticas, previamente tratadas con apigenina, generaron bajos niveles de IFN- $\gamma$ . En este estudio la apigenina también demostró su capacidad para impedir los mecanismos subyacentes a la activación de BMDC por LPS, efectos que se relacionaron con una inhibición de ERK1/2, JNK y p38, así como con una inhibición de la translocación nuclear de p65 (116). La EGCG (epigallocatequina galato) también mostró acciones sobre esta población celular. Así, se han demostrado efectos inhibitorios sobre la producción de IL-12 inducida por LPS en BMDC (117) y sobre la expresión de CD83, CD80, CD11c y MHCII, impidiendo la endocitosis y como consecuencia la activación de células T, resultando en un efecto inmunosupresor (118). Los mismos efectos se han encontrado en el caso de la morina (119). También existen estudios realizados con la isoflavona genisteína que apuntan a una inhibición de la liberación de IL-6 por parte de células dendríticas derivadas de monocitos, actuando sobre la vía no clásica de NF- $\kappa$ B como principal mecanismo de acción (120).

Cabe señalar, que a pesar de la vital importancia de este tipo celular en la iniciación de la respuesta inmunitaria mediada por células, los estudios realizados hasta la fecha con compuestos polifenólicos en general son limitados. No obstante, los estudios disponibles sugieren un efecto inhibitorio de los flavonoides sobre la maduración de las células dendríticas,

afectando principalmente a la expresión de moléculas coestimuladoras y a la secreción de IL-12.

### **Efectos sobre linfocitos**

Existen comparativamente pocos estudios sobre los efectos de los flavonoides en linfocitos, y la mayoría de ellos se centran en los efectos sobre la proliferación en cáncer más que en la modulación inmunológica. En este apartado relataremos solamente los efectos descritos sobre la respuesta inmunológica en linfocitos.

La flavona apigenina parece ser especialmente activa sobre este tipo celular (16, 121-123). De forma general se le atribuye efecto antiproliferativo sobre linfocitos, junto con otros efectos específicos, como citotoxicidad o efectos sobre la maduración, en función del estudio realizado. Así, se ha descrito que la apigenina ejerce efectos citotóxicos/antiproliferativos en esplenocitos de rata (50  $\mu$ M) (16), que inhibe de forma significativa la proliferación y activación de células T (121) o que ejerce efectos antiproliferativos sobre células T primarias de ratón, sin indicios de toxicidad (124). A nivel de liberación de citoquinas proinflamatorias, la apigenina inhibe la liberación de IL-4 en células de ganglios linfáticos, efecto que parece mediado por la inhibición de la unión de NFAT (factor nuclear de células T activadas, nuclear factor of activated T-cells) al DNA (123), conclusión que difiere de la encontrada en otro estudio en una línea celular hematopoyética donde relacionan la inhibición de IL-4 con la vía JAK3/STAT6 (quinasa Janus 3/transductor de señal y activador de la transcripción 6, Janus kinase 3/signal transducer and activator of transcription 6) (122). Aunque hay menos información al respecto, otras flavonas como la luteolina, también presentan efectos similares a los de la apigenina, a nivel tanto antiproliferativo (50  $\mu$ M) como de inhibición de IL-4 (16, 122). Los flavonoles también resultan activos sobre linfocitos y básicamente a los mismos niveles que las flavonas, de hecho la quercetina ejerce un efecto citotóxico/antiproliferativo sobre esplenocitos de rata, mientras que fisetina, kaempferol y morina inhiben la liberación de IL-4 vía JAK3/STAT6 en el mismo (122). Además la morina reduce la activación de esplenocitos por concanavalina A y la expresión de CD69 (125). La rutina, glucósido de la quercetina, también parece presentar efectos antiproliferativos y proapoptóticos en esplenocitos o timocitos estimulados con concanavalina A (Con A) y por el contrario efectos antiapoptóticos y un aumento de los niveles de IL-10 bajo estimulación con LPS. Por tanto la rutina exhibe diferentes efectos sobre preparados celulares de timo y bazo que contienen distintas proporciones de linfocitos B y T y de macrófagos (126). El metabolito de la quercetina, isoramnetina, fue de forma general menos activo, sugiriendo que la biotransformación de la quercetina puede explicar la ausencia de efectos *in vivo*, incluso por vía parenteral. En cuanto a la isoflavonas, se ha descrito que la genisteína también resulta citotóxica/antiproliferativa para esplenocitos de rata (50  $\mu$ M) (16). Sin embargo, incrementa la producción de IL-4 mediante la modulación de la vía NFAT y PKC-p38-AP1, lo que indica que las isoflavonas pueden presentar efectos contrarios a flavonas y flavonoles sobre la respuesta Th2 (127).

En suma, las acciones de los flavonoides sobre linfocitos Th son de tipo inhibitorio y afectan principalmente a la proliferación y viabilidad celular.

### **Efectos sobre mastocitos**

La información existente indica de forma general que los flavonoides ejerce un efecto inhibitorio sobre la activación de mastocitos. Trabajos con la línea celular HMC-1 (human leukemic mast cells) muestran que la quercetina inhibe la secreción de citoquinas (IL-6 inducida por IL-1 $\beta$ ), involucrando a las vías p38 y NF- $\kappa$ B (128, 129). También la hesperidina, glucósido de la hesperetina, actúa a este mismo nivel inhibiendo la liberación de citoquinas, así como la expresión de HIF1- $\alpha$  (factor inducible por hipoxia 1- $\alpha$ , hipoxia inducible factor 1- $\alpha$ ) y la subsiguiente producción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular, vascular endothelial growth factor) actuando, al menos en parte, vía ERK (130). Se ha descrito también que la flavona luteolina es muy activa inhibiendo la activación de mastocitos *in vitro* (131).

### **Efectos sobre neutrófilos, eosinófilos y basófilos**

Posiblemente el estudio más significativo sobre polimorfonucleares (PMN) y flavonoides sea el de Moreira et al., un estudio de relación estructura-actividad llevado a cabo con quercetina, kaempferol, miricetina y galangina (132). En éste destacó la quercetina como el flavonol más activo en cuanto a inhibición de la desgranulación y de la secreción de elastasa. Otros estudios también muestran la capacidad de la quercetina para inhibir la secreción de IL-6, incrementar la expresión de CD62L y reducir la de CD11b/CD18 así como para generar superóxido en neutrófilos estimulados (133). A nivel de basófilos se ha encontrado que quercetina, fisetina y apigenina, pero no la taxifolina, hesperetina o glucósidos, inhiben su desgranulación (134, 135).

### **Efectos sobre células epiteliales**

#### Células epiteliales intestinales

Teniendo en cuenta que la principal fuente de obtención de flavonoides es a través de la dieta, resulta de gran interés conocer la relación existente entre éstos y las células epiteliales intestinales, ya que serán la primera población celular con que se enfrentarán los flavonoides tras su llegada al lumen intestinal. Efectivamente los flavonoides pueden ser captados por las células epiteliales intestinales, sin embargo, existen discrepancias acerca de la eficiencia de dicha captación en función de la naturaleza del flavonoide. Ya en 1998, un trabajo con la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humana Caco-2 expuso que las agliconas de los flavonoides eran incorporadas por dichas células de forma concentración y tiempo dependientes, mientras que los glucósidos no eran incorporados (136). Aunque clásicamente se ha aceptado esta hipótesis, estudios más recientes con las líneas celulares Caco-2 y MDCK (Madin-Darby canine kidney), una línea epitelial renal, han demostrado como tal captación de glucósidos efectivamente sí se produce, pudiendo estar involucrados diferentes receptores de la membrana apical de los enterocitos como SGLT1 o MRP2 (30-32, 137). Además de estudios relacionados con la absorción, existen trabajos donde se analiza la influencia de los flavonoides sobre enterocitos a otros niveles. Ejemplo de ello, son los trabajos de Ruiz et al. realizados con la línea celular Mode K (células epiteliales intestinales murinas) que demuestran que la quercetina (40  $\mu$ M), pero no sus metabolitos, inhibe la expresión de IP-10 y MIP-2 mediante la modulación de la vía no clásica de NF- $\kappa$ B y Akt (138). En este mismo estudio observan, que apigenina, luteolina y genisteína también inhiben IP-10 involucrando diferentes vías de señalización, de forma que las flavonas bloquean la vía Akt mientras que la genisteína inhibe IP-10 vía NF- $\kappa$ B, IRF (factor regulador de interferón, interferon regulatory factor) y Akt (139). En otros estudios sí se ha relacionado la acción inhibitoria de estas dos flavonas con una modulación de NF- $\kappa$ B, concretamente en células Caco-2 la crisina (50  $\mu$ M) inhibió la secreción

de IL-8 mediante el bloqueo de la fosforilación de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ , mientras que en la línea celular IEC18 (intestinal epithelial cells 18), una línea celular no tumoral de rata, la luteolina inhibió significativamente IKK- $\beta$  (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) y por tanto la fosforilación de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  (140), la actividad transcripcional de NF- $\kappa\text{B}$  y la expresión de ICAM-1 (141). Una diana interesante de los flavonoides en células epiteliales intestinales es el HIF-1. Este factor de transcripción induce la secreción de factores de crecimiento como IGF2 (factor de crecimiento similar a la insulina-2, insulin-like growth factor-2) o TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante-  $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ). La unión de estos factores de crecimiento a sus correspondientes receptores desencadena la inducción de una serie de genes relacionados con la proliferación/supervivencia celular, así como en la expresión del propio HIF-1 $\alpha$  (142-144). Estudios con las líneas celulares HCT116 y SW620, ambas procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano, han demostrado que la quercetina es capaz de activar este factor (145). Aunque no está comprobado en células epiteliales, la luteolina y la fisetina, pero no el kaempferol, taxifolina o rutina, también pueden inducir HIF-1 (146). También se encuentran estudios a nivel de la resistencia epitelial en los que destaca el efecto de la quercetina induciendo un incremento en la expresión de claudina 4 en células Caco-2 (147).

Aunque generalmente los flavonoides inhiben la función inmunológica de células epiteliales intestinales, existen algunos trabajos que sugieren que tal efecto no es tan general debido a la existencia de diversas vías de modulación y a la afectación de no sólo células del sistema inmunológico. Como apunte final, destacar que un estudio realizado con cocultivos de células Caco-2 y bacterias sugiere que los flavonoides pueden modular la microbiota intestinal *in vivo* (148).

#### Otras células epiteliales

Algunos flavonoides han sido estudiados en otros tipos de células epiteliales, aunque de manera mucho menos extensa y con un interés mucho más focalizado en los efectos antitumorales que antiinflamatorios. Recogiendo éstos últimos, en células epiteliales bronquiales primarias humanas, la quercetina inhibe la secreción de IL-8, iNOS y GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), posiblemente vía NF- $\kappa\text{B}$ , AP-1 y CREB (unión al elemento de respuesta al AMPc, cAMP response element binding) (149, 150). La flavona luteolina inhibe NF- $\kappa\text{B}$  pero activa JNK, incrementando la apoptosis inducida por TNF en células epiteliales bronquiales humanas por inhibición de la superóxido dismutasa y el estrés oxidativo temprano (151). En células del epitelio de la próstata PC3-M, la apigenina disminuye la expresión de HIF-1 $\alpha$  de forma muy significativa (152). En la línea celular hepática Chang, la quercetina, el kaempferol, la taxifolina y en menor medida la apigenina, protegen contra el estrés oxidativo inducido por citoquinas (153). En células epiteliales humanas del cristalino, la genisteína inhibe la producción de TGF- $\beta$  y la aldosa reductasa resultando en una menor opacidad del cristalino bajo condiciones hiperglucémicas (154). En células epiteliales epidérmicas JB6P+, la miricetina inhibe la expresión de COX2 por diversas vías (155).

Recopilando todos estos datos podemos concluir que de nuevo los flavonoides más activos sobre células epiteliales son flavonoles y flavonas, presentando un carácter inhibitorio de la función inmunológica como denominador común.

### **Efectos sobre células endoteliales**

Debido a las propiedades antioxidantes presentadas por los flavonoides y a la importancia de estas propiedades en enfermedades cardiovasculares, son muchos los estudios que se han centrado en el estudio de los efectos de estos polifenoles sobre células endoteliales *in vitro*, prestando especial interés a los mecanismos de adhesión celular. Éstas son unas dianas muy interesantes ya que los todos los leucocitos en última instancia acceden a los focos inflamatorios mediante mecanismos de adhesión. A este respecto, los flavonoles han demostrado ser especialmente activos. En concreto, la quercetina y kaempferol suprimen la expresión de ICAM1, iNOS y COX2 en células endoteliales y la activación del NO derivado de la eNOS (óxido nítrico sintasa epitelial, epitelial nitric oxide synthase) (156, 157). Sin embargo, tal actividad no fue presentada por metabolitos de la quercetina sobre este mismo tipo celular (158).

Las flavonas, siguiendo los mismos patrones que en poblaciones celulares anteriores, también mostraron actividad sobre estas células. En un estudio centrado en la modulación de la adherencia de células monocíticas THP-1 a LDL oxidadas en células HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), la luteolina y la apigenina, pero no la quercetina, mostraron actividad inhibiendo la expresión de VCAM1 y E-selectina (159). El efecto de la apigenina sobre VCAM1 y E-selectina en células HUVEC también fue confirmado por Lee et al. (160). Derivados de flavonas también interfieren en la adhesión de células THP-1 a células HUVEC (161). Lotito y Frei estudiaron los requerimientos estructurales para la inhibición de moléculas de adhesión en células endoteliales aórticas humanas estimuladas con TNF- $\alpha$ . Así, la sustitución 5,7-dihidroxilo en el anillo A, el doble enlace en posiciones 2 y 3 y el grupo 4-ceto en el anillo C resultaron ser los principales requerimientos para la inhibición de la expresión de estas moléculas. Como consecuencia, la estructura ideal difiere de la requerida para la actividad antioxidante. La apigenina, la crisina, el kaempferol y la quercetina fueron activos en este estudio, reduciendo la expresión de E-selectina e ICAM1 pero no VCAM1 (162). Sin embargo, en modelos *in vitro* se ha comprobado un gran metabolismo de primer paso de estos flavonoides, sugiriendo que la eficacia *in vivo* puede verse muy limitada por este factor (163).

Las isoflavonas también ejercen diferentes acciones sobre el endotelio. La daidzeína y la genisteína modulan la producción de PGI<sub>2</sub> (prostaglandina I<sub>2</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub>) y activan COX2 mediante la activación del receptor de estrógenos (164). Además la genisteína, pero no la daidzeína, protege contra el daño oxidativo mediante la activación de Nrf1 (factor respiratorio nuclear 1, nuclear respiratory factor 1) y la posterior inducción de la glutathion peroxidasa (165). A nivel de producción de citoquinas proinflamatorias, la genisteína reduce la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 e IL-8 y la molécula de adhesión ICAM-1, en células endoteliales microvasculares del cerebro (166) y tanto la genisteína como la daidzeína inhiben la activación de VCAM1 e ICAM1 inducida por LPS en células endoteliales humanas cultivadas, inhibiendo NF- $\kappa$ B (167). Además, la genisteína (1-10  $\mu$ M) incrementa la expresión de eNOS y la producción de NO independientemente del receptor de estrógenos en aorta y células endoteliales umbilicales (168). Finalmente, también las flavanonas han mostrado actividad. Así, la hesperetina incrementa eNOS/NO mediante la activación del receptor estrogénico (169), mientras que su glucósido, la hesperidina, inhibe la secreción de endotelina 1 e incrementa la liberación de NO (170).

Podemos apreciar el claro carácter inhibitorio de todos los subtipos de flavonoides sobre células endoteliales, ejerciendo sus efectos principalmente sobre moléculas de adhesión, perjudicando la adhesión de monocitos. El mecanismo prevalente para tal efecto parece ser la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B al igual que en otros tipos celulares. Además, al menos algunos flavonoides, favorecen la función de eNOS y la producción de NO en condiciones basales, acciones que también inhiben la adhesión celular y pueden presentar efectos vasodilatadores.

#### **Efectos sobre queratinocitos y fibroblastos**

En consonancia con lo descrito para otras células, los trabajos realizados hasta la fecha destacan el carácter inhibitorio ejercido por flavonoles, flavonas e isoflavonas. De hecho, por ejemplo, el kaempferol inhibe la expresión de genes dependientes de UV-B en la línea celular de queratinocitos humana HaCaT. El análisis muestra que los factores de transcripción involucrados parecen ser c-REL, SAP-1, Ahr-ARNT, Nrf-2, Elk-1, SPI-B y NF- $\kappa$ B (171). Además, en fibroblastos gingivales, la quercetina, luteolina y genisteína inhiben la activación de MAPK, la expresión de COX2 e IL-1 $\beta$  y la síntesis de PGE<sub>2</sub> (172), presentando por tanto, un amplio espectro de efectos antiinflamatorios y antiproliferativos sobre fibroblastos.

#### **1.4. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal**

Las afecciones que se recogen bajo la denominación de EII (enfermedad inflamatoria intestinal) han sido objeto de intenso estudio por parte de la comunidad científica en los últimos años, pero su terapia sigue siendo insatisfactoria, asociándose con una elevada incidencia de reacciones adversas. Por este motivo, existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes que combinen eficacia con efectos secundarios reducidos, modificando en la medida de lo posible el curso de la patología, prolongando los períodos de remisión y mejorando la calidad de vida del enfermo. Éste puede ser el caso de los flavonoides, compuestos que además de una baja toxicidad, presentan unas características idóneas para ser considerados agentes antiinflamatorios útiles en la EII (173). La eficacia de los flavonoides ha sido estudiada en varios modelos de inflamación intestinal y en ocasiones ha sido comparable a la de fármacos ampliamente utilizados en la EII como la prednisona y sulfasalazina (174).

Además de la inhibición de la producción de citoquinas descrita en el apartado anterior, se han propuesto distintos mecanismos involucrados en la actividad antiinflamatoria intestinal de los flavonoides:

1. Propiedades antioxidantes y/o antirradicalarias: los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y poseen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (175). Todos los flavonoides estudiados mejoran el estado de estrés oxidativo asociado al proceso inflamatorio intestinal inducido experimentalmente (176, 177). Este efecto es de gran importancia, ya que los radicales libres, incluyendo los derivados del oxígeno y los del nitrógeno, desempeñan un papel muy importante en la etiopatogénesis de la EII en humanos (178). Es importante señalar el creciente interés que ha suscitado en la última década el NO en la patogénesis de la EII (179). Es posible que los efectos farmacológicos de los flavonoides estén relacionados con el metabolismo del NO ya que en

primer lugar, los flavonoides pueden preservar las funciones beneficiosas del NO, al captar directamente aniones superóxido (180) y por tanto impedir la interacción con el NO generado; en segundo lugar, los flavonoides son capaces de inhibir la expresión de iNOS (181, 182) y en tercer lugar, actúan como potentes captadores de radicales peroxinitrito (183). En consecuencia, los flavonoides pueden prevenir los efectos perjudiciales generados por el NO en situaciones de inflamación intestinal.

2. Inhibición de la actividad ciclooxigenasa, lipoxigenasa y reducción en la producción de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>): los mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico sintetizados por vías dependientes de la ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LOX), están implicados en la patología de la EII. Inhibidores selectivos de estas enzimas y de sus metabolitos han proporcionado resultados satisfactorios en el tratamiento de la enfermedad. Concretamente, el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) facilita la quimiotaxis, adherencia y desgranulación de los neutrófilos en el colon inflamado. De hecho, la inhibición de su síntesis (184) o el bloqueo de su receptor (185) se traducen en efectos beneficiosos en la colitis experimental. La mayoría de flavonoides reducen la producción de LTB<sub>4</sub> colónico así como la actividad mieloperoxidasa colónica (MPO), enzima que se encuentra predominantemente en los gránulos azurofílicos de neutrófilos y es considerada marcador sensible de infiltración leucocitaria (186).

3. Preservación de la función absortiva colónica: la función absortiva colónica se encuentra profundamente alterada en la inflamación intestinal (187). Los flavonoides tienen la capacidad de modular el transporte hidroelectrolítico alterado lo que justifica su actividad antidiarreica (188). La diarrea en la EII puede deberse a una alteración en el transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa y/o a una alteración en la motilidad, alteraciones íntimamente relacionadas. Distintos ensayos *in vivo* han demostrado que los flavonoides inhiben la secreción y la motilidad intestinales, retrasando el tránsito intestinal y contrarrestando la acumulación de fluidos en el lumen (189, 190).

## **2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)**

### **2.1. Generalidades**

El término Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) define una condición inflamatoria crónica e idiopática, en la que se alternan períodos activos así como de recaída de la enfermedad. La EII engloba dos grandes cuadros clínicos conocidos como Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC), además de otras enfermedades. Ambas presentan síntomas clínicos comunes como diarrea (cuando la afectación tiene lugar en el colon), malnutrición, anorexia, pérdida de peso corporal y dolor abdominal, junto con consecuencias sistémicas como la anemia. En el caso del paciente pediátrico una característica importante, que incluso se emplea con fines diagnósticos, es el retraso en el crecimiento.

El término “colitis indeterminada” fue introducido en 1978 por Price y hace referencia al diagnóstico obtenido en el caso de una colitis crónica sin una etiología conocida y sin una distinción convincente entre EC y CU (191-194). Recientemente se ha definido la IBDU (inflammatory bowel disease unclassified) para aquellos casos con un diagnóstico de EII, pero en los que resulta imposible distinguir entre EC y CU; y CUTE (colitis of uncertain type or



etiology), refiriéndose a la imposibilidad de diagnóstico debida a colitis fulminante sin antecedentes, ya que se impone la necesidad de la colectomía y la gravedad del proceso impide el diagnóstico diferencial entre CU y EC (195).

Aunque los síntomas clínicos comunes dificultan el diagnóstico diferencial entre ambas, existen diferencias inmunológicas y anatomopatológicas, entre otras, que las distinguen.

La Colitis Ulcerosa está caracterizada por una inflamación no transmural (superficial) restringida al colon. Dependiendo de la extensión anatómica afectada, se habla de proctitis cuando la enfermedad afecta al recto, proctosigmoiditis cuando se ven afectados hasta 25-30 cm del margen anal (recto y sigma), colitis izquierda con afectación en recto, sigma y colon ascendente, y pancolitis cuando la colitis afecta a todo el colon. De forma poco frecuente (10-15%) los pacientes con CU pueden desarrollar también inflamación ileal (*backwash ileitis*), como consecuencia de un fenómeno de "derrame", lo que en ocasiones complica su diferenciación con casos de Crohn ileocolíticos (Tabla 1). Los pacientes típicamente presentan diarrea, frecuentemente nocturna y posprandial, con presencia de pus o moco, o ambos, y dolor abdominal. El diagnóstico de la UC suele confirmarse mediante endoscopia y estudios histológicos (196, 197). En la práctica clínica la UC es clasificada normalmente como leve (hasta cuatro deposiciones diarreas diarias y sin toxicidad sistémica), media (de cuatro a seis deposiciones diarreas diarias y mínima toxicidad) o severa (más de seis deposiciones diarreas diarias y signos de toxicidad como fiebre, taquicardia, anemia o incremento en la tasa de sedimentación de eritrocitos) (198). Aunque no existe una definición formal de CU fulminante, el nombre usualmente describe pacientes que presentan una CU complicada con fiebre, más de diez deposiciones diarreas diarias con extenso sangrado (hematoquecia), marcado incremento en los marcadores bioquímicos de inflamación, anemia con requerimiento de transfusiones sanguíneas y pérdida de peso. La UC fulminante puede provocar lo que se conoce como megacolon tóxico, en el que el intestino se dilata, se produce una hemorragia intraluminal y la pared intestinal presenta un aspecto extremadamente fino y delicado, lo que implica la necesidad de la colectomía (199). Una de las principales consecuencias de la CU es el riesgo elevado de desarrollo de adenocarcinoma colorrectal, como se demostró por primera vez en 1925 y se ha corroborado posteriormente (200-206).

Desde un punto de vista patológico, la capa serosa colónica presenta un aspecto blando, liso y brillante, con ausencia de fibrosis o fístulas. La mucosa colónica se caracteriza por hemorragia, congestión y edema, con ausencia de marcas australes y presencia de pliegues mucosos y en ocasiones puede presentar aspecto granular, incluso ulcerado. La alteración del patrón vascular se caracteriza por dilatación y congestión de los microvasos a nivel de mucosa y submucosa, así como aumento del flujo sanguíneo a nivel del colon y vasodilatación de la vasculatura de los nódulos (207-209). A nivel microscópico existe un infiltrado inflamatorio, fundamentalmente compuesto por linfocitos y células plasmáticas en la *lamina propria*, con posibles acúmulos de neutrófilos formando abscesos en las criptas, con actividad eosinofílica variable pero importante en algunos casos. Junto a este infiltrado, otro aspecto fundamental es la pérdida o distorsión de la arquitectura de las criptas. Las criptas forman ramas en las que dos o más criptas irregulares comparten un orificio común con un ángulo anormal, y puede darse también cualquier otra modificación o morfología aberrante de dichas estructuras. En la CU fulminante se ha observado necrosis difusa, ulceración, congestión y hemorragia, extendiéndose normalmente a las capas más profundas de la pared intestinal, incluso más allá

de la mucosa. La fragilidad del tejido que se alcanza puede dar lugar a la formación de grietas en el mismo (210).

La Enfermedad de Crohn se caracteriza por una inflamación transmural de la mucosa gastrointestinal que puede afectar a cualquier zona del tracto gastrointestinal, desde la boca al ano. Las manifestaciones típicas incluyen afectaciones discontinuas de varias porciones del tracto gastrointestinal y el desarrollo de complicaciones, incluyendo estenosis, abscesos o fístulas (Tabla 1). La clasificación de Viena describe los diferentes fenotipos clínicos de la EC en función de la localización y la aparición de complicaciones. Esta clasificación está basada en la frecuencia de la localización y el comportamiento de la enfermedad, por tanto puede modificarse con el tiempo. Así, la enfermedad se localiza en el íleon terminal en el 47% de los casos, en el colon en el 28%, en la región ileocecal en el 21% y en el tracto gastrointestinal alto en el 3%. El comportamiento de la enfermedad es clasificado como no estenótico y no penetrante en el 70% de los pacientes, estenótico en el 17% y penetrante (es decir, con fístulas, abscesos o ambos) en el 13% de los casos. La sintomatología está estrechamente relacionada con la localización y puede cursar con diarrea, dolor abdominal, fiebre y obstrucción intestinal, así como presencia de sangre, moco o ambos. El diagnóstico de la EC suele basarse en la detección de parámetros de forma endoscópica, radiológica, en laboratorio y mediante estudios histológicos. En la práctica clínica la EC se clasifica típicamente en: leve a moderada (pacientes capaces de tolerar la alimentación oral sin manifestaciones de deshidratación, toxicidad, rigidez abdominal, obstrucción o >10% de pérdida de peso); moderada a grave (fallo en la respuesta al tratamiento para EC leve, síntomas claros de fiebre, pérdida de peso, dolor o rigidez abdominal, náuseas y vómitos intermitentes o anemia significativa); y grave a fulminante (persistencia de síntomas tras el tratamiento con corticoides, fiebres altas, vómitos persistentes, evidencia de obstrucción intestinal, rigidez intestinal, caquexia o evidencia de abscesos) (196).

Desde un punto de vista patológico, la EC se caracteriza por fibrosis y pérdida de la anatomía funcional de las distintas capas de la pared intestinal, siendo la afectación de la submucosa y serosa independiente del daño de la mucosa, aunque la presencia de edema y fibrosis se observa en toda la profundidad de la pared intestinal. A nivel de la mucosa pueden encontrarse de forma contigua segmentos normales junto a zonas de ulceración profunda. Se observa la aparición de células mononucleares en la *lamina propria*, criptas con ramas o brotes, junto con úlceras, erosiones y alteraciones en el epitelio. Los infiltrados de neutrófilos y eosinófilos son variables. La atrofia de la submucosa se traduce en hipertrofia de los plexos nerviosos y dilatación de los canales linfáticos. Pueden existir agregados linfoides en cualquier capa intestinal. Es frecuente la existencia de granulomas de tipo sarcoidal (211-213). La formación de los granulomas se debe al daño a nivel de las criptas, que provoca la llegada de contenido luminal y de mucinas hasta la *lamina propria*. Asimismo, son frecuentes las fisuras debido a un aumento en la presión intraluminal (214-216). Uno de los aspectos que definen a la EC y que la distinguen de la CU es la posibilidad de extensión de la enfermedad hacia intestino delgado y tracto gastrointestinal superior (esófago o estómago) (217-220). De forma similar a lo que ocurre en la CU, aunque con una mayor variabilidad en lo que se refiere al órgano afectado, existe un mayor riesgo de adenocarcinoma colorrectal, de otros segmentos del tracto gastrointestinal implicados en la EC o de otros órganos (221-229). Sin embargo, la

relación entre la displasia y la EC se encuentra en un estado de estudio menos avanzado y la asociación entre la EC y la aparición de displasia es un hecho más reciente (230-232).

## 2.2. Epidemiología

De forma global, la incidencia de la CU es mayor que la de EC (233, 234). Estudios de seguimiento han podido constatar que la incidencia de la CU permanece estable, tanto en aquellos lugares donde es alta como en los lugares donde es más baja. Sin embargo, para la EC la incidencia ha ido aumentando en los últimos años. Este incremento podría ser debido a un mejor diagnóstico de la enfermedad, al menos en parte. En comparación con la incidencia, la prevalencia es más elevada, debido a la cronicidad de la enfermedad. Por otra parte, la mortalidad sigue un desarrollo paralelo a la incidencia, y al no presentar un incremento con la edad se deduce que la enfermedad no se convierte en más agresiva con el tiempo. La EII no presenta un riesgo absoluto de muerte elevado (235), sin embargo el riesgo relativo sí que es alto (236, 237). La mortalidad también está asociada a la ocupación laboral, siendo más alta en los trabajos de tipo sedentario (238, 239).

	Colitis Ulcerosa	Enfermedad de Crohn
<b>Características clínicas</b>		
Hematoquecia	Común	Raro
Presencia de pus o moco	Común	Raro
Afectación intestino delgado	No (excepto ileítis por reflujo)	Sí
Afectación del tracto gastrointestinal alto	No	Sí
Manifestaciones extraintestinales	Común	Común
Obstrucción intestino delgado	Raro	Común
Obstrucción colónica	Raro	Común
Fístulas y afectación perianal	No	Común
<b>Características patológicas</b>		
Inflamación transmural de la mucosa	No	Sí
Estructura distorsionada de las criptas	Sí	Raro
Abcesos en criptas	Sí	Sí
Granulomas	No	Sí, pero poco común en biopsias
Fisuras	Raro	Común

**Tabla 2:** Características clínicas de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

Los aspectos geográficos, como se ha demostrado en muchos estudios epidemiológicos, desempeñan un papel importante en la etiología de la EII. Las tasas de incidencia y prevalencia más altas de UC y EC se registran en el norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica, donde comienzan a estabilizarse. Sin embargo, en países de baja incidencia como el sur de Europa, Asia y África, la incidencia y prevalencia siguen en aumento. Aunque las primeras teorías trataban de demostrar la existencia de una distribución dependiente de un gradiente norte-sur (240-243), esta hipótesis perdió importancia tras un estudio llevado a cabo en veinte centros europeos (244-246). También se empezó a hablar de un gradiente este-oeste (247-250), aunque su importancia también va disminuyendo a lo largo de los años. En la actualidad, el ritmo de crecimiento de la enfermedad es mayor en países orientales, debido a la influencia de factores ambientales o tal vez a las prácticas clínicas más desarrolladas en Occidente, lo que está permitiendo la estabilización de los datos de incidencia (251). Asimismo, varios estudios indican que un mayor riesgo en grupos de población con un mayor estatus socioeconómico (252-255), no obstante esta observación no se ha corroborado en otros estudios (256-258). La asociación plausible entre el nivel socioeconómico y la EII puede explicarse a partir de la “teoría de la higiene”, en la que el nuevo modo de vida, el ambiente más limpio y las prácticas cotidianas relacionadas con la higiene evitan la exposición a microorganismos durante las primeras etapas de la vida, lo cual podría modificar la respuesta inmunológica tras el contacto tardío con dichos agentes infecciosos en la edad adulta, alterándose el equilibrio entre la respuesta Th1 y Th2 (259-261).

El grupo de población preferentemente afectado en zonas con una alta incidencia es aquel con edades comprendidas entre los 20 y 40 años, tanto para CU (262, 263) como para EC (264, 265), aunque en zonas de escasa incidencia no se detectan diferencias importantes según la edad. Existe un segundo pico de incidencia de menor relevancia entre la población mayor de 60 años, aunque éste podría reflejar únicamente un diagnóstico tardío en esta población. Recientemente se ha propuesto una distribución bimodal para la incidencia de la EII, en la que los dos picos de incidencia anteriormente citados presentan distinta importancia según se trate de EC o CU; así, el pico de mayor importancia en el caso de la EC es el de la población joven, mientras que en la CU ocurre lo contrario (266). Con un interés clínico cada vez mayor, en los últimos años se ha observado una tendencia a la alza en la EII pediátrica en un amplio abanico de localizaciones geográficas (267-273). De forma general, en la población pediátrica predomina la EC sobre la CU (274).

La distribución de la enfermedad en relación al sexo ha cambiado a lo largo del tiempo, aunque en la actualidad se considera que, de forma general, la incidencia de EC es mayor en mujeres y la de CU en hombres (275, 276). La modificación en la distribución por sexos en los últimos años puede explicarse igualmente por la mejora en el manejo de la enfermedad.

Con respecto a la raza, los individuos de raza negra presentan una menor incidencia que los de raza blanca (277). Estos datos pueden estar sesgados, ya que en África, donde está la mayoría de la población de raza negra, el diagnóstico no alcanza muchas veces a diferenciar entre la EII y otras patologías similares. Además, los estudios epidemiológicos tienden a realizarse en países donde la población negra es minoritaria. No obstante, estudios en

Sudáfrica han corroborado la baja incidencia de la raza negra respecto a la blanca; sin embargo, se ha podido observar que la incidencia en los individuos de raza negra con un estilo de vida *occidental* es similar a la de los de raza blanca (278), lo que parece apoyar una mayor importancia de los factores ambientales. Por otra parte, diferentes estudios han demostrado un mayor riesgo de EII en los judíos que en la población general, siendo mayor en aquellos nacidos en EEUU o Europa que en los nacidos en Israel. El hecho de que el riesgo sea mayor en los judíos, independientemente del lugar, indica que hay una predisposición inherente en ellos. Por otra parte, la variación que se registra entre los judíos de una región a los de otra indica una influencia de los factores ambientales en esa predisposición inherente (279).

Hasta la fecha no se ha demostrado una relación directa de ningún agente infeccioso con la EII, aunque se han desarrollado varios estudios dentro de esta línea de investigación. En la EC el principal candidato es *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* (280-283), aunque *Mycobacterium kansasii* (284), *Listeria monocytogenes* (285), *Pseudomonas maltophilia* (286) y *Mycoplasma* (287) también han sido objeto de estudio. En la CU los microorganismos estudiados son muchos, incluyendo diversas especies del género *Bacillus*, *Bacteroides* (288, 289), *E. coli* adherente (290) o, más recientemente, *Fusobacterium varium* (291, 292). En cualquier caso los resultados son negativos, ya que hasta el momento no ha sido posible establecer una relación causal entre ninguno de estos microorganismos y la EII. Recientemente se ha publicado un artículo que recoge datos epidemiológicos y de laboratorio que sugieren un posible efecto protector de la infección gástrica de *H. pylori* contra el desarrollo de la EII (293).

Globalmente, el incremento de incidencia de la EII en términos epidemiológicos puede ser considerada como un resultado de la disminución de la mortalidad perinatal (294) durante este siglo. La mejora de la higiene y la nutrición, junto con el avance en los cuidados pediátricos y maternos, han permitido que aumente el número de niños vulnerables que sobreviven a una determinada infección o proceso autoinmune, lo que puede haber dado lugar al incremento en la incidencia de la EII. Esto explica a su vez la relación de la patología con un nivel socioeconómico elevado. Asimismo, la exposición temprana de estos individuos a un determinado agente infeccioso puede ser importante (295).

### **2.3. Etiología**

A pesar de que la EII es una afección idiopática, la hipótesis más aceptada actualmente para explicar su etiología es la existencia de una respuesta inmunológica no regulada a nivel de la mucosa intestinal llevada a cabo fundamentalmente por células T CD4<sup>+</sup> ante antígenos de las bacterias de la flora entérica en pacientes genéticamente predispuestos, dando lugar a una inflamación intestinal crónica. Dicha reacción puede verse modificada, regulada o modulada por diversos factores ambientales. De este modo, la etiología de la EII estaría basada en una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales e inmunológicos.

#### **2.3.1. Factores genéticos**

Los primeros indicios de una base genética en la aparición de la EII datan de los años 30 (296). De hecho, en la actualidad un historial familiar positivo para EII es el factor de riesgo independiente con más peso para el desarrollo de la enfermedad. Comparativamente, el componente familiar es algo más relevante en la EC (259, 297, 298). La predisposición genética

a padecer la enfermedad queda demostrada por la variabilidad de su incidencia entre distintos grupos étnicos, como es el caso de la elevada incidencia y prevalencia en la población judía, incluso cuando se compara ésta con otros grupos étnicos dentro de la misma localización geográfica (299, 300). Los datos obtenidos a partir de la epidemiología familiar demuestran una relación etiológica entre la EC y la CU, ya que la agregación familiar existe en ambos casos no sólo de forma directa, sino también de forma cruzada, es decir, una mayor probabilidad para ambas manifestaciones dentro de una misma familia predispuesta (301-303). Sin embargo, la evidencia más fuerte de que los factores genéticos contribuyen a una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad viene dada por estudios con gemelos (304, 305). Sin embargo, los factores ambientales también han de cumplir un papel importante, ya que no existe un 100% de concordancia entre gemelos monocigóticos (306-309).

Teniendo en cuenta lo anterior, queda claro que la EII no responde a un modelo de herencia mendeliano, aunque es posible que este modelo pueda ser adecuado en algún tipo o subtipo concreto de la enfermedad. El modelo poligénico propuesto por McConnell no permite explicar la agregación familiar, pero un modelo multi-*locus* u oligogénico sería adecuado para explicar las características fisiopatológicas de la enfermedad, la relación entre EC y CU, así como los aspectos familiares de la EII (310-312).

La intensa investigación genética reciente ha permitido la detección de múltiples variantes genéticas involucradas en la EII, aunque este hecho no ha tenido el menor impacto clínico por el momento. Se han propuesto más de 30 *loci* relacionados con la EII hasta la fecha (313). De acuerdo con la heterogeneidad genética de la EII anteriormente mencionada, no se han detectado loci individuales relacionados con la enfermedad, confirmándose así la hipótesis de una enfermedad poligenética compleja. De acuerdo con estos datos, las regiones en los cromosomas 16, 12, 6, 14, 5, 19, 1, 16 y 3 han sido renombradas como IBD 1-9, respectivamente. En algunos casos, el gen o genes subyacentes a los diferentes *loci* relacionados con EII han sido identificados.

El caso más relevante es el IBD1, localizado en el cromosoma 16. Fue el primero en descubrirse y el que cuenta con un mayor apoyo científico (314). Incluye el gen *NOD2/CARD15*, localizado en 16q21 (315, 316), cuya modificación está relacionada con la EC (317-319). Esta relación no ocurre en todos los grupos poblacionales, ya que por ejemplo no sucede en Asia (320-322). Se han caracterizado tres mutaciones diferentes en este gen (Arg702Trp, Gly908Arg and Leu1007insC). Estas mutaciones se relacionan con una localización ileal y no colónica, excluyendo de esta manera a la CU (323, 324). La proteína codificada por el gen en cuestión (*NOD2*) pertenece a una superfamilia de reguladores de la apoptosis expresada en monocitos, y por tanto, sus variantes dan lugar a una muerte celular programada alterada en este tipo celular; por otro lado, las variaciones de *NOD2* alteran la interacción de la proteína *NOD2* con el muramildipéptido (MDP) o el LPS, modificándose la activación del factor de transcripción nuclear NFκB, que se traduce en una activación deficiente de dicho factor de transcripción y a un fallo en la respuesta desencadenada por las bacterias que se encuentran en el lumen (325, 326). Por otro lado, la activación de NFκB a través de TLR (Toll like receptors, receptores tipo Toll) puede aumentar debido a la mutación del gen *NOD2*, ya que la proteína en cuestión actúa frenando la activación de este factor de transcripción.

### 2.3.2. Factores ambientales

A lo largo del siglo XX se ha analizado el papel de distintos factores ambientales como factores de riesgo para la EII. Cabe decir que los resultados obtenidos en la mayoría de los casos han sido negativos, con datos inconsistentes, incapaces de demostrar la influencia de dichos factores. Entre los que sí presentan una asociación contrastada se encuentran los siguientes:

- Estrés: el sistema nervioso entérico se encarga de la coordinación de diversas funciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal, en particular la motilidad, el transporte hidroelectrolítico, las funciones endocrinas y exocrinas y la microcirculación (327). Ya desde la mitad del siglo XX se empezó a considerar la EII como un trastorno con un destacable componente psicosomático (328-332) y, siguiendo esa línea, estudios más recientes han demostrado un papel importante del estrés no tanto como agente inductor sino modificador. La explicación fisiológica a tal relación parece ser dependiente de la inervación colinérgica y de la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF), el cual actúa sobre mastocitos produciendo la secreción de una serie de mediadores, lo que finalmente dará lugar un aumento de la permeabilidad intestinal (333-335) y de la motilidad (336, 337), así como una mayor secreción de agua y de iones (338-340) y una alteración de la interacción entre las bacterias y la mucosa (341), alteraciones todas ellas relacionadas con el agravamiento de la EII. En humanos los datos disponibles son muy limitados, sin embargo se ha observado un aumento en la expresión de CRF en células mononucleares de la *lamina propria* procedente de pacientes con CU (342, 343). Algunos estudios han intentado demostrar el efecto terapéutico en la reducción del estrés en la EII, aunque los resultados son contradictorios (344-346).

- Dieta: el epitelio intestinal constituye el primer punto de contacto de los componentes de la dieta, los cuales constituyen, tras la microbiota intestinal, la fuente de antígenos luminales más abundantes, por lo que la respuesta ante éstos puede considerarse como una reacción inmunológica controlada. La duración de esta reacción, así como la autolimitación de la misma (tolerancia oral), determinan su intensidad, pudiendo actuar dichos antígenos como factores potencialmente causantes de trastornos a nivel del sistema digestivo. Existe una gran variedad de estudios encaminados a establecer una relación entre la EII y diferentes componentes de la dieta, como la leche y productos lácteos (347), la margarina (348), los cereales (349), la comida rápida (350) o las bebidas de cola (351). Sin embargo, en ninguno de estos componentes se ha demostrado una relación sólida con la enfermedad. La mayoría de los estudios tratan de asociar componentes de la dieta occidental, fundamentalmente el consumo excesivo de carbohidratos, con el desarrollo de la EII. La alteración del componente lipídico de la dieta y del equilibrio en ácidos grasos de la misma podrían ser los responsables del incremento en la actividad de la enfermedad (352, 353). Esta hipótesis se ve apoyada por el efecto beneficioso de los ácidos grasos  $\omega$ -3 en algunos estudios, presentando un efecto antiinflamatorio (354-357). Los ácidos grasos de cadena corta y la capacidad de metabolización preferente por parte de los colonocitos podrían representar un mecanismo importante y beneficioso en la enfermedad, especialmente en la CU (358, 359). Preparaciones a base de aceite de pescado conteniendo EPA y DHA han sido beneficiosas en la EC (360-362) y CU (363-367), así como enemas de butirato (368). Asimismo, la comida rápida, con un alto contenido en grasa, se ha asociado tanto con la CU como con la EC (350, 351).

La lactancia confiere inmunidad mientras el sistema inmune del niño se encuentra en desarrollo (369, 370). Se ha estudiado ampliamente cómo la lactancia materna reduce el riesgo tanto de CU (371-373) como de EC (374, 375). Diversos mecanismos pueden explicar esta capacidad protectora de la leche materna, como la protección frente a infecciones gastrointestinales (376-378), la capacidad de potenciar el desarrollo de la mucosa intestinal y la capacidad inmunológica de la leche materna en sí (379-382). Otro factor a considerar es el retraso en el consumo de leche de vaca como consecuencia de la propia alimentación con leche materna (383-385). Por otro lado, no se han encontrado evidencias de asociación entre alergias alimentarias y el desarrollo de EII (386, 387).

En ningún caso ha llegado a demostrarse definitivamente una relación entre factores dietéticos y EII. Conviene recordar que los cambios en el estilo de vida que pueden explicar la evolución epidemiológica de la EII no comprenden sólo modificaciones de los hábitos alimentarios, por lo que es muy posible que ésta deba achacarse a otros factores ambientales.

-Tabaco: el único factor ambiental cuyos datos epidemiológicos son concluyentes, y que por tanto permiten establecer una relación taxativa con la EII, es el tabaco. En efecto, se ha observado una capacidad protectora del tabaco en la CU (388-391), siendo el porcentaje de fumadores dentro de los pacientes con CU sólo del 10-15% (392). En contrapartida, fumar es un factor de riesgo para la EC, actuando como un componente importante en el desarrollo de la enfermedad o, una vez que ésta se ha establecido, provocando un aumento de la gravedad de la misma (393-400). El efecto del tabaco en la EII está relacionado además con el sexo, siendo el efecto perjudicial más importante en el caso de las mujeres (401), y el efecto protector en la CU más relevante en el sexo masculino. El efecto protector en la CU puede deberse a la capacidad del humo del tabaco para disminuir la secreción de IL-8 e IL-1 $\beta$  (402). Por otro lado, la acción de la nicotina sobre el sistema inmunológico ha sido demostrada en diversos estudios, que indican un extenso repertorio de efectos por parte de dicha sustancia (403-407). A nivel de la EII, la terapia farmacológica basada en la nicotina ha demostrado ciertos efectos beneficiosos en la CU (408-410). Aunque el mecanismo de acción no se conoce con certeza, un efecto a nivel de la motilidad intestinal, junto con acciones antiinflamatorias, podría explicar esta acción. La administración se realiza mediante parches transdérmicos, aunque existen otras posibilidades con menores niveles sanguíneos y, por tanto, menos efectos adversos, como las formulaciones orales o rectales o las de liberación retardada.

-Apendectomía: otros resultados concluyentes son los obtenidos en los casos de apendectomía, que demuestran una disminución del riesgo de CU en los individuos sometidos a la extracción del apéndice en etapas tempranas de la vida (411-419). La apendectomía realizada antes del desarrollo de la CU supone una reducción en la incidencia de la enfermedad, una mayor edad de debut, una enfermedad menos activa, una reducción de la necesidad de corticosteroides o azatioprina, y una menor tasa de recaídas y de riesgo de colectomía (417, 418, 420). De hecho, el número de individuos sometidos a este tipo de intervención dentro del grupo de pacientes con CU es muy reducido (421).

### **2.3.3. Factores inmunológicos**

Uno de los aspectos de la fisiología intestinal que resulta más llamativo es que el sistema inmunológico intestinal no permanece en un estado de estimulación continuo, pese a



encontrarse permanentemente en contacto con una carga antigénica considerable. Dado que la mucosa intestinal constituye la interfaz física entre nuestro sistema inmunológico y los antígenos externos, no es de extrañar que albergue gran parte del tejido linfoide asociado a mucosas de nuestro organismo, lo que se corresponde con la mayor y más diversa microbiota bacteriana del organismo, de la que forman parte más de 500 especies de bacterias (422, 423). Para entender de qué manera el sistema inmunológico intestinal está alterado en EII, primero es necesario conocer su funcionamiento en un estado sano.

- **Homeostasis inmunológica en el intestino sano**

- Microbiota intestinal y tolerancia oral: las bacterias comensales son capaces de modular la expresión de genes involucrados en diferentes funciones intestinales tales como la absorción de nutrientes, el fortalecimiento de la barrera mucosal, el metabolismo de xenobióticos, la angiogénesis o la maduración intestinal postnatal (308). Esta relación simbiótica se establece durante los primeros 2 o 3 años de vida, siendo los bebés estériles hasta el nacimiento. La composición de la microbiota está influenciada en primer lugar por la madre (parto vaginal o cesárea, lactancia con leche materna o leche embotellada, y factores genéticos), y en segundo lugar por factores ambientales (higiene). Los mecanismos responsables del establecimiento y mantenimiento de la tolerancia oral hacia la microbiota y hacia los antígenos procedentes de la dieta no están del todo esclarecidos y engloban una complicada red de factores anatómicos, celulares y humorales, que previenen la respuesta inmunológica contra estos antígenos, los cuales sí que desencadenarían una respuesta inflamatoria si fueran presentados al sistema inmunológico por una vía no oral (424). Durante la colonización de la microbiota tiene lugar en su mayor parte la tolerancia oral.

- Barrera epitelial: la barrera epitelial constituye la primera línea de defensa del sistema inmunológico de la mucosa intestinal (425). El epitelio intestinal está constituido por una única capa de células polarizadas cubiertas por moco en el que quedan embebidas las bacterias (426). La cara apical del epitelio intestinal está también cubierta por IgA secretora y el glicocálix. El epitelio intestinal está compuesto por cuatro linajes celulares, todos ellos procedentes de células madre progenitoras pluripotenciales: células epiteliales intestinales o enterocitos (IECs), células caliciformes productoras de moco, células enteroendocrinas productoras de hormonas y células de Paneth productoras de péptidos antimicrobianos o lectinas. Justo bajo el epitelio intestinal, a nivel de la *lamina propria*, podemos encontrar células estromales, células B (específicamente células plasmáticas productoras de IgA), células T (linfocitos de la *lamina propria*), macrófagos y células dendríticas. Además, subpoblaciones especializadas de células T (linfocitos intraepiteliales) y algunas células dendríticas se localizan entre las IECs, estratégicamente posicionadas para detectar el contenido luminal (427-429) (Imagen 1).

El movimiento de sustancias a través del epitelio intestinal se produce tanto por un transporte transcelular, mediante bombas y canales de membrana específicos, como paracelular, controlado por complejos proteicos de membrana denominados uniones estrechas (tight junctions), las cuales además mantienen la estructura polarizada de las IECs.

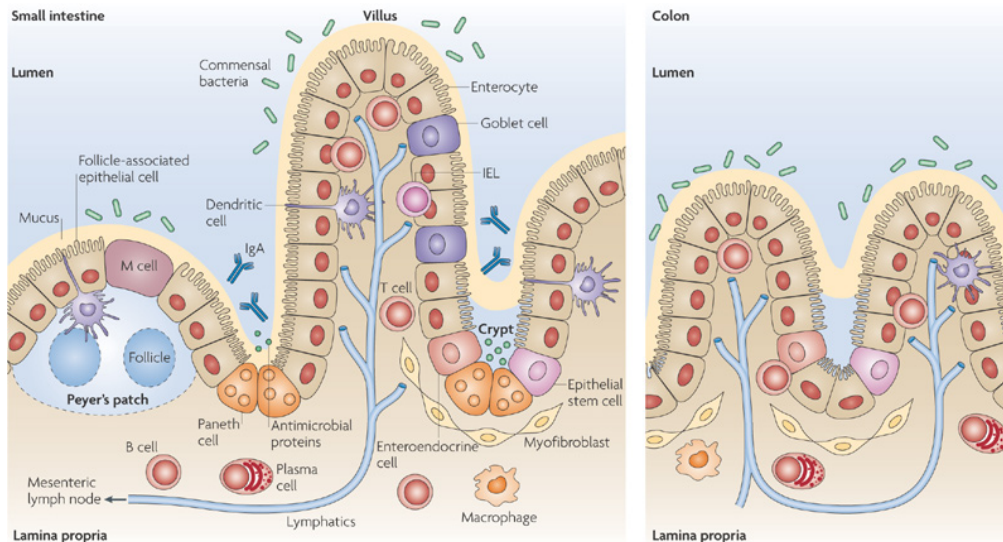


Imagen 1: Anatomía del sistema inmune intestinal.

Nature Reviews | Immunology

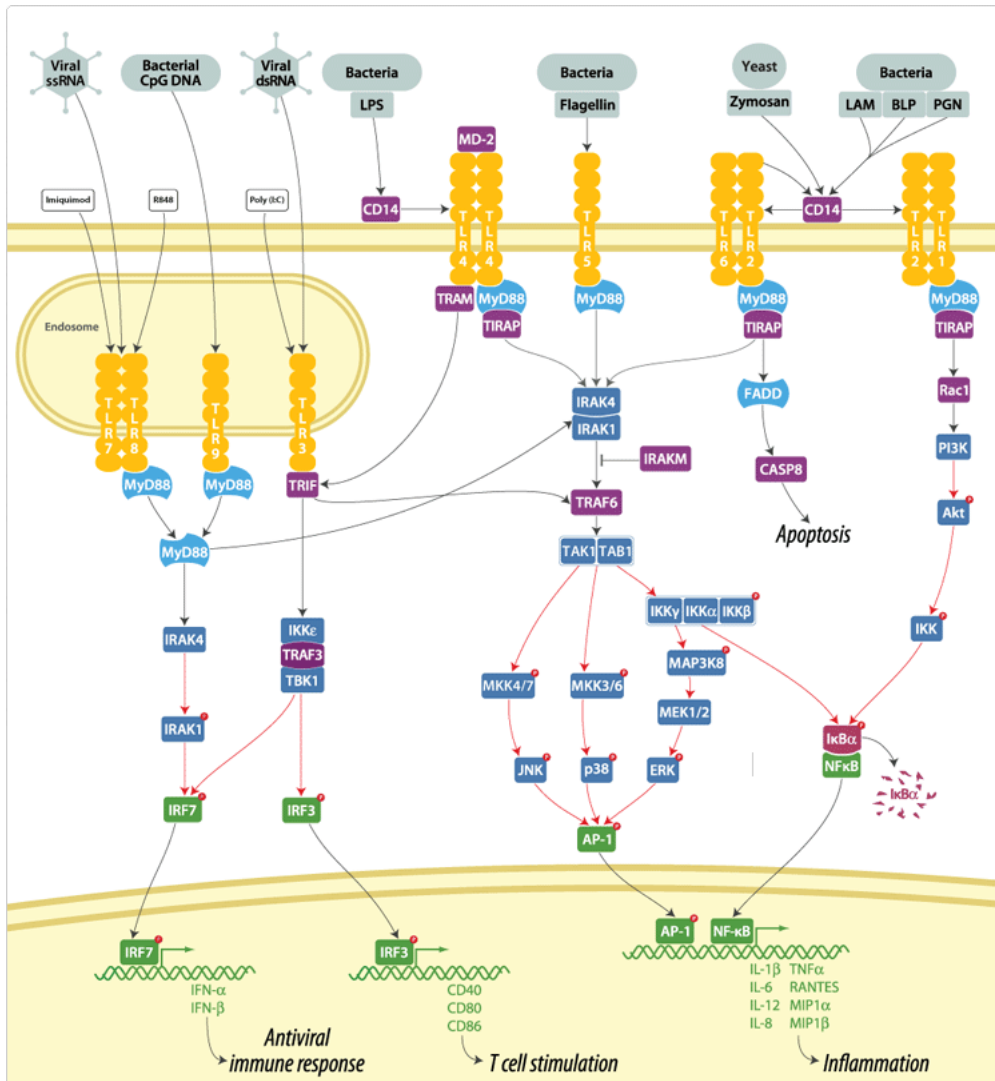
Originariamente se pensaba que el epitelio intestinal, y en general la mucosa, funcionaban únicamente como barrera ante una invasión bacteriana. Sin embargo, actualmente se reconoce que las IECs, junto con el resto de células del epitelio intestinal, mantienen una compleja y recíproca relación beneficiosa con la microbiota. Recientes estudios muestran cómo el epitelio intestinal no sólo tolera la presencia de moléculas del tipo PAMP (pathogen-associated molecular patterns) procedentes de bacterias comensales sino que además, aprovecha señales procedentes de la microbiota entérica para el mantenimiento de la función barrera y para el reconocimiento de brechas en la misma (430).

- Reconocimiento antigénico e inmunoregulación: el reconocimiento y procesamiento de antígenos luminales comienza a nivel epitelial (431). El epitelio intestinal expresa de forma constitutiva varios tipos de receptores con una estructura conservada evolutivamente, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores son capaces de reconocer moléculas con componentes microbianos específicos (PAMPs) tales como el lipopolisacárido (LPS), el peptidoglicano, el ácido lipoteicoico, RNA de doble y simple hebra o DNA metilado (CpG), que son específicos de patógenos o, más exactamente, de microorganismos ajenos a nuestra constitución bioquímica (Imagen 2).

Una de las familias de receptores de reconocimiento de patrones más importantes en mamíferos son los receptores tipo Toll (Toll-like receptors-TLR), descritos por primera vez en la mosca de la fruta (432, 433). Los 10 a 15 receptores (dependiendo de la especie) identificados hasta ahora están individualmente especializados, pero considerados en conjunto son capaces de reconocer la mayor parte de PAMPs.

Con la intención de estudiar la relación entre IECs y bacterias comensales, muchos trabajos han intentado dilucidar si el epitelio intestinal expresa TLR en condiciones fisiológicas y, de ser así, si esta expresión en el epitelio es espacial o regional. La expresión de TLR específicamente en IECs resulta difícil de determinar usando tejidos intestinales completos debido a la presencia de otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, células B, células T y células estromales, que también expresan TLR. Por ello, técnicas como inmunohistoquímica,

separación enzimática de células epiteliales intestinales o microdissección por captura láser han sido utilizadas para demostrar que TLR2 y TLR4 son expresados débilmente por IECs en tejidos sanos de colon humano (434-436). El TLR3 parece estar abundantemente expresado en intestino delgado y colon humano sano, mientras que el TLR5 está expresado predominantemente en el colon (435). Casi todos los TLR, sin embargo, están expresados a nivel de RNA mensajero (mRNA) en colon humano. La expresión de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 también fue detectada en IECs de intestino delgado humano (434).

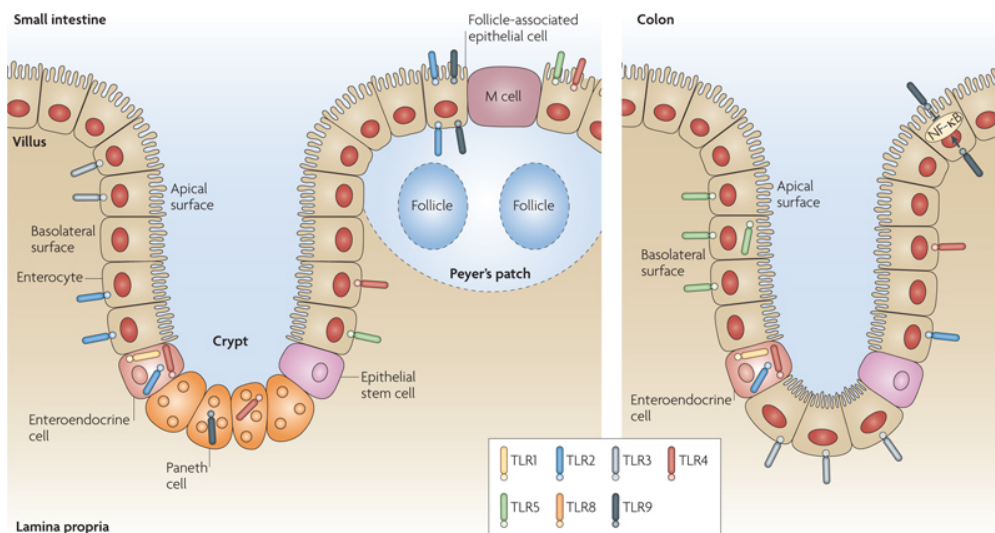


**Imagen 2:** Reconocimiento de PAMPs por los diferentes

En la EII se producen alteraciones en la expresión de TLR. IECs procedentes de pacientes con EII mostraron una expresión muy elevada de TLR4 y similar o baja expresión de TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 (435, 437-439). Por otro lado se ha demostrado que las citoquinas inflamatorias regulan la expresión de TLR en IECs (439-442) lo que puede dar lugar a una expresión selectiva de los receptores en función del tipo de peligro (443). Estudios recientes muestran que IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  inducen la transcripción de TLR4 y su correceptor LY96 (lymphocyte antigen 96, también conocido como MD2) (439, 441), mientras que IL-4 y IL-13 disminuyen la respuesta de las IECs al LPS, ligando del TLR4, sugiriendo que las citoquinas tipo Th2 disminuyen la expresión de

TLR4 por IECs (440, 444). Estudios que comparan ratones libres de gérmenes (*germ-free*) con ratones convencionales indican que las bacterias comensales inducen la expresión de ciertos TLR (TLR2, TLR3, TLR4 y TLR5) (445). Mediante inmunohistoquímica se ha detectado la expresión de TLR9 en la cara apical del borde en cepillo de colon de ratones con microbiota entérica, pero no en ratones libres de gérmenes (446).

La expresión de TLR en el intestino está también regulada de forma espacial, es decir existe expresión polarizada, apical o basolateral (Imagen 3). Aunque la expresión de TLR2 y TLR4 es baja en colon adulto normal (435), TLR4 se expresa intensamente en la cara apical de IECs colónicas procedentes de pacientes con EC, aunque no con CU (435). El análisis de IECs polarizadas humanas *in vitro* indica que TLR5 se expresa solamente en la cara basolateral, donde puede desencadenar la producción de citoquinas y quimioquinas en respuesta a flagelina basolateral (447-449). En consecuencia, la flagelina luminal sólo podría activar al TLR5 tras daño en la barrera epitelial (449). Sin embargo, otro estudio indica que TLR5 está presente en la cara apical de íleon de ratón (450). En cuanto al TLR9, su estimulación apical da lugar a una inhibición de NF- $\kappa$ B, mientras que una estimulación basolateral lo activa. De hecho, la activación apical del TLR9 inhibe la respuesta inflamatoria desencadenada tras la estimulación basolateral, alcanzando lo que se conoce como un estado de tolerancia cruzada (*cross-tolerance*). Esto sugiere que no solo la localización, sino también la función de los TLR puede ser polarizada (448). Estas respuestas divergentes de los TLR en función de la exposición apical o basolateral al ligando son consistentes con la hipótesis de que las respuestas inflamatorias y potencialmente destructivas de los TLR hacia los PAMPs sólo deben ocurrir cuando se ha producido una brecha en la barrera epitelial, o en general cuando se necesita una inmunológica inmediata.



**Imagen 3:** Expresión polarizada de los TLR en IECs.

Nature Reviews | Immunology

Tras el reconocimiento antigénico, los TLR desencadenan una respuesta tanto innata como adaptativa, mediante vías de señalización intracelulares que culminan en la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), lo que induce una cascada de citoquinas proinflamatorias. En ausencia de patógenos, la interacción de los TLR con la microbiota está relacionada con la proliferación de células epiteliales, la producción de IgA, el mantenimiento

de las uniones estrechas y la expresión de péptidos antimicrobianos, contribuyendo así a la homeostasis intestinal y al mantenimiento de una barrera epitelial intacta (428).

Además de los TLR, existe otra gran familia de receptores involucrados en el reconocimiento de patrones moleculares denominados NOD (nucleotide-binding-oligomerisation domains) (451, 452). Estos receptores proporcionan mecanismos de defensa adicionales en la mucosa intestinal (453, 454). NOD1 y NOD2 están expresadas en el citosol de células presentadoras de antígenos expuestas a patógenos que contienen peptidoglicano (455). A nivel basal, la expresión de NOD1 y NOD2 en células epiteliales intestinales es baja o nula, aunque esta expresión se incrementa en casos de inflamación o en presencia de citoquinas proinflamatorias (456, 457). En el intestino delgado, los mayores niveles de expresión de NOD2 se dan en células de Paneth (458, 459). En modelos de sobreexpresión de NOD2, la estimulación con muramildipéptido se traduce en la activación de NF- $\kappa$ B, lo que, junto con la habilidad de las citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  para activar NOD2, sugiere que éste participa en la respuesta inmune innata contra patógenos microbianos (456, 460, 461). Sin embargo, últimamente la función de NOD2 es objeto de debate ya que estudios con roedores y humanos han mostrado resultados dispares: tanto una pérdida como una función excesiva del receptor en células que contienen mutaciones en el gen CARD15 (462). Específicamente, la función de NOD2 en células epiteliales intestinales está insuficientemente caracterizada, aunque la producción reducida de  $\alpha$ -defensinas en ratones con mutaciones en el gen CARD15 sugiere que éste regula la función de células de Paneth (463, 464). Sin embargo, la importancia de este hecho es incierta, ya que ratones sin la forma activa de las  $\alpha$ -defensinas o sin células de Paneth no desarrollan espontáneamente inflamación intestinal crónica (464, 465).

- Procesamiento antigénico: tras el reconocimiento antigénico llevado a cabo fundamentalmente por PRR de IECs, una población adicional de enterocitos altamente especializada actúa como interfaz entre la barrera epitelial y el tejido linfóide subyacente. Las células M (villous microfold cells) funcionan como canales conduciendo los antígenos hacia células presentadoras de antígenos profesionales, como células dendríticas o macrófagos, que los procesan y los presentan a linfocitos subyacentes (placas de Peyer en el intestino delgado y folículos linfoides en el colon) donde son reconocidos por (466). Aunque las células M son la vía más estudiada y conocida para el paso de antígenos a través del epitelio intestinal, en el intestino delgado concretamente, existen otras vías recientemente revisadas (467). Así podemos encontrar una vía de paso asociada a células caliciformes o las denominadas fugas paracelulares (paracelular leak), mediante las cuales antígenos de pequeño tamaño (menores de 10kDa), que no pueden ser captados por células dendríticas de la *lámina propia*, y llegan directamente a los nódulos linfáticos mesentéricos donde, ahora sí las células dendríticas residentes los captan y se desarrolla la respuesta inmunológica; además, las células dendríticas de la *lámina propia* tienen la capacidad de penetrar por las uniones estrechas de las células epiteliales, exponiendo las dendritas a la luz intestinal y por tanto, adquiriendo la capacidad de reconocer antígenos directamente a ese nivel (468) (Imagen 1).

Las APCs profesionales (células dendríticas y macrófagos) son células clave en el control de la inmunidad o tolerancia hacia bacterias comensales. En individuos sanos, tras el reconocimiento de antígenos comensales las células dendríticas muestran un fenotipo

inmaduro y por tanto inducen una ausencia de repuesta en las células T, probablemente mediante la diferenciación de células T *naïve* (Th0) hacia células T reguladoras CD4+, tales como Th3 (TGF- $\beta$ +, IL10+/-, IL4-) o Tr1 (IL10+) (469). Estudios *in vitro* sugieren que las células dendríticas interactúan con ciertas cepas bacterianas probióticas produciendo IL-10, lo que tiende a inducir una respuesta reguladora en lugar de efectora de tipo Th1, manteniendo así un equilibrio entre subpoblaciones efectoras y reguladoras a través de una red de citoquinas altamente controlada (470). Ante estímulos de bacterias no comensales, las APCs profesionales maduran y adquieren un fenotipo activado (471), expresando toda la gama de receptores de reconocimiento de patrones y moléculas estimuladoras, lo que les permite controlar tanto la respuesta inmunológica adaptativa (mediante una diferenciación controlada de células T *naïve* hacia células T efectoras Th1, Th2 o Th17 o hacia células reguladoras Tr1 o Th3) como la respuesta innata (mediante la activación de células NK). Hay estudios que asocian estos cambios de fenotipo con un remodelado del citoesqueleto (472).

- Diferenciación de células T colaboradoras: tras el procesamiento de los antígenos por las APCs, los péptidos resultantes son presentados a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a las células T *naïve* (Th0), comenzando así su activación seguida de su diferenciación. Dependiendo de la naturaleza del antígeno, éstos provocarán la liberación de un tipo u otro de citoquinas por parte de las APCs y, de la misma manera, en función de la naturaleza de estas citoquinas se producirá la diferenciación a uno u otro linaje de células T colaboradoras. Siguiendo este patrón, las citoquinas IL-12, IL-18, IL-23 y TNF- $\alpha$  dirigen la polarización de las células T *naïve* (Th0) hacia el subtipo Th1, de modo que cuando estos linfocitos sean activados van a presentar un fenotipo Th1 y producirán elevadas cantidades de citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), las cuales participan en la perpetuación de la reacción inflamatoria; la diferenciación hacia el subtipo Th17 está mediado por IL-6 y cantidades reducidas de TGF- $\beta$  (473-476). Estas células presentarán un fenotipo caracterizado por la expresión de IL-17, IL-22 o IL-23, entre otras. La inducción de la respuesta Th2 está dirigida por la IL-4, que a su vez, como ocurre en el caso de la respuesta Th1, es la principal citoquina implicada en la respuesta Th2, junto con la IL-5 o la IL-13. La diferenciación hacia células Treg, en la que participa de nuevo el TGF- $\beta$  (aunque liberado en grandes cantidades) hace que, una vez activadas, estas células secreten citoquinas con carácter antiinflamatorio (IL-10, TGF- $\beta$ ), que tratan de frenar o contrarrestar la reacción inflamatoria, pero que en el contexto de la EII no van a ser suficientes y se van a ver superadas por el carácter proinflamatorio de la respuesta. Con la misma función protectora o antiinflamatoria podemos encontrar las células T pertenecientes al subtipo Th3, que asimismo producen elevadas cantidades de TGF- $\beta$ . Por otro lado, las citoquinas producidas por las APCs van a presentar por sí mismas carácter proinflamatorio con capacidad de activar diferentes tipos celulares, como linfocitos presentes en la *lamina propria*, células epiteliales intestinales y macrófagos residentes en la mucosa intestinal, propagando y perpetuando así la reacción inflamatoria. Además, la activación de macrófagos y células epiteliales también conlleva la producción de quimioquinas que van a crear un gradiente quimiotáctico que favorece la extravasación y la llegada de leucocitos (477) desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio.

- **Disfunción del sistema inmunológico intestinal**

Actualmente está aceptado que la EII es el resultado de una respuesta inapropiada del sistema inmunológico de la mucosa intestinal hacia la microbiota entérica y otros antígenos lumenales. Cabe preguntarse cómo y por qué estos antígenos inducen una respuesta inflamatoria inapropiada.

- Eventos primarios: la evidencia experimental de estudios *in vitro*, con animales y en humanos sugiere que varios eventos individuales pueden iniciar alteraciones inflamatorias cuya perpetuación hará que converjan en una serie de eventos finales comunes (eventos secundarios). En primer lugar, varios estudios han demostrado una menor resistencia epitelial y una permeabilidad incrementada en la barrera epitelial de mucosas de pacientes con EC y CU (478). Estos defectos preceden al inicio clínico de la enfermedad en pacientes con riesgo familiar (479). Defectos en la permeabilidad también han sido evidenciados en pacientes sanos con antecedentes familiares de primer grado y con la mutación en el gen CARD15, implicando un defecto genético (480). Varios mecanismos han sido propuestos como desencadenantes del incremento de la permeabilidad, desde una alteración de las uniones estrechas mediada por células T hasta una disfunción neuronal entérica (478, 481-484).

En segundo lugar, pacientes con EII presentan un sistema inmunológico innato alterado. El TLR3 se encuentra disminuido en EC, pero no en CU. Sin embargo, TLR4 está significativamente aumentado en ambas (485). Posiblemente debido a su expresión en la cara basolateral, la expresión de TLR5 está generalmente suprimida en la EII. Sin embargo, en la mucosa dañada la flagelina puede acoplarse al receptor y agravar la inflamación (486). También se ha observado un incremento en la expresión de NOD2 en IECs, lo que puede ser consecuencia de la activación de la cascada de NF- $\kappa$ B, lo que puede comprometer la habilidad de la mucosa para la eliminación de patógenos, dando lugar a una inflamación crónica (456, 457).

En tercer lugar, el reconocimiento de antígenos y el procesamiento por APCs profesionales están alterados en la EII. Estudios con animales e *in vitro* sugieren que las células dendríticas reconocen de forma incorrecta las bacterias comensales e inducen una respuesta inflamatoria tipo Th1 y posiblemente Th17. Esto podría ser debido a una respuesta alterada o exacerbada de los PRR. De hecho, se ha observado un incremento en la expresión de TLR4 en células dendríticas en la EII (487). Se ha demostrado un incremento en la frecuencia de APCs con fenotipo activado o maduro en la mucosa inflamada (487), así como una escasez de APCs circulantes inmaduras, potencialmente tolerogénicas (488). En células dendríticas humanas procedentes de pacientes con EII se ha observado un incremento en la expresión de marcadores de destino al intestino (gut homing), y una respuesta aberrante a estímulos tipo LPS o CpG (488). Esta ausencia en la capacidad de regulación de estas células puede contribuir a una activación repetida de ciertas células T memoria, perpetuando la inflamación (471, 489).

En cuarto lugar, las APCs no profesionales como IECs, que en condiciones normales inducen anergia en células T CD4+, adquieren un fenotipo activado y un aumento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad en presencia de citoquinas como IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , quizás por la pérdida de moléculas B7 (CD80, CD86) (490). Se ha observado que las IECs de pacientes con EII también expresan moléculas coestimuladoras alternativas, transformándolas en APCs funcionales. De hecho, se ha comprobado una activación de células T por IECs a través de vías alternativas no dependientes de MHC-II, como por ejemplo a través de la molécula

CD1d, siempre que los antígenos alcancen la cara basolateral de las IECs donde se expresa esta molécula (491).

En quinto lugar, en la EII existe un defecto en el proceso de aclaramiento de células T autorreactivas. Debido a un fallo en la tolerancia central y periférica, las células T activadas persisten y no entran en apoptosis. Esta persistencia ha sido observada en pacientes con EC y de hecho está siendo actualmente explotada en terapias que actúan precisamente rompiendo este ciclo de activación (492, 493).

En sexto lugar, en el paciente de EII existe una incapacidad para controlar el estado de inflamación fisiológica en el intestino, y por consiguiente, esta reacción se perpetúa, dando lugar a la inflamación crónica. Además, existe un desequilibrio entre células T reguladoras y efectoras en la EII. En períodos activos de la enfermedad, las células T efectoras (Th1 y Th2) predominan sobre las reguladoras como consecuencia de un predominio en la diferenciación de células Th0 hacia Th1 (en la EC) (494). En la UC, se ha detectado un incremento en el número de células NKT activadas productoras de IL-13 e IL-5, perpetuando así la inflamación (495).

- Eventos secundarios: las vías inflamatorias iniciadas por los eventos anteriormente descritos convergen en una serie de eventos finales comunes. En primer lugar, en la EII se ha detectado una migración de células inflamatorias desde la vasculatura hacia la mucosa intestinal, siendo las principales responsables de tal migración las APCs profesionales y no profesionales. Este proceso se inicia con la liberación de moléculas quimioatrayentes tales como IL-8, MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$  (macrophage inflammatory protein), RANTES (regulated on activation normal T cells as secreted) o MCP-1, 2 y 3 (monocyte chemoattractant proteins), que inducen cambios conformacionales en moléculas de adhesión de linfocitos, (integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 o el receptor de quimioquinas 7) y de granulocitos (L-selectinas). Al mismo tiempo, citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-1 secretadas por macrófagos activados inducen la expresión de moléculas de adhesión a nivel del endotelio vascular de la mucosa (E-selectinas y P-selectinas, ICAM-1, VCAM-1, CACAM-1, VEGF-A), promoviendo la adhesión leucocitaria y su extravasación al tejido (496, 497).

En segundo lugar, una gran cantidad de metabolitos y mediadores (NO, radicales de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, proteasas y metaloproteasas) se acumulan en la mucosa produciendo daño tisular (498-501).

En tercer lugar, además de la inflamación intestinal, la EII se acompaña de una gran variedad de síntomas que afectan a distintos órganos más o menos distantes del tracto gastrointestinal. La mayor parte de estos síntomas se deben al efecto de las citoquinas proinflamatorias producidas en exceso durante la inflamación intestinal. Entre ellos se encuentran la respuesta de fase aguda, la caquexia o la pérdida de peso (502, 503), alteraciones de los hábitos alimenticios como la anorexia (504) o fiebre (505). Las consecuencias hematológicas son múltiples: anemia (506-514), alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis y aumento de la agregación plaquetaria, o leucocitosis (515). Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas



asociados a la EII, ya que existen evidencias que apoyan que el mayor riesgo observado se debe a uso de terapias inmunosupresoras y no a la propia enfermedad (516-518).

En cuarto lugar, la EII se asocia con un incremento en el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento del proceso inflamatorio crónico. El riesgo es directamente proporcional a la duración, extensión y gravedad de la EII (519-521). La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo investigada en profundidad en la actualidad. El factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B se presenta como uno de los puntos clave en dicho fenómeno (522).

### **3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RELACIONADAS CON EII**

Existe una gran variedad de vías de señalización que culminan en la activación de diversos factores de transcripción, dando lugar a la expresión de genes inflamatorios inducibles. Las proteínas quinasas y otros sistemas mensajeros conforman una red altamente interactiva para conseguir una función integrada de las células del organismo. Para el entendimiento de los mecanismos de señalización de cada agente, debe definirse su repertorio de transductores de señal y sus interacciones en esta red, en un contexto celular. Esto incluye la producción de segundos mensajeros, la activación de proteínas quinasas y la distribución subcelular de estos transductores, poniéndolos en contacto con sus dianas apropiadas. Por aplicación en esta Tesis Doctoral, detallaremos las vías NF- $\kappa$ B, JAK/STAT y MAP quinasa.

#### **3.1. NF- $\kappa$ B**

La familia NF- $\kappa$ B está formada por factores de transcripción diméricos que contienen dominios RHD (Rel-homology domains) capaces de unirse a secuencias de DNA, conocidas como elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B (5'-GGGRNNYYCC-3'; R, purina; Y, pirimidina; N, cualquier nucleótido), que están presentes en las regiones promotoras y amplificadoras de varios genes. En células de mamíferos, la familia NF- $\kappa$ B está compuesta por 5 miembros: p65 (RelA), RelB, C-Rel, p105 (NF- $\kappa$ B1; precursor de p50) y p100 (NF- $\kappa$ B2; precursor de p52). Las proteínas NF- $\kappa$ B forman homo o heterodímeros, regulando la expresión de diferentes genes, involucrados en la respuesta innata y adaptativa, inflamación, anti-apoptosis, proliferación, estrés y progresión del cáncer. En ausencia de estimulación, NF- $\kappa$ B está secuestrado en el citoplasma de forma inactiva unido a la proteína inhibidora I $\kappa$ B. Esta proteína forma parte de una familia que contiene 7 miembros: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$  y I $\kappa$ BNS. Las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  son capaces de unirse de forma directa a NF- $\kappa$ B e impedir su translocación al núcleo. Por el contrario, Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$  y I $\kappa$ BNS se encuentran en el núcleo e interactúan con NF- $\kappa$ B regulando su transcripción.

La forma activa más frecuente de NF- $\kappa$ B es el heterodímero formado por p65 (RelA) y p50. Este heterodímero es mantenido en el citoplasma de forma latente e inactiva mediante su interacción con I $\kappa$ B. Tras la estimulación del complejo multiproteico IKK (I $\kappa$ B kinase), se

produce una rápida fosforilación de residuos de serina específicos de I $\kappa$ B. IKK está formado por dos componentes catalíticos, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y un componente regulador, NEMO (NF- $\kappa$ B essential modifier), también conocido como IKK $\gamma$ . Las proteínas I $\kappa$ B fosforiladas son subsecuentemente poliubiquitinadas y degradadas por el proteasoma, permitiendo de esta manera la translocación al núcleo del heterodímero p50/p65(ReI $\alpha$ ). Esta vía de activación del NF- $\kappa$ B es conocida como la vía clásica de activación y es la responsable de la inducción de genes que darán lugar a la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-6.

Tanto p105 como p100 contienen repeticiones en el extremo C-terminal que funcionan como proteínas I $\kappa$ B, uniéndose a sus propios dominios RHD y previniendo su propia translocación al núcleo. La degradación por ubiquitinación del extremo C-terminal de p105 y p100 da lugar a sus respectivas formas maduras, p50 y p52. Mientras que la maduración de p50 es constitutiva, la de p52 es inducida por la fosforilación del extremo C-terminal dependiente de estímulo. Una vez inducida, p52 forma un heterodímero con ReI $\beta$ , regulando la expresión de diversos genes. A diferencia de la vía clásica, la fosforilación de p100 es mediada por el homodímero IKK $\alpha$ -IKK $\alpha$ , con lo que no requiere IKK $\beta$  o NEMO. Esta vía alternativa de activación es conocida como vía no clásica y es desencadenada por CD40, el receptor  $\beta$  de LT (linfotóxina) y el receptor BAFF (B-cell-activating factor belonging to the TNF family).

Existe una tercera vía de activación mediada por el homodímero p50-p50. Aunque p50 pierde su dominio de activación de la transcripción, el homodímero p50-p50 se convierte en transcripcionalmente activo cuando proteínas I $\kappa$ B nucleares del tipo Bcl3 se unen a ellos (523).

### **3.1.1. Señalización de TLR, IL-1R y TNFR hacia NF- $\kappa$ B**

TLR, IL-1R y TNFR son receptores claves en la inmunidad innata, regulando la actividad de múltiples factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B. Las tres vías comparten características en su señalización como la activación de proteínas adaptadoras, la activación de cascadas de quinasas y la convergencia en un mismo complejo, I $\kappa$ B $\alpha$ ; sin embargo, los demás componentes de la señalización son específicos de cada vía.

La superfamilia TLR/IL-1R agrupa múltiples receptores que tienen un papel crucial en la inmunidad innata y adaptativa (524). Como ya hemos mencionado anteriormente, los TLR presentan dominios extracelulares con secuencias repetidas ricas en leucina (LRR-leucine-rich repeat motifs) que reconocen diferentes PAMPs, mientras que la familia IL-1R se caracteriza por una estructura tipo inmunoglobulina en su dominio extracelular, que se une específicamente a citoquinas tipo IL-1. A pesar de sus diferentes dominios extracelulares, todos los miembros de la familia TLR/IL-1R comparten el mismo dominio intracelular, denominado TIR (toll interleukin-1 receptor). Nos centraremos en IL-1RI (receptor para IL-1) y TLR-4 (cuyo ligando es el LPS junto con el correceptor CD14 (525) y MD-2 (526)) como prototipos de cada familia. Tras la activación de cada uno de estos receptores por sus ligandos, se forma un complejo funcional de señalización (527, 528). A continuación, la proteína adaptadora MyD88 es reclutada a este complejo (527-529), permitiendo así la unión de la quinasa IRAK-1 (IL-1 receptor-associated kinase 1) y de la proteína adaptadora Tollip (529-531).

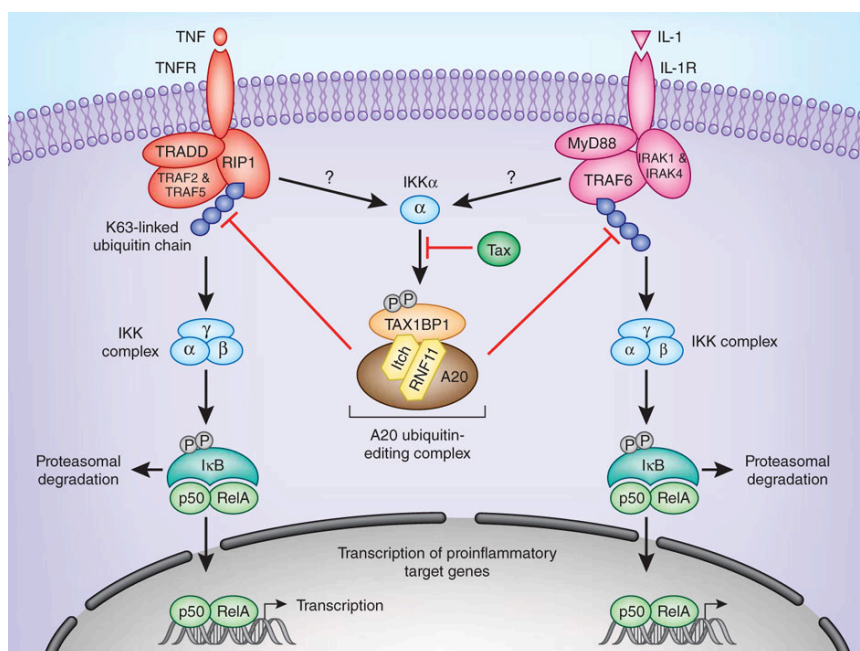
La actividad quinasa de IRAK-1 depende del reclutamiento por parte de este complejo de la molécula TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) y de la quinasa relacionada con IRAK-1, IRAK-4 (532-535). Se ha demostrado que la actividad quinasa de IRAK-1 no es indispensable para la señalización de IL-1R, ya que la activación de NF- $\kappa$ B mediada por IL-1R puede reproducirse plenamente en células deficientes en IRAK-1 (536). Sin embargo, existen datos contradictorios en lo que respecta al requerimiento de IRAK-4 (533, 534). A continuación, mediante una hiperfosforilación (probablemente autofosforilación), IRAK-1 se disocia de MyD88 y Tollip, pero no de TRAF6 (532, 537). Tras su disociación, el complejo IRAK-1-TRAF6 interacciona con la proteína de membrana TAK1 y sus adaptadores TAB1, TAB2 y TAB3. Este complejo se transloca desde la membrana al citosol, donde comienza una poliubiquitinación (536, 538-540). Esta vía dependiente de TAK1 da lugar finalmente a la fosforilación de IKK $\beta$  y a la activación, a través de la vía clásica, de NF- $\kappa$ B. Ha sido ampliamente demostrado el importante papel de TAK1 en la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de IL-1R (541). En un estudio con fibroblastos embrionarios murinos deficientes en TAK1, la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de IL-1R fue muy deficiente, pero no completamente nula (542). De forma paralela, *Shim et al.* demostraron igualmente que estos fibroblastos embrionarios mantenían una activación residual de NF- $\kappa$ B tras su activación con LPS (543). Esta reducción parcial en la señalización por parte de células deficientes en TAK1 tras estimulación con LPS o IL-1 sugiere la existencia de una vía independiente de TAK1. Aunque poco caracterizada todavía, los dos candidatos que cobran más fuerza como sustitutos de TAK1 son MEKK3 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3) y PKC (protein kinase C) (544-547) (Imagen 4).

Aunque TLR e IL-1R comparten el mismo dominio intracelular, TIR, la señalización por TLR4 presenta una ligera variación en su comienzo. A diferencia del caso de IL-1R, el reclutamiento de MyD88 por TLR4 es dependiente de un dominio denominado TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein), también conocido como Mal (MyD88 adaptor like). Es tal la relevancia de TIRAP, que ratones deficientes en este adaptador no producen citoquinas inflamatorias en respuesta a LPS (548, 549). Por otro lado, se ha descrito una vía de activación independiente de MyD88 inducida por TLR4. Así, aunque las células deficientes en MyD88 presentan una respuesta secretora de citoquinas inflamatorias en respuesta a LPS claramente mermada, se observa una activación, aunque retardada de NF- $\kappa$ B y JNK (550). Es más, la inducción de interferones de tipo I no se encuentra alterada en absoluto en estas células (551), apoyando la existencia de una segunda vía de señalización. Esta vía independiente de MyD88 se caracteriza por el reclutamiento de las proteínas adaptadoras TRAM (TRIF-related adapter molecule) y TRIF (TIR domain-containing adapter-inducing IFN $\beta$ ). Tras estimulación del TLR, TRIF se asocia con RIP1 (receptor-interacting protein 1), induciendo una activación tardía de NF- $\kappa$ B y JNK (552). De la misma manera que en el caso de células deficientes en MyD88, los macrófagos deficientes en TRAF6 mostraron una activación tardía de NF- $\kappa$ B y JNK tras estimulación con LPS, así como una producción intacta de IFN, lo que sugiere que TRAF6 es esencial para la vía dependiente de MyD88 pero no para la dependiente de TRIF (553) (Imagen 4).

Recientemente se ha demostrado la capacidad del TLR4 para activar las vías dependientes de MyD88 y TRIF secuencialmente, en un proceso mediado por la endocitosis del complejo TLR4 (554). Más específicamente, TLR4 induce la señalización MyD88-TIRAP a nivel de membrana, seguido de la endocitosis del complejo, activando la señalización TRAM-TRIF. A continuación, TRIF se asocia bien con TRAF6 y RIP1 induciendo la activación de NF- $\kappa$ B o bien

con TBK1 (TANK-binding kinase 1), activando el factor de transcripción IRF3 (IFN regulatory factor 3), el cual se une y activa promotores de interferones tipo I en el núcleo (552).

En cuanto al TNF, ejerce su función uniéndose o al TNFR1 o al TNFR2, ambos pertenecientes a la superfamilia de receptores del TNF, muchos de cuyos miembros están involucrados en el desarrollo y función del sistema inmunológico (555). Todos los receptores de esta superfamilia comparten el mismo dominio extracelular, pero existen tres tipos diferentes de dominios intracelulares, que de hecho son la base de la división en tres grandes grupos de TNFR: TNFR1 con un dominio intracelular denominado DD (death domain), TNFR2 con motivos que permiten la unión de proteínas TRAF y que son fundamentalmente expresados en células T y un tercer grupo de receptores que no contienen ningún motivo de señalización conocido. De forma similar al TLR4, la estimulación del TNFR1 también desencadena dos vías de señalización diferentes (556-558). Tras su estimulación, el TNFR1 se une a la proteína adaptadora TRADD mediante la unión de sus dominios homólogos DD. Tras esta unión, TRADD recluta a la proteína adaptadora TRAF2 y a la quinasa RIP1 (559, 560), lo que de forma muy rápida da lugar a la activación de NF- $\kappa$ B. TRAF5 también ha sido implicada en la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de TNFR1, de forma que a diferencia de células con la expresión inhibida para TRAF2 o para TRAF5 individualmente, la inhibición de la expresión de ambas impide la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta al TNF (561, 562). La inhibición específica de TRAF2 sí es suficiente para abolir la activación de JNK inducida por TNF (562), sugiriendo una posible redundancia de TRAF2 y TRAF5 en la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de TNFR1. El complejo TAK1/TAB también está implicado en la señalización de TNF. El papel esencial de TAK1 fue demostrado usando RNA de interferencia TAK1 y mediante la generación de fibroblastos embrionarios murinos deficientes en TAK1, dando lugar en ambos casos a una inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a TNF (542, 543, 563-565). De forma similar a la señalización por IL-1R, se han hallado dos vías independientes de activación de NF- $\kappa$ B mediada por TNFR1, dependiente e independiente de TAK1. Sin embargo, en este caso es conocido que la vía independiente de TAK1 es dependiente de MEKK3 (565, 566) (Imagen 4).



**Imagen 4:** Señalización por TNFR1 y IL-1R.

### 3.2. JAK-STAT

La superfamilia de receptores de citoquinas tipo I y tipo II comprende receptores que se unen a interferones, muchas interleucinas (aunque no todas) y factores estimuladores de colonias. Todas estas citoquinas utilizan el mismo mecanismo de transducción de señales: la vía JAK-STAT (567). Otras citoquinas tales como TNF, IL-1, IL-8, TGF- $\beta$  o MCS-F se unen a diferentes tipos de receptores y no usan la vía JAK-STAT como su principal modo de señalización.

Cuatro JAKs -JAK1, JAK2, JAK3 y la tirosín quinasa 2 (TYK2) se asocian selectivamente con dominios citoplasmáticos de varios receptores de citoquinas. JAK3 y TYK2 están implicados fundamentalmente en la respuesta inmunológica, mientras que JAK1 y JAK2 presentan una gran variedad de funciones, desde la participación en la defensa del organismo hasta la hematopoyesis. La delección de Jak1 o Jak2 resulta letal en ratones (567). La unión de citoquinas activa a JAKs, lo que da lugar a la fosforilación de los receptores de citoquinas. Este proceso permite la unión selectiva de miembros de la familia STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6. Estas proteínas de unión a DNA se fosforilan en los residuos de tirosina, lo que les permite dimerizarse, translocarse al núcleo y regular la expresión de genes. En ratones, la deficiencia total de Stat3 o Stat5a y Stat5b es letal, lo que demuestra las funciones críticas de estas proteínas. STAT1, STAT2, STAT4 y STAT6 tienen unas funciones más restringidas a nivel de defensa del organismo e inmunoregulación.

Stat1 y Stat2 son principalmente activadas en respuesta a IFNs (568, 569), mientras que Stat4 se induce en respuesta a IL-12 (570); de hecho, ratones *knockout* para Stat4 presentan un fenotipo muy similar a los *knockout* para IL-12, lo que sugiere que la mayoría de las actividades de IL-12 en el sistema inmune son mediadas por Stat4. De forma similar a Stat4, la habilidad para inducir la fosforilación de Stat6 está restringida a dos citoquinas, IL-4 e IL-13. Linfocitos T procedentes de ratones *knockout* para Stat6 no responden a IL-4 *in vitro* y no son capaces de adquirir el fenotipo Th2. De la misma manera que en el caso de Stat4, los ratones *knockout* para Stat6 presentan un fenotipo comparable al observado para ratones *knockout* para IL-4 (571).

### 3.3. MAPK

Las cascadas de quinasas de las MAPK (mitogen-activated protein kinase) son componentes frecuentes en la transducción de señales de células eucarióticas. Estas cascadas están integradas por tres elementos consecutivos: MAPKKK (quinasa de la quinasa de la MAP quinasa), MAPKK (quinasa de la MAP quinasa) y MAPK (MAP quinasa); su secuencia indica el orden en el que los componentes se van activando consecutivamente mediante reacciones de fosforilación. Las MAPKKKs no se encuentran asociadas directamente con el receptor membranal, necesitan activarse por componentes intermediarios cuya actividad sí puede depender de él, ejemplo de ellos son la protein quinasa C (PKC) y las proteínas de unión a GTP (proteínas-G) monoméricas y/o heterotriméricas (572). Los intermediarios que activan a las MAPKKKs fosforilan residuos localizados en los sitios catalíticos de la MAP quinasa sustrato. Las MAPKKKs así activadas fosforilan los residuos de Ser/Thr catalíticos de las MAPKKs. Las MAPKKs finalmente activan al último miembro de la cascada fosforilando los residuos de Tyr y Thr localizados en la secuencia característica TxY, donde x representa a cualquier residuo

(572). Una vez activada, la MAPK puede fosforilar directamente a proteínas que contengan al motivo fosfo-receptor Ser/Thr-Pro y regiones denominadas sitios de acoplamiento. La fosforilación del sustrato puede efectuarse tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Las estructuras primarias de las MAPKKKs no están conservadas entre sí. Su heterogeneidad estructural y la de sus dominios reguladores les confieren flexibilidad para responder a una gran variedad de estímulos y la capacidad de activar varias cascadas simultáneamente. En células de mamíferos y levaduras, las MAPKKKs se clasifican en cuatro grupos: MEKK/STE11, RAF, MLK y MOS.

Las MAPKKs se consideran proteínas con doble especificidad, pues además de ser activadas por una MAPKKK corriente arriba, activan a una MAPK corriente abajo, por lo que se consideran puntos de convergencia que integran diferentes señales en una misma ruta.

La activación de MAPK requiere la fosforilación de los residuos de Thr y Tyr localizados en el denominado núcleo catalítico. Su estructura primaria, además de incluir esta región catalítica, posee un dominio CD (de anclaje común o Common Docking) cuya secuencia permite la unión con sus MAPKKs activadoras, con fosfatasas que las inactivan o bien, con los sustratos a los que fosforila, siendo interacciones excluyentes entre sí. En células de mamíferos y levaduras se ha demostrado que la activación de las MAPK en el citoplasma las puede trasladar hacia el núcleo donde activan factores de transcripción, o a otros sitios del citoplasma donde fosforilan enzimas específicas como quinasas de proteínas, fosfatasas, lipasas, o bien, componentes citoesqueléticos (573).

Existen tres diferentes vías de señalización bien caracterizadas en mamíferos: las vías ERK1/2, p38 y JNK. En el caso de la vía de ERK, las MAPKKK más importantes son las proteínas Raf (A-Raf, B-Raf y c-Raf), claves en la respuesta a factores de crecimiento. Tras activarse, activan a su vez a MAPKK como MKK1 y MKK2 que son activadores específicos de las MAPK ERK1 y ERK2. Las vías p38 y JNK comparten la mayoría de sus mediadores a nivel de MAPKKK (MEKK1, MEKK2, ASK1, TAK1, MLK3, TAOK1, entre otros). Algunas MAPKK pueden activar tanto p38 como JNK, como es el caso de MKK4, pero otras son específicas de JNK (MKK7) o de p38 (MKK3 y MKK6). Debido a estas interferencias, surge la duda de si algunos estímulos pueden activar una de estas vías sin afectar a la otra (574).

#### **4. MODELOS EXPERIMENTALES EN EII**

Los modelos experimentales permiten llevar a cabo estudios en condiciones genéticas (especie, raza y cepa) y ambientales (condiciones mantenimiento durante el protocolo de experimentación) controladas permitiendo el estudio de procesos y mecanismos que dan a distintas enfermedades. En el caso de la EII no existe hoy en día un modelo que sea capaz de reproducir de forma exacta la enfermedad en humanos. No obstante, existen diversos modelos experimentales en roedores en los que se reproducen distintos aspectos de la EII. Éstos modelos experimentales se pueden clasificar en 4 grupos: inducidos químicamente, espontáneos, de animales transgénicos e inducidos por transferencia celular.

#### **4.1. Modelos experimentales de colitis inducida químicamente**

##### *Colitis inducida por ácido acético*

Este modelo fue descrito en 1978 por MacPherson y Pfeiffer (575). Se trata de un modelo de colitis aguda. Tras la administración intrarrectal de ácido acético disuelto en agua en una concentración de 4-50% ( $v \cdot v^{-1}$ ), aparece inflamación de la mucosa y/o transmural dependiendo de la concentración y el volumen de ácido acético utilizado.

##### *Colitis inducida por iodoacetamida*

La administración intrarrectal de iodoacetamida produce un daño a la mucosa intestinal capaz de disminuir los mecanismos de defensa antioxidante, provocando un estado colítico caracterizado por diarrea y pérdida de peso, asociado a dilatación colónica y adhesiones (576, 577). Se produce una respuesta exacerbada de tipo Th1 con un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (578). Resulta un modelo de interés para indagar en los efectos beneficiosos de compuestos antioxidantes en la EII.

##### *Colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS)*

Este modelo fue descrito por Okayasu en 1990 (579). La inflamación colónica se consigue mediante la administración en el agua de bebida de un polímero sintético, el sulfato de dextrano sódico o DSS, en un porcentaje variable. Normalmente, aunque los protocolos pueden diferir en casos concretos, se realizan ciclos en los que se alterna el DSS con el agua de bebida normal. Además del modelo agudo, en el que se lleva a cabo un solo ciclo, podemos conseguir una colitis crónica mediante la repetición de ciclos, ya que la enfermedad puede mantenerse en el tiempo. Este modelo crónico, puede dar lugar en último término a la aparición de cáncer colorrectal mediante la asociación del DSS con un agente carcinógeno como el azoximetano, de forma similar a lo que ocurre en el caso de la displasia en la CU (580). La colitis se caracteriza por una lesión extensa, depleción completa de las criptas y una regeneración lenta del epitelio colónico. En el modelo de inflamación aguda, los animales experimentan diarrea, sangrado rectal y pérdida de peso; mientras que desde el punto de vista histopatológico se observa un daño a nivel de las criptas y de las células epiteliales, infiltración de granulocitos y células mononucleares, edema tisular y ulceraciones. Juegan un papel crucial las citoquinas producidas por macrófagos, como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , y la flora bacteriana comensal (581). En cambio, en la fase crónica se ha demostrado la participación de linfocitos CD4+ en zonas de curación, los cuales producen IFN- $\gamma$  e IL-4 (582). De este modo, aunque las alteraciones producidas se asemejan a la colitis ulcerosa, es decir, una respuesta de tipo Th2, los últimos datos indican una respuesta mixta Th1/Th2 (583, 584).

##### *Colitis inducida por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)*

El modelo de colitis por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) fue descrito originariamente por Morris y col. en 1989, empleando la rata como animal de experimentación (585). Dado que el TNBS no es tóxico de forma directa para el epitelio, se administra por vía intrarrectal en una solución de etanol al 50%, el cual permite el acceso del TNBS a la mucosa por un efecto tóxico directo. Se consiguen efectos similares si el TNBS se inyecta en la mucosa (sin etanol). El TNBS se comporta como un hapteno, desencadenando una respuesta de hipersensibilidad retardada

previa reacción con las proteínas tisulares (haptención). En ausencia de TNBS la respuesta inflamatoria al etanol es aguda y se resuelve completamente en unos 3-4 días. Por el contrario, la combinación TNBS/etanol produce una respuesta que se prolonga durante semanas (hasta 8 semanas con la dosis de 30 mg/ml).

El modelo fue adaptado posteriormente al ratón, el cual parece presentar una respuesta inmunológica más “pura” de tipo Th1, frente al carácter mixto del modelo en rata, y una respuesta inicial al etanol más leve (586). En ambos casos se produce una inflamación transmural, con pérdida de peso, anorexia y diarrea. Se produce una necrosis epitelial, seguida de una inflamación de la mucosa, con formación de granulomas y fibrosis marcada, además de alteraciones funcionales como trastornos en el transporte hidroelectrolítico y en la motilidad. En el modelo en ratón la cronicidad sólo se consigue a través de un protocolo con administraciones repetidas y periódicas, o mediante un proceso de presensibilización, y se caracteriza por la producción de IL-2 e IL-17 (587). Aunque se habla de tres tipos de modelos, agudo, estable y crónico, las condiciones no están sistemáticamente definidas. En esta reacción inflamatoria, la mucosa va a presentar un infiltrado caracterizado por la presencia de linfocitos T CD4+ que liberan grandes cantidades de IFN- $\gamma$  e IL-12, pero no IL-4 (586) y de células productoras de IgG e IgM (588). Los linfocitos T reguladores tienen la capacidad de inhibir la colitis de tipo Th1 desarrollada en este modelo, lo cual queda demostrado en un experimento en el que la administración oral de TNBS previa a la inducción de la colitis inhibe el desarrollo de la enfermedad, debido a la inducción de células CD4+ reguladoras en la *lamina propria* con capacidad para producir TGF- $\beta$  (588, 589).

#### **4.2. Modelos espontáneos de colitis**

Se ha demostrado que algunos animales desarrollan colitis espontáneamente. Existen, por ejemplo, varias cepas de animales que presentan inflamación colónica con mucha frecuencia, como son los ratones C3H/HeJBir o los SAMP1/Yit. Los ratones C3H/HeJBir son una subcepa de los ratones C3H/HeJ que se generó por cruces selectivos entre los que presentaban el fenotipo de colitis espontánea. Esta cepa presenta un fenotipo muy susceptible de desarrollar colitis que aporta nuevos conocimientos en las interacciones entre sistema inmunológico, el ambiente y los factores genéticos que dan lugar a la EII (590). Los ratones SAMP1/Yit desarrollan una ileítis similar a la que se produce en la EC, por lo que resulta un modelo muy apropiado para investigar la patogénesis de la EC experimental. De hecho, este fenotipo aparece de forma espontánea sin manipulación genética, química o inmunológica, lo que permite investigar desde el comienzo del desarrollo de la ileítis hasta la fase crónica (591, 592).

#### **4.3. Modelos de colitis en animales transgénicos**

Determinadas cepas de ratones transgénicos son capaces de desarrollar colitis de manera espontánea, afectando a diferentes partes del intestino, de forma crónica o aguda (Tabla 3). Alteraciones de la flora bacteriana intestinal o la pérdida de hábitos dietéticos saludables pueden agravar la enfermedad inflamatoria intestinal en animales. Los modelos de ratones KO



son una poderosa herramienta que nos permiten estudiar las repercusiones biológicas de una mutación concreta. A continuación se esquematizan algunos de ellos.

Modelos	Área involucrada	Inflamación	Tipo de respuesta	Enfermedad relacionada	Referencia
IL-10 <sup>-/-</sup>	In. delgado/ Colon	Crónica	Transmural Th1 (inicial) Th2 (final)	CU	(593)
IL-2 <sup>-/-</sup>	Colon	Aguda/ Crónica	Th1	CU	(594)
TCR- $\alpha$ <sup>-/-</sup>	Colon	Crónica	Th2	CU	(595)
TNF <sup><math>\Delta\Delta</math>ARE</sup>	Íleon/ Colon	Crónica	Transmural Th1	EC	(596)
HLA-B27 Tg	In. delgado/ Colon	Aguda/ Crónica	Th1	--	(597)
STAT4 Tg	Íleon term/ Colon	Crónica	Transmural Th1	--	(598)
IL-7 Tg	Colon	Aguda/ Crónica	Th1/Th2	CU	(599)
MDR1a <sup>-/-</sup>	Colon	Crónica	Transmural Th1	--	(600)
G $\alpha$ i2 <sup>-/-</sup>	Colon	Aguda	Th1	CU	(601)
N-cadherina <sup>-/-</sup>	Intestino delgado	Crónica	Th1	EC	(602)

**Tabla 3:** Modelos transgénicos de EII.

#### 4.4. Modelos de colitis inducida por transferencia celular

Los ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) presentan una mutación espontánea que afecta a la respuesta inmunológica adaptativa, dando lugar a la deficiencia tanto de células B como de células T, mientras que la respuesta inmune innata continúa intacta. El sistema inmune de los ratones SCID se puede recuperar parcialmente mediante la transferencia adaptativa de células B y T normales, y dicha transferencia de poblaciones linfocitarias seleccionadas permite la definición de la función de las células transferidas *in vivo*. La transferencia adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> normales que expresan altos niveles de la molécula de superficie CD45RB (CD45RB<sup>hi</sup>), que corresponde fundamentalmente a linfocitos T *naïve* o vírgenes, provoca colitis en estos animales. La transferencia de toda la población linfocitaria CD4<sup>+</sup>, por el contrario, no da lugar al desarrollo de la enfermedad (603, 604).

Pasadas unas semanas de la transferencia, los ratones comienzan a perder peso y a presentar diarrea. Esta colitis no remite y da lugar eventualmente a la muerte del animal. El colon presenta un marcado engrosamiento debido tanto a la hiperplasia del epitelio como a la infiltración de linfocitos y macrófagos en la *lamina propria* y la mucosa. El intestino delgado no se ve afectado, solamente se observa una infiltración difusa de células mononucleares en la *lamina propria*. La enfermedad se puede prevenir mediante el tratamiento con anti-IFN- $\gamma$ , anti-

TNF- $\alpha$  o IL-10 (605), lo que indica que es una colitis mediada por células efectoras de tipo Th1. Existen diferentes variaciones de este modelo (606).

## **5. TRATAMIENTO EN LA EII**

La etiología esencialmente desconocida de la EII impide el establecimiento de una estrategia terapéutica específica frente a una diana farmacológica. Así, en la práctica clínica se emplean varios fármacos que pertenecen a diferentes grupos farmacológicos y que poseen o desarrollan una acción con un carácter inespecífico. El abanico de posibilidades terapéuticas es cada vez más amplio, aunque ninguno de los principios activos usados actualmente es eficaz ni seguro de forma universal, por lo que la investigación en este campo es muy intensa. Daremos un breve resumen de los más utilizados.

### **5.1. Aminosalicilatos**

El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), también llamado mesalazina, y diversos fármacos que contienen y liberan dicha molécula se llevan empleando desde hace mucho tiempo, como ocurre en el caso de la sulfasalazina (5-ASA unido a sulfapiridina), especialmente para casos de CU (607, 608). Su efecto depende de la porción 5-ASA (609, 610), que en el caso de la sulfasalazina es liberada de la sulfapiridina en el colon por medio de las azoreductasas de la flora intestinal, lo que justifica su ineficacia en la EC manifestada en el intestino delgado. Los aminosalicilatos actúan tópicamente por lo que su eficacia depende de la concentración alcanzada en el lumen (611-613). Por tanto, el fármaco ha de llegar intacto al lugar de la inflamación, para lo cual la estrategia más utilizada son las formas de liberación controlada.

Aunque no está completamente dilucidado, su mecanismo de acción no se debe a la modulación de la síntesis de prostaglandinas, como ocurre en el caso de los salicilatos (614, 615), sino que parecen alterar al factor de transcripción NF- $\kappa$ B con la consiguiente modificación en la producción de mediadores inflamatorios. Así, se ha demostrado que la sulfasalazina bloquea la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (616-618), mientras que la molécula de 5-ASA en su forma libre impide la fosforilación de RelA (619).

Los aminosalicilatos son fármacos bien tolerados, y los efectos adversos ligados a la fracción 5-ASA son moderados y reversibles: mareos, fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas o erupciones cutáneas (620, 621). Existen efectos adversos propios de la sulfasalazina debidos a la porción de sulfapiridina, como oligospermia (622) o deficiencia de folato (623). Existen otros efectos adversos más graves, pero poco frecuentes (624, 625).

### **5.2. Glucocorticoides**

Los glucocorticoides tienen una estructura basada en el esteroide natural cortisol y actúan como agonistas de su receptor. En cantidades suprafisiológicas presentan efectos antiinflamatorios e inmunosupresores debido a la modulación de la transcripción de diversos genes involucrados en la respuesta inmunológica (626, 627). La prednisolona y su profármaco, la prednisona, junto con la 6-metil prednisolona, son los más empleados en el tratamiento de la EII. Las preparaciones a base de budesonida también son muy utilizadas, ya que este

fármaco sufre un gran metabolismo de primer paso y su baja biodisponibilidad (10-20%) permite la llegada de una menor cantidad a circulación sistémica, minimizando las reacciones adversas.

La administración prolongada conlleva la aparición de diversos efectos adversos, siendo el riesgo proporcional a la duración de la exposición al fármaco y a la dosis administrada (628). Ciertos efectos adversos poseen especial relevancia en el caso de la EII, como la hiperglucemia, la esteatohepatitis no alcohólica o el riesgo elevado de osteoporosis (629, 630). La administración rectal de glucocorticoides puede ser beneficiosa en este sentido, ya que supone menores efectos sistémicos, como en el caso de la budesonida en forma de enema (631).

La dosis ideal de glucocorticoides en CU o EC no está establecida sistemáticamente, de forma que es la experiencia individual la que determina la práctica clínica en este sentido. Está establecido que aquellos pacientes que presentan la enfermedad con un grado de actividad moderado o grave deben ser tratados en primer lugar con glucocorticoides (por vía intravenosa en los casos graves) (632). Tras la respuesta al tratamiento, la dosis será disminuida gradualmente hasta la retirada del fármaco, principalmente para evitar efectos adversos. Entonces se comienza con un tratamiento inmunosupresor, normalmente a base de aminosalicilatos, para mantener la remisión.

Existen dos características que limitan la utilización de glucocorticoides en la práctica clínica. En primer lugar, existen pacientes que no responden al tratamiento con glucocorticoides debido a un fenómeno de resistencia o refractariedad mediado por un mecanismo molecular aún desconocido y en segundo lugar, los casos de dependencia que se dan en algunos pacientes una vez que han superado la fase activa de la enfermedad, sufriendo una reactivación cuando se procede a la supresión paulatina del tratamiento.

### **5.3. Azatioprina y 6-mercaptopurina**

La 6-mercaptopurina y su profármaco la azatioprina son antimetabolitos púricos utilizados en el tratamiento del cáncer y que han demostrado propiedades inmunosupresoras. Su metabolito activo, la 6-tioguanina se acumula intracelularmente impidiendo la síntesis de purinas y ácidos nucleicos y la reparación del DNA, lo que conlleva una inhibición de la división y proliferación celular, siendo éste el mecanismo probable de su acción inmunosupresora (633).

Son elegidos en casos de corticodependencia y corticorretractariedad, de enfermedad extensa (más allá del colon), para la prevención de recurrencias tras la resección quirúrgica y para el mantenimiento de la remisión.

Los principales efectos adversos debidos a la azatioprina y a la 6-mercaptopurina pueden clasificarse en dos categorías: alergias, que se manifiestan con pancreatitis, fiebre, erupciones, náuseas, diarrea o hepatitis; o toxicidad relacionada con la dosis, que puede dar lugar a depresión a nivel de médula ósea y leucopenia, anemia o trombocitopenia, con un mayor riesgo de infecciones oportunistas o neoplasmas.

#### **5.4. Metotrexato**

Otro fármaco empleado en el tratamiento del cáncer es el metotrexato, cuya estructura es análoga a la del ácido fólico. El efecto antiproliferativo y citotóxico responsable de su uso en cáncer no es el responsable fundamental del efecto antiinflamatorio, sino que éste se debe a la inducción de apoptosis de linfocitos T y la inhibición de la activación de los mismos, siendo dichos efectos inmunomoduladores obtenidos a baja dosis. Su acción es muy rápida, por lo que se emplea en casos de falta de respuesta a azatioprina o 6-mercaptopurina.

Los efectos adversos son clasificados en tres categorías: efectos antiproliferativos en médula ósea, epitelio intestinal y folículos pilosos relacionados con dosis altas; reacciones idiosincrásicas de hipersensibilidad o de tipo alérgico; y daño hepático debido a los efectos acumulativos de la exposición prolongada. La aparición de los primeros determina la necesidad de disminuir la dosis y de la coadministración de ácido fólico (634); mientras que las reacciones alérgicas (erupciones y pneumonitis) desaparecen tras la retirada del tratamiento. Al igual que en el caso de los glucocorticoides existe la posibilidad de resistencia a metotrexato, debida a un incremento en la expresión de la enzima diana (635).

#### **5.5. Ciclosporina y tacrolimus**

Estas dos moléculas con diferente origen comparten un mecanismo inmunosupresor similar, ya que se unen a proteínas citoplasmáticas dando lugar a complejos que inhiben la fosfatasa calcineurina, impidiéndose la activación del factor nuclear de células T activadas NFAT, que regula la transcripción de citoquinas relevantes en la activación de los linfocitos T, IL-2 e IFN- $\gamma$ , bloqueando en último término la activación de dichas células (636).

La pobre absorción de la ciclosporina determina su formulación farmacéutica en forma de microemulsión, mientras que el tacrólimo es más eficiente. Ambos presentan un estrecho margen terapéutico, así que su uso está muy restringido y conlleva un seguimiento de los niveles sanguíneos para la dosificación y monitorización de la posible toxicidad.

#### **5.6. Terapia biológica**

Los avances biotecnológicos de los últimos años han permitido el desarrollo de terapias biológicas en la EII, así como en otras enfermedades inflamatorias de carácter crónico, como la artritis reumatoide, obtenidas por técnicas de biología molecular. La principal diferencia con respecto a los tratamientos o fármacos tradicionales es la interferencia con una diana única, lo que hace que la eficacia de dichas moléculas refleje la importancia patogénica de la diana en cuestión. Pueden establecerse 3 grupos dentro de la terapia biológica:

- *Neutralización de citoquinas proinflamatorias*: concretamente, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (637), o el eje IL-12/IL-18/IFN- $\gamma$ . El grupo más estudiado es el formado por las moléculas que interfieren con el TNF- $\alpha$ . Las moléculas sintéticas que se van a unir a dicha citoquina en su forma soluble o unida a la membrana, impiden la unión a su receptor, y por tanto la ejecución de sus actividades biológicas (638-642). Los fármacos más utilizados son: el infliximab, un anticuerpo monoclonal

quimérico humano-murino. Se administra únicamente por vía intravenosa; y el adalimumab, un anticuerpo monoclonal humano, lo que evita las reacciones frente a las fracciones procedentes de otra especie, y por tanto muy útil en pacientes que producen anticuerpos frente al infliximab. Se administra por vía subcutánea. Originalmente se aplicaron a casos refractarios, pero actualmente tienen un uso mucho más extendido. Los principales efectos adversos son el desarrollo de reacciones en la infusión (con infliximab especialmente). El más empleado en el caso de EC es el infliximab, que se emplea en la inducción de la remisión en pacientes con EC moderada y que son resistentes a tratamientos convencionales, siendo muy útil además en el cierre de fístulas. Actualmente existen otras estrategias terapéuticas que se encuentran en proceso de investigación. Entre ellas, los inhibidores de TNF- $\alpha$  de pequeño tamaño molecular, como los inhibidores de fosfodiesterasas (643-648), la talidomida (649-652) o los inhibidores de la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (653)

- *Aplicación de citoquinas antiinflamatorias*: fundamentalmente la administración de IL-10 (654, 655) o de IL-11 recombinante humana.

- *Interferencia con la activación celular o tráfico celular*: diversas estrategias se recogen en este punto, como los anticuerpos anti-CD4 o anti- $\alpha_4$  con resultados poco prometedores, debido a su toxicidad (656);

### **5.7. Terapia génica**

La terapia génica consiste en la introducción de un gen activo y funcional en células somáticas con el fin de expresar o inhibir en ellas una proteína terapéutica, mediante el empleo de un vector vírico (657-661). Un ejemplo son los oligonucleótidos antisentido frente a ICAM-1, como el ISIS 2302, cuyos efectos no han sido confirmados (662). La investigación clínica de estos procedimientos se encuentra en un periodo de intensa actividad con el fin de conseguir nuevas estrategias de modo menos costoso y con una eficacia clínica aceptable.

# OBJETIVOS

La terapia farmacológica de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal se dirige fundamentalmente a la limitación de la inflamación y de la respuesta inmunológica de forma inespecífica. Esto se debe a la caracterización insuficiente de la etiología, lo que ha impedido hasta la fecha abordar una diana farmacológica concreta. Aunque la eficacia del tratamiento antiinflamatorio en la EII está demostrada y en general asegura un manejo adecuado de la enfermedad, los fármacos utilizados producen importantes efectos adversos, casos de dependencia en el caso del uso de glucocorticoides, y casos de resistencia o pérdida de eficacia. Todos estos inconvenientes justifican la búsqueda de nuevos agentes que puedan aportar un mejor perfil farmacológico, así como un cuadro reducido de complicaciones secundarias.

Los polifenoles, incluyendo flavonoides, presentan un interesante potencial debido a su baja toxicidad y numerosas propiedades biológicas evidenciadas tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos compuestos presentan numerosas actividades biológicas, revisadas con anterioridad (173), pero en particular los flavonoides, han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidativas/antiradicalarias y la relación estructura actividad (REA) en este sentido ha sido extensamente caracterizada (663). Sin embargo, también presentan numerosas propiedades antiinflamatorias/inmunomoduladoras no relacionadas con este mecanismo, y los requerimientos estructurales para dichas propiedades, no sólo han sido poco estudiados, sino que difieren de los requeridos para sus propiedades antioxidativas/antiradicalarias.

Esta Tesis Doctoral ha tenido como objetivo principal dilucidar el efecto de diversos flavonoides en condiciones de inflamación, focalizándonos en los requerimientos estructurales, los mecanismos moleculares involucrados y las características farmacocinéticas. Diferentes dianas moleculares y celulares han sido identificadas así como el requerimiento de una variabilidad estructural directamente relacionada con su perfil de funciones biológicas, específicamente en sus efectos sobre condiciones inflamatorias.

Basado en estas premisas formulamos tres objetivos principales en esta Tesis Doctoral:

4. Estudiar la relación entre la farmacocinética de rutina y quercetina y su efecto antiinflamatorio a nivel de intestino delgado y grueso.
5. Validar el efecto antiinflamatorio de la rutina, utilizando un modelo crónico de inflamación intestinal dependiente de linfocitos T.
6. Caracterizar el mecanismo de acción a nivel molecular y celular, y la relación estructura actividad de los flavonoides.

# MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados, excepto donde se indique lo contrario, han sido suministrados por Sigma® (Madrid, España). La budesonida fue adquirida a Molekula Ltd. (Gillingham, UK).

## 2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### 2.1. Animales de experimentación

En los experimentos *in vivo*, así como *ex vivo*, se emplearon ratas Wistar hembras, con un peso medio comprendido entre los 175 y los 225 g, suministradas por Harlan Laboratories® (Barcelona, España). Dichos animales fueron mantenidos en jaulas de macrolón y sometidos a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Para su alimentación se empleó una dieta estándar para roedores Panlab A04 (Barcelona, España), y agua *ad libitum*. Los experimentos realizados han sido aprobados por Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se han llevado a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU.

### 2.2. Inducción de colitis por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS)

La colitis fue inducida mediante la administración intrarrectal de una solución de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en etanol al 50% (V.V<sup>-1</sup>) (585). La cantidad administrada fue de 10 mg de TNBS por rata en un volumen de 0.25 ml. Para ello se sometió al animal a una anestesia con isofluorano. La inducción de la colitis se llevó a cabo dos días después del comienzo del tratamiento de los animales con los flavonoides. Durante el desarrollo del protocolo experimental los consumos de agua y comida así como la modificación del peso corporal fueron registrados diariamente. El sacrificio de las ratas se realizó 7 días después de la inducción de la colitis.

### 2.3. Inducción de colitis mediante transferencia linfocitaria

La inducción de la colitis se realizó mediante la transferencia de una subpoblación purificada de células T *naïve* (vírgenes o no diferenciadas) CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> a ratones RAG1<sup>-/-</sup> (ratones que carecen de linfocitos T y B maduros). Las células T *naïve* CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> fueron obtenidas por separación magnética en columnas (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) a partir de esplenocitos aislados de ratones WT C57. Una vez obtenidos, estos esplenocitos han de ser filtrados utilizando un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350), para obtener así una suspensión monocelular con la que poder proceder a la separación. En un primer paso, tras lavar esta suspensión celular con tampón MACs (PBS 1X, 2% albúmina, 1 mM EDTA), se aislaron las células T CD4<sup>+</sup> por selección negativa mediante el marcaje de células no CD4<sup>+</sup> con anticuerpos específicos (anti-CD8α, anti-CD45R, anti-CD11b, anti-CD25, anti-CD49b, anti-TCRγ/δ y anti-Ter-119). En un segundo paso, el marcaje específico de CD62L permitió el aislamiento de células T *naïve* CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> mediante selección positiva. Las células T *naïve* CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> purificadas así obtenidas fueron lavadas, resuspendidas en

PBS 1X frío a  $1.5 \times 10^6$ /ml y finalmente inyectadas intraperitonealmente en un volumen de 0.2 ml a ratones RAG1<sup>-/-</sup>. Otro grupo recibió el mismo volumen solo de PBS. Los ratones fueron monitorizados durante 8 semanas tras la transferencia, controlando semanalmente el peso corporal de cada uno de ellos y se refirió como porcentaje de pérdida de peso corporal respecto al día de la inyección de células T *naïve* CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> o PBS (valor inicial de peso corporal). Además del peso corporal, también se evaluaron semanalmente parámetros como diarrea, presencia de sangre en heces (Hemocult Sensa, Beckman Coulter, Miami, Florida, EEUU) y valores hematológicos. La transferencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> a ratones Rag1<sup>-/-</sup> da lugar a una progresiva pérdida de peso corporal, siendo significativa entre las semanas 4 y 6 tras la transferencia. Los animales seleccionados para este estudio mostraron una media del 10% de pérdida de peso corporal alrededor de la semana 8, lo cual junto con los parámetros anteriormente mencionados, nos permitió establecer un índice de actividad de la enfermedad (DAI) el cual nos ayudó a determinar el momento óptimo de los animales para el comienzo de tratamiento. La evaluación del DAI se estableció de la siguiente manera: consistencia de las heces (0, normales; 1, algo blandas y/o prolapso rectal pero manteniendo estructura; 2, blandas y/o pérdida de estructura; 3, diarrea); sangre en heces (0, sin sangre; 1, sangre oculta; 2, sangre visible); incremento de peso corporal menor del 2% respecto a la semana anterior, +1. Cuando los animales se encontraron bajo un DAI comprendido entre 2.5 y 3.5, basándonos en la evaluación anteriormente descrita, se consideró momento óptimo para el comienzo del tratamiento farmacológico, indicando la instauración de colitis clínicamente significativa. En este tratamiento dicha instauración ocurrió en la semana 7 tras la transferencia linfocitaria (664). A nivel visual, el establecimiento de la colitis pudo observarse con un prominente prolapso rectal. Dos diferentes experimentos fueron llevados a cabo, usando dos dosis de rutina, siendo por otro lado ambos experimentos idénticos. Desde el comienzo del tratamiento, la modificación del peso corporal fue registrada diariamente, mientras que el estudio del DAI se siguió manteniendo cada dos días. El sacrificio de los ratones se realizó 22 y 12 días después del comienzo del tratamiento, en cada caso.

#### **2.4. Inducción de ileítis por ácido trinitrobenzenosulfónico**

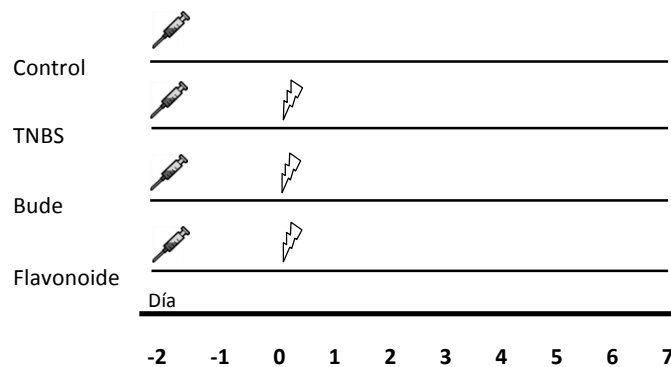
La inducción de la ileítis se llevó a cabo mediante la inyección de TNBS en el lumen ileal, modificando el método establecido por Morris *et al* (585). Tras permanecer un periodo de 48 horas en ayuno, aunque con acceso libre a agua, las ratas fueron sometidas a una laparatomía mediante una incisión en la línea media, bajo anestesia con isoflurano. 1 ml de TNBS a una concentración de 30 mg/ml, disuelto en 50% de etanol, fue inyectado directamente en el lumen ileal, a 10 cm de la válvula ileocecal, con una aguja 29G. Las ratas control fueron igualmente operadas pero se les inyectó 1 ml de solución salina. La laparatomía fue cerrada mediante dos líneas de sutura de seda. Los animales se dispusieron en jaulas independientes durante 24 horas, para evitar infecciones de la herida entre ellos. 60 minutos después de la operación, las ratas tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*. La inducción de la ileítis se llevó a cabo dos días después del comienzo del tratamiento de los animales con los flavonoides. Durante el desarrollo del protocolo experimental, los consumos de agua y comida, así como la modificación del peso corporal fueron registrados diariamente. El sacrificio de las ratas se realizó 6 días después de la inducción de la ileítis

#### **2.5. Diseño experimental *in vivo***

Se han llevado a cabo experimentos *in vivo* utilizando el modelo del ácido trinitrobenzosulfónico (TNBS) para la inducción de colitis o de ileítis en ratas y el modelo de colitis de transferencia linfocitaria en ratones.

### 2.5.1. Modelo de colitis por TNBS en rata

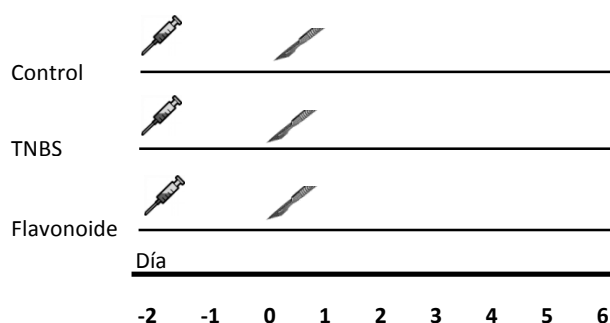
En el caso del modelo de colitis por TNBS se han realizado dos experimentos. En el primero de ellos, tras un periodo de aclimatación de 7 días, las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos diferentes: grupo control o no colítico, grupo TNBS o control colítico, grupo budesonida (2 mg/kg), corticoide administrado por vía oral (usado comúnmente en la EII), y grupos tratados con rutina, administrada por vía oral, o quercetina, administrada por vía intraperitoneal (Esquema 1). Las dosis administradas de rutina y quercetina fueron calculadas por equivalencia en función del peso molecular, así se utilizaron 20 mg/kg y 11.1mg/kg, respectivamente. La dosis de budesonida utilizada fue adaptada en base a la dosis usada en humanos, y tiene actividad constatada en este modelo según experimentos anteriores de nuestro grupo de investigación . Todos los grupos recibieron TNBS excepto el grupo control o no colítico, al cual se administró un enema de solución salina. La administración oral se realizó mediante sonda nasogástrica, utilizando un volumen de administración de 1 ml por animal y día; mientras que, en el caso de la administración intraperitoneal, el volumen de inyección fue de 0,2 ml. Los vehículos utilizados para la administración oral e intraperitoneal fueron metilcelulosa al 1% (P.V.<sup>-1</sup>) y solución salina estéril, respectivamente. Estos vehículos fueron administrados igualmente a los grupos control y TNBS. Se llevó a cabo un pretratamiento, en el que la administración de las sustancias a examinar comienza dos días antes de la inducción de la colitis por TNBS. La administración de los flavonoides se realizó durante 7 días, 9 días de experimento en total. En el segundo experimento, la organización de los grupos y el diseño experimental fue similar, con la salvedad de que el grupo con tratamiento recibió rutina vía intraperitoneal (20 mg/kg). Ambos experimentos fueron realizados al menos dos veces con un n=10 en la mayor parte de los grupos experimentales.



**Esquema 1:** Diseño experimental en el modelo de colitis por TNBS

### 2.5.2. Modelo de ileítis por TNBS en rata

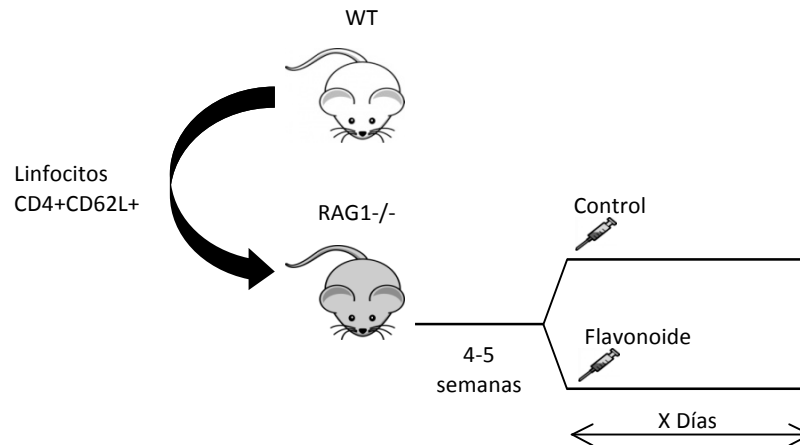
Por otro lado, se llevó a cabo un modelo de ileítis por TNBS. Tras un periodo de aclimatación de 7 días, las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos diferentes; grupo control o no colítico (n=4), grupo TNBS o control colítico (n=6), grupo rutina (n=6) y grupo quercetina (n=4). Rutina y quercetina fueron administradas por vía oral y en dosis equimolares, 20 mg/kg y 11.1mg/kg respectivamente (Esquema 2). El protocolo experimental fue de pretratamiento, en el que la administración de las sustancias a examinar comienza dos días antes de la inducción de la ileítis por TNBS. La administración de los flavonoides se realizó durante 8 días en total.



**Esquema 2:** Diseño experimental en el modelo de ileítis por TNBS

### 2.5.3. Modelo de colitis por transferencia linfocitaria en ratón

En el modelo de inducción de colitis por transferencia linfocitaria, tras el asentamiento de la colitis, los ratones fueron distribuidos en diferentes grupos, de modo que el valor medio de pérdida de peso relativo entre grupos fuera comparable. Dos diferentes experimentos fueron llevados a cabo, usando dos dosis de rutina. En ambos experimentos, la administración se realizó por vía oral con sonda nasogástrica, utilizando un volumen de administración de 0.1ml por animal y día. En el primero de ellos utilizamos una dosis de 28mg/kg, equivalente en función del peso corporal a la dosis de 20mg/kg utilizada en rata. En este caso el flavonoide fue administrado durante 22 días. En este experimento, el tratamiento con rutina resultó en una protección significativa de la pérdida de peso corporal y una reducida secreción de TNF- $\alpha$  por células de ganglios linfáticos mesentéricos *ex vivo*, pero ningún otro parámetro se vio significativamente afectado. Por tanto en estas condiciones, la rutina parece ofrecer alguna protección pero lejos de los efectos mostrados previamente en modelos anteriores. Consideramos que la dosis aplicada fue baja para este modelo y establecimos un segundo experimento donde usamos el doble de dosis que en el experimento anterior, 57mg/kg. En este segundo caso el flavonoide se administró durante 12 días. El vehículo utilizado, metilcelulosa al 1% (P.V. <sup>-1</sup>), fue administrado de forma similar al grupo colítico control y al grupo transferido con PBS (Esquema 3)



**Esquema 3:** Diseño experimental en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria

En todos los experimentos se realizó un control diario del peso corporal y del estado general del animal, del consumo de agua y comida y del aspecto de las heces. El sacrificio de los animales se realizó por dislocación cervical.

## 2.6. Estudio farmacocinético en animales sanos

Tras el periodo de aclimatación, las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos (n=9 cada uno). Los animales fueron tratados con rutina o quercetina por vía oral o intraperitoneal, de forma similar a los casos anteriormente descritos, durante 3 días, y al tercero los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 3, 5 o 7 horas tras la administración del flavonoide. Se extrajeron colon e íleon completos, que fueron debidamente lavados con solución salina y homogeneizados en etanol al 96%. El flavonoide fisetina fue añadido a las muestras como control interno. Los homogenados fueron liofilizados y los niveles de rutina y quercetina en colon e íleon fueron analizados mediante HPLC-MS/MS (6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies, Santa Clara CA). La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante el modo isocrático en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) a 35°C. El flujo fue de 0.5 ml/min y la fase móvil fue 65:35 metanol/agua, conteniendo ambos acetato amónico 5 mM y 0.14% de ácido fórmico, pH 2.9. Se usó la ESI (ElectroSpray ionization) en modo negativo con las siguientes condiciones: temperatura del gas 350°C, flujo del gas 10 L/min, nebulizador 20 psi, voltaje de capilaridad 2000 V. La adquisición MS/MS fue realizada en una reacción múltiple monitorizada (MRM) usando la transición específica m/z de 301.2 a 151.1 y 179.3 (calificador) para la quercetina, y de 609.4 a 300.4 para la rutina (665). Para el control interno, fisetina, se siguió la transición m/z de 285 a 135.1. Previamente a la inyección en el sistema HPLC-MS/MS, las muestras fueron disueltas en 0.1 ml de metanol, sonicadas y centrifugadas. 5  $\mu$ l del sobrenadante limpio fue inyectado. El promedio de recuperación del control interno añadido a las muestras siguiendo este método fue aproximadamente del 85%.

## 2.7. Obtención del plasma sanguíneo

La extracción de sangre se realizó en la bifurcación aorto-femoral en el momento del sacrificio. Se utilizó heparina como anticoagulante (5000 UI ml<sup>-1</sup>). La sangre fue sometida a una centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener el plasma. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su posterior uso.

### 3. EVALUACIÓN DEL DAÑO INTESTINAL

#### 3.1. Cuantificación del daño colónico

Inmediatamente después de la muerte del animal, el colon fue extraído y se limpió con solución salina para eliminar los restos de heces. Asimismo se retiraron las adherencias mesentéricas. El tejido se mantuvo sobre una superficie refrigerada hasta su posterior congelación. Las muestras colónicas fueron pesadas, y la longitud fue determinada al someterlas a un peso constante de 2 g.

En el modelo de colitis inducido por TNBS, el daño colónico macroscópico fue calculado basándonos en diversas características propias de la colitis: adhesiones, cicatrices, fragilidad, dilatación proximal, necrosis, deformación, obstrucción intestinal, hiperemia y fibrosis. Según éstos un observador ajeno al experimento estableció un índice de daño colónico con una escala comprendida entre 0 y 24 (Tabla 4). El colon fue dividido en cinco segmentos longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros; de igual modo, se obtuvieron dos segmentos transversales y adyacentes al daño que se emplearon para las pruebas histológicas y para la extracción de RNA, respectivamente. Las muestras colónicas así obtenidas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso, a excepción de la muestra obtenida para el estudio histológico (protocolo descrito en el siguiente apartado).

Parámetro	Valoración
0 Ninguna; 1 disección dificultosa; 2 adherencias visibles; 2 ovillo brutal	Adhesiones
0 Normal; 1 requiere limpieza manual; 2 impacto fecal	Obstrucción
0 Normal; 1 ligera o intensa-parcheada o pérdida patrón vascular; 2 intensa-generalizada; 3 franca hemorragia	Hiperemia
0 Normal; 1 cierta rigidez; 2 marcada rigidez	Fibrosis
0 Ninguna; 1 restos aislados; 2 parcheada; 3 lesión focal<0.8cm; 4 lesión focal>0.8cm; 5 lesión esencialmente continua y extensa	Necrosis
0 Ninguna; 1 ligeramente anormal; 2 en círculo o elipse; 3 total	Deformación
+1 Cicatrices; +1 Fragilidad; +2 Dilatación proximal	Otros

(Índice máximo: 24)

**Tabla 4:** Criterios establecidos para el índice macroscópico en el modelo de colitis por TNBS

En el modelo de colitis inducido por transferencia linfocitaria, el daño colónico es visualmente muy diferente al encontrado tras la inducción de colitis por TNBS. Es por ello, que el índice de daño colónico está basado en características tales como el hiperemia, fibrosis, engrosamiento o lesiones macroscópicamente evidentes (Tabla 5). De esta forma el índice de daño macroscópico queda comprendido en una escala entre 0 y 12. El colon fue dividido en cuatro segmentos longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros; de igual modo, se obtuvieron dos segmentos transversales y adyacentes al daño que se emplearon para las pruebas histológicas y para la extracción de RNA, respectivamente. Las muestras colónicas así obtenidas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso, a excepción de la muestra obtenida para el estudio histológico (protocolo descrito en el siguiente apartado). De la misma manera también se obtuvieron los segmentos de intestino delgado, duodeno, yeyuno e íleon. El procesamiento fue exactamente el mismo que el descrito para colon.

Parámetro	Valoración
0 Normal; 1 media o intensa parcheada; 2 severa; 3 muy severa	Hiperemia
0 Ninguna; 1 media; 2 severa	Fibrosis
0 Ninguno; 1 medio; 2 severo	Engrosamiento
0 Ninguna; 1 media; 2 severa	Lesión macroscópicamente evidente
(Índice máximo: 12)	

**Tabla 5:** Criterios establecidos para el índice macroscópico en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria

### 3.2. Cuantificación del daño ileal

Inmediatamente después de la muerte del animal, un segmento de 10 cm de íleon terminal, incluyendo la zona ulceración debida a la inyección de TNBS, fue extraído y limpiado con solución salina. Las muestras fueron pesadas, y la longitud fue determinada al someterlas a un peso constante de 2 g.

Las lesiones de la mucosa del íleon fueron determinadas macroscópicamente usando criterios propios del proceso de inflamación ileal, tales como adhesiones, estenosis, úlceras y engrosamiento de la pared. Según éstos un observador ajeno al experimento estableció un índice de daño colónico con una escala comprendida entre 0-8 (Tabla 6).

Parámetro	Valoración
0 Ninguna; 1 mínima; 2 involucra varias segmentos intestinales	Adhesiones
0 Normal; 1 media; 2 severa, dilatación proximal	Fibrosis
0 Normal; 1 hiperemia; 2 ulceración	Úlceras
0 Menor de 0.5mm; 1 0.5-1.5mm; 2 más de 1.5mm	Engrosamiento
(Índice máximo: 8)	

**Tabla 6:** Criterios establecidos para el índice macroscópico en el modelo de ileitis por TNBS

El íleon fue dividido en cuatro segmentos longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros; de igual modo, se obtuvieron dos segmentos transversales del extremo terminal que se emplearon para las pruebas histológicas y para la extracción de RNA, respectivamente. Las muestras así obtenidas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, a excepción de la muestra obtenida para el estudio histológico (protocolo descrito en el siguiente apartado).

### 3.3. Histología

Uno de los segmentos transversales obtenidos tras el sacrificio fue fijado utilizando para ello formaldehído al 4% ( $\text{P.V}^{-1}$ ). A continuación estas muestras se incluyeron en bloques de parafina para posteriormente realizar cortes de un grosor de  $4\mu\text{m}$  con el empleo de un microtomo. Los cortes realizados fueron montados en portas y sometidos a una tinción rutinaria con hematoxilina-eosina, para el estudio de la morfología y disposición del tejido colónico o ileal.

Un índice histológico específico fue establecido para cada modelo experimental utilizado, en base a características propias de cada uno de ellos. Así, los criterios utilizados para el establecimiento del índice histológico en el modelo de colitis por TNBS fueron edema en la capa submucosa, erosión de la capa serosa, infiltración de células inflamatorias, vasculitis y perforación. En el caso del modelo de colitis inducido por transferencia linfocitaria, el criterio seguido está basado en la pérdida de la estructura de las criptas, erosión epitelial, grosor e infiltración de la submucosa. La toma de imágenes se realizó con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos.

### 3.4. Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) y fosfatasa alcalina (AP) en colon e íleon

Una de las muestras de colon o íleon obtenidas tras el sacrificio del animal, fue homogenizada en un tampón compuesto por Tris Base (50 mM) y HTAB al 0,5% ( $\text{P.V}^{-1}$ ). Una vez centrifugado el homogenado, el sobrenadante resultante fue empleado para la determinación de actividades enzimáticas en colon e íleon. La determinación de la actividad mieloperoxidasa, utilizada como marcador de infiltración neutrofílica, se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de o-dianisindina y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (666). Los resultados fueron



expresados como Unidades ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )/g de tejido húmedo. Igualmente, la actividad fosfatasa alcalina fue determinada usando para ello un método espectrofotométrico en cual el sustrato de la reacción catalizada por dicha enzima es el p-nitrofenilfosfato sódico (667). Los resultados se expresan en este caso como mUnidades/mg de proteína.

#### **4. EXPERIMENTOS *IN VITRO***

##### **4.1. Diseño experimental *in vitro***

En todos los experimentos *in vitro*, excepto en aquellos en los que se indica lo contrario, se llevó a cabo el mismo protocolo experimental. Todos los flavonoides fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). La cantidad de DMSO añadida a los distintos grupos experimentales fue igualada, utilizando como concentración máxima 1:1000 para dicho disolvente. En la mayoría de los experimentos se realizó un estudio del efecto de los flavonoides en función de la concentración empleada, y en tal caso las concentraciones estuvieron comprendidas entre 0.01 $\mu\text{M}$  y 100 $\mu\text{M}$ . En algunos casos, una determinada concentración fue seleccionada para el estudio concreto de un determinado efecto, y tal concentración es por tanto especificada en dicho caso. Los tratamientos (flavonoides y controles) fueron añadidos al cultivo una hora antes que el estímulo correspondiente en función del tipo celular. El tiempo de incubación depende del tipo celular, así como de la técnica a realizar, y por tanto, se especifica donde corresponde.

##### **4.2. Cultivo de líneas celulares de enterocitos**

Las dos líneas celulares de epitelio intestinal empleadas (Caco-2 e IEC18) fueron obtenidas del Servicio de Cultivo Celular de la Universidad de Granada. En ambos casos se empleó como medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1%: penicilina [100 U/ml], estreptomicina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5  $\mu\text{g/ml}$ ]). Los diversos cultivos se mantuvieron en una atmósfera con el 5% de  $\text{CO}_2$  y a 37° C. Las células fueron mantenidas en placas de 78  $\text{cm}^2$  hasta su confluencia. El medio de cultivo fue renovado cada 2-3 días. Los estímulos empleados fueron LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) en el caso de IEC18 e IL-1 $\beta$  para la estimulación de la línea celular Caco-2. El tiempo de estímulo fue diferente en función de la determinación a realizar. Así, en el caso de la expresión de las quimioquinas MCP1 (CCL2) y GRO- $\alpha$  (CXCL1), así como la enzima COX2, la exposición al estímulo fue de 24 horas; mientras que en el estudio de las vías de transcripción, estuvo comprendido entre 15 y 30 minutos.

##### **4.3. Cultivos primarios de células mononucleares**

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos que fueron dispuestos en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1%: penicilina [100 U/ml], estreptomicina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5  $\mu\text{g/ml}$ ]). Una vez que se eliminó la grasa adherida a dichos órganos, éstos fueron presionados mecánicamente con ayuda de unas pinzas para la obtención de una suspensión celular. La lisis de los eritrocitos fue realizada

durante 30 minutos a 4°C mediante la acción de un tampón de lisis (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, pH=7.3). Las células mononucleares aisladas se dispusieron en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1%: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]) y 0.05 mM de β-mercaptoetanol.

A continuación, en el caso de células mononucleares procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos, se procedió al conteo celular mediante el empleo de una solución de azul tripán al 0.4% (P.V<sup>-1</sup>). Tras el conteo celular, 0.5 millones de células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad celular de 1 millón de células/ml (determinación de citoquinas); o 15 millones de células en placas de 6 pocillos y una densidad celular de 5 millones de células/ml (expresión proteica o extracción de RNA). El cultivo se realizó durante 24 o 48 horas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 %) y a 37°C, para la determinación de citoquinas y la expresión proteica y génica, respectivamente. La estimulación de las células obtenidas se realizó mediante la adición al cultivo de la lectina concanavalina A (5 µg/ml) o LPS (1 µg/ml). Las muestras obtenidas en los diversos experimentos, tanto sobrenadantes como contenido proteico, fueron mantenidas a -80°C hasta su posterior utilización. En el caso de esplenocitos, una vez obtenida la suspensión de células a separar esta suspensión ha de ser filtrada utilizando un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350), para obtener así una suspensión monocelular. A continuación se llevó a cabo un enriquecimiento de linfocitos T CD4+ sobre dichas células por selección positiva mediante el marcaje de células CD4+ con el anticuerpo específico para CD4 (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania). Tras el marcaje, se procedió a pasar la muestra por la columna magnética LD (tipo de columna con una capacidad de hasta 500 millones de células totales); la población enriquecida en linfocitos T queda retenida en la columna de donde finalmente se procede a su obtención mediante la ayuda de un émbolo. Una vez obtenida la población enriquecida en linfocitos CD4+ se procedió a su procesamiento para Western Blot o RT-PCR y finalmente a su mantenimiento a -80°C hasta su posterior utilización.

#### **4.4. Purificación celular magnética**

Para la obtención poblaciones purificadas de linfocitos T y macrófagos, se empleó el sistema de separación magnética en columnas (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania). Una vez obtenida la suspensión de células a separar siguiendo el procedimiento habitual (esplenocitos en este caso), esta suspensión ha de ser filtrada utilizando un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350), para obtener así una suspensión monocelular con la que poder proceder a la separación. A continuación se llevó a cabo una selección negativa sobre dichas células utilizando anticuerpos adecuados y posteriormente bolitas magnéticas marcadas correctamente para su unión a los anticuerpos utilizados en el paso anterior. En el caso de los linfocitos T, se utilizaron dos anticuerpos biotinilados, anti-CD11b (1:200) y anti-CD161.a (1:200), y un anticuerpo marcado con ficoeritrina (PE), el anti-CD45RA (1:200); mientras que en el caso de los macrófagos, el anticuerpo anti-CD11b fue sustituido por anti-CD3 biotinilado (1:150). Dos tipos de bolitas magnéticas fueron empleadas, unas marcadas con estreptavidina y otras con anti-PE. Tras el marcaje, se procedió a pasar la muestra por la columna magnética LD (tipo de columna con una capacidad de hasta 500 millones de células totales y diseñadas para la selección negativa); la población enriquecida en

linfocitos T o macrófagos, según el caso, atraviesa la columna y se obtiene a modo de eluyente. La pureza de la población obtenida fue comprobada mediante citometría de flujo utilizando un FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EEUU). Se realizó un triple marcaje con anticuerpos marcados con FITC (anti-CD3), PE (anti-CD8) y APC (anti-CD4), con una dilución 1:200 en todos los casos. Los linfocitos T fueron estimulados durante 48 horas con concanavalina A (5 µg/ml); mientras que para la estimulación de macrófagos se empleó LPS (1 µg/ml) durante 24 horas. Tras el cultivo, los sobrenadantes obtenidos por centrifugación fueron mantenidos a -80°C hasta su posterior utilización para la determinación de diversos parámetros.

#### **4.5. Cocultivo en Transwell® de enterocitos-linfocitos T**

Se llevaron a cabo cocultivos de IEC-18 (enterocitos) y linfocitos T purificados a partir de esplenocitos de rata, en Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York EEUU, Ref 3412). En estos experimentos se utilizaron placas de 6 pocillos que incluían soportes con policarbonato como material permeable, con un tamaño de poro de 0.4 µm y un diámetro de 24 mm. Para ello, los enterocitos se dispusieron en el compartimento superior, es decir, sobre el material permeable del soporte, hasta que se alcanzó la confluencia. En ese momento, los linfocitos T se colocaron en el compartimento inferior del Transwell™, es decir, sobre la propia placa de cultivo. El cocultivo se mantuvo durante 72 horas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 %) y a 37°C. Los linfocitos fueron estimulados con concanavalina A (5 µg/ml), la cual fue añadida en el compartimento inferior. En cambio, todos los tratamientos fueron añadidos en el compartimento superior, es decir, en contacto únicamente con los enterocitos. El sobrenadante obtenido en el compartimento inferior se congeló a -80°C hasta la determinación de citoquinas contenidas en el mediante ELISA.

#### **4.6. Ensayo de diferenciación de linfocitos hacia Th1**

El ensayo en cuestión se realizó en placas de 24 pocillos y se emplearon linfocitos T purificados (ver punto 4.4.). El cultivo consistió en 0.5 millones por pocillo con una densidad celular de 1 millón ml<sup>-1</sup>. La polarización hacia el subtipo Th1 se llevó a cabo mediante la adición al cultivo de IL-12 de rata (10 ng/ml), 24 horas antes del estímulo de las células con concanavalina A. El pretratamiento de una hora con los flavonoides se realizó antes del tratamiento con IL-12. Así, 24 horas después de añadir la citoquina en cuestión, las células fueron estimuladas con concanavalina A (5 µg/ml) y se incubaron durante 48 horas más. Los sobrenadantes obtenidos fueron mantenidos a -80°C hasta su posterior utilización en la determinación de la secreción de IFN-γ e IL-2.

#### **4.7. Silenciamiento de la expresión de genes mediante partículas lentivirales**

El silenciamiento de la expresión de genes (*knock-down*) en la línea celular de enterocitos IEC18 se realizó mediante la transfección de partículas lentivirales las cuales contienen horquillas denominadas shRNA (*short hairpin* RNA) que expresan siRNA funcionales (RNA de interferencia) tras su procesamiento mediante la enzima Dicer. El silenciamiento en cuestión se realizó siguiendo el protocolo establecido por Santa Cruz Biotechnology, Inc®. Las células diana fueron sembradas en placas de 12 pocillos con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina (2mM),

antibióticos (1%: penicilina [100 U/ml], estreptomicina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]), 24 horas antes de la transfección. Al día siguiente, cuando las células alcanzaron el 50% de confluencia, se pusieron en contacto con el Polybrene® (sc-134220) a una concentración final de 5µg/ml. Este Polybrene® es un polícatión capaz de neutralizar las interacciones por cargas producidas entre la cápsida viral y la membrana celular, incrementando la unión entre ambas. A continuación las células fueron infectadas con las partículas lentivirales shRNA control (sc-108080), shRNA MyD88 (sc-106986-V) y shRNA TLR4 (sc-156001-V), en cada caso. La eficiencia de la transfección fue comprobada utilizando partículas lentivirales copGFP (sc-108084). Tras 24 horas de la transfección las células fueron lavadas con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1%: penicilina [100 U/ml], estreptomicina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]) sin Polybrene® e incubadas de nuevo 24 horas. Para seleccionar clones estables en la expresión del shRNA, las células fueron divididas 1:3-1:5 e incubadas durante 24-48 horas más. A continuación la selección de clones estables para la expresión de shRNA fue realizada mediante selección con puromicina dihidroclorídrica (sc-108071) en un rango de concentración entre 2 y 10 µg/ml añadida al medio de cultivo. Éste fue reemplazado cada 3-4 días con puromicina añadida de forma extemporánea, hasta que las colonias resistentes fueron identificadas. Una vez seleccionadas, las colonias fueron expandidas y se comprobó la expresión estable de shRNA mediante RT-PCR y western blot.

#### **4.8. Medición de la resistencia transepitelial (TEER)**

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER), es un indicador de la confluencia celular y de la integridad de la monocapa, así como de la formación de uniones estrechas entre las células; también se emplea para controlar si las células se encuentran polarizadas midiendo la resistencia entre el compartimento apical y basolateral de los pocillos bicamerales, ya que ésta aumenta cuando el cultivo en monocapa se encuentra polarizado (668). Su valor se determinó con un micropímetro (EVOM2 Epithelial Voltohmmeter, World Precision Instruments), que mide el potencial de membrana y la resistencia de las células epiteliales en cultivo. Las células empleadas en los ensayos, la línea celular IEC18, se sembraron en los filtros de policarbonato usando DMEM en los volúmenes recomendados por Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York EEUU). El medio de cultivo se renovó a partir del cuarto día postsiembra a fin de garantizar la adherencia de las células a la membrana, posteriormente se renovó cada dos días. La resistencia eléctrica transepitelial se midió previamente a la renovación del medio comenzándose a determinar el día 4 postsiembra. La TEER se calculó multiplicando el valor obtenido por el micropímetro por el área de la monocapa celular, a este valor se le resta el valor del blanco obtenido de la medida de la TEER en las membranas sin células. Las unidades en que se expresa el valor obtenido es en  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

#### **4.9. Inmunoensayo mediante técnica Multiplex®**

Este inmunoensayo se realizó para examinar posibles modificaciones en la secreción de determinadas moléculas en el cocultivo de IEC-18 (enterocitos) y linfocitos T purificados a partir de esplenocitos de rata, en Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York EEUU, Ref 3412). El análisis fue realizado por Procarta Immunoassays, Affymetrix®, mediante la tecnología xMAC® (mutli-analyte profiling beads) permitiendo la cuantificación de múltiples

dianas simultáneamente. Tras el cultivo con los diferentes tratamientos, el sobrenadante obtenido de la zona basolateral del Transwell™ fue centrifugado a 10.000 rpm para eliminar los restos celulares, y conservado a -80° C hasta su envío para la realización del inmunoensayo. De esta manera seleccionamos las siguientes dianas para analizar: GRO- $\alpha$ , ICAM-1/CD54, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IP-10/CXCL10, MCP-3/CCL7, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-2/GRO- $\beta$ /CXCL2 y RANTES/CCL5.

#### **4.10. Análisis de flavonoides por HPLC-MS**

La presencia de diferentes flavonoides en la cara basolateral del cocultivo de IEC-18 (enterocitos) y linfocitos T purificados a partir de esplenocitos de rata, en Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York EEUU, Ref 3412), fue determinada mediante HPLC-MS. Tras el cultivo con los diferentes tratamientos, el sobrenadante obtenido de la zona basolateral del Transwell™ fue centrifugado a 10.000 rpm para eliminar los restos celulares, y conservado a -80° C hasta su envío para la realización del análisis.

### **5. PERMEABILIDAD EPITELIAL CON FITC-DEXTRANO**

#### **5.1. Ensayo de permeabilidad epitelial en colon distal de ratón**

El ensayo de permeabilidad *in vivo* se realizó tomando una pieza de aproximadamente 0.5cm de colon distal de ratón que se sumergió en solución Ringer fría ((en mM): 115 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 2.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 10 glucosa). Se hicieron montajes de tejido intacto sobre cámaras de Ussing con dispositivos de voltaje DVC-1000 (Word Precision Instruments, Aston, United Kingdom). Tras 10-15 minutos del montaje del tejido se consiguió una estabilización en los valores de I<sub>sc</sub> (I<sub>0</sub>) y conductancia (G<sub>0</sub>), tras lo cual se añadió FITC dextrano (MW 4000) al reservorio de la cara mucosal del tejido a una concentración de 0.1mg/ml. A continuación se añadió el agonista colinérgico carbacol (300 $\mu$ M) y se recogió la respuesta de I<sub>sc</sub> del tejido colónico. Tras la medida de la intensidad de la fluorescencia (excitación 490 nm; emisión, 520 nm; FLUOstar-Control, Polarstar OPTIMA, BMG Labtech), la permeabilidad al FITC-dextrano se calculó como el porcentaje de FITC-dextrano presente en la cara basolateral de la cámara, tras 20 minutos.

#### **5.2. Ensayo de permeabilidad epitelial *in vitro***

El daño epitelial *in vitro* puede cuantificarse mediante la permeabilidad a FITC-dextrano. Así sembramos las células epiteliales empleadas en los ensayos anteriores, la línea celular IEC18, sobre filtros de policarbonato usando DMEM en los volúmenes recomendados por Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York EEUU). El medio de cultivo se renovó a partir del cuarto día postsiembra a fin de garantizar la adherencia de las células a la membrana, posteriormente se renovó cada dos días. Tras comprobar la confluencia de las células mediante la medición de la resistencia transepitelial (TEER), se procedió al cultivo con los diferentes tratamientos. A las 2 horas de contacto, se añadió sulfato de dextrano sódico (DSS) estéril, tanto al 2 como al 4%, por la cara apical. Tras 48 horas de contacto con DSS, se retira el medio y se hacen dos lavados con medio Hanks' Balanced Salt solution. A continuación se añade FITC-dextrano a 1mg/ml

apicalmente en medio DMEM sin rojo fenol a tiempo 0 y fuimos retirando 50µl de la cara basolateral en intervalos desde 0-360 minutos cada 30 minutos. Finalmente medimos la intensidad de la fluorescencia de cada muestra (excitación 490 nm; emisión, 520 nm; FLUOstar-Control, Polarstar OPTIMA, BMG Labtech). El flujo paracelular fue calculado como el cambio relativo comparado con la señal del grupo control.

## **6. TOXICIDAD Y VIABILIDAD CELULAR**

### **6.1. Ensayo de proliferación por incorporación de timidina tritiada**

Las células mononucleares fueron dispuestas en placas de 24 pocillos o en Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York EEUU) con una densidad celular de 1 millón de células por ml y un total de 0.5ml o 2.6ml, respectivamente. Junto con los diferentes tratamientos y la Concanavalina A, las células fueron expuestas a [<sup>3</sup>H]-thimidina (1 µCi mL<sup>-1</sup>; GE Healthcare, España) durante 48 h. Tras dicho periodo de incubación, las células fueron recolectadas y sometidas a varios lavados con una solución de ácido tricloroacético al 10% (V.V<sup>-1</sup>). Seguidamente, se realizó la lisis celular mediante una solución 0.3 N de NaOH que contiene SDS al 1% (V.V<sup>-1</sup>) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras obtenidas fueron dispuestas en viales adecuados a los que se les añadió 3 ml de líquido de centelleo (Beckman Coulter, Madrid, España). La radioactividad contenida en el vial y debida a la incorporación de la timidina tritiada en las células fue cuantificada mediante un analizador de centelleo líquido Tri-Carb (Packard Instrument, Meriden, CT). Los resultados se expresan como desintegraciones por minuto (dpm).

### **6.2. Ensayo de proliferación por WST1**

La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. Sembramos las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> células/pocillo en 100µl de medio de cultivo con o sin el flavonoide a ensayar. Se incubaron las células a 37°C durante 24 horas, tras las cuales se añadieron 10 µl del reactivo WST-1 a cada pocillo. Se agita durante 1 minuto y se incuba de nuevo la placa durante 2 horas a 37°C. Antes de leer la placa se vuelve a agitar durante 1 minuto para asegurar la homogenización del color. Medimos la absorbancia a 450nm.

### **6.3. Ensayo de citotoxicidad por fluorescencia con yoduro de propidio**

La citotoxicidad de los tratamientos fue determinada mediante un ensayo de viabilidad con yoduro de propidio. Este marcador de células muertas, es capaz de atravesar membranas

celulares comprometidas y unirse de forma estequiométrica a la doble hebra de DNA o RNA. Tras marcar las células mononucleares con anticuerpos de membrana, éstas se lavaron dos veces con tampón de marcaje para citometría de flujo (PBS1X, BSA 2%, EDTA 10mM, Azida 0.1%) y finalmente fueron resuspendidas en este mismo tampón al que se añadió 5µl de yoduro de propidio por cada 100µl de células. Se incubó durante 5-15 minutos a 4°C o a temperatura ambiente si el análisis citométrico fue realizado a continuación. Es importante destacar que el yoduro de propidio deber permanecer en el tampón de marcaje durante el análisis citométrico ya que las uniones del marcador a la doble hebra de ácido nucleico es no covalente y por tanto débil (669).

## **7. TÉCNICAS GENERALES**

### **7.1. Determinación de la secreción de citoquinas**

Tras el cultivo de los distintos tipos celulares, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 10.000 rpm para eliminar los restos celulares, y conservado a -80° C hasta su utilización. Diversos kit comerciales fueron empleados para la medida de los niveles de las concentraciones de citoquinas en dichos sobrenadantes mediante la técnica de enzoinmuno ensayo o ELISA. Para ello, se llevó a cabo un protocolo de medida basado en las indicaciones del fabricante del kit en cada caso. Los kit empleados fueron suministrados por Biosource® Europe, Nivelles, Bélgica (IL-2 de rata e IL-8 humana), BD Biosciences®, Erembodegem, Bélgica (IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MCP-1 de rata), R&D Systems®, Abingdon UK (GRO $\alpha$  de rata) y Active Motif Europe®, Rixensart, Bélgica (NF-kB Family kit) . Los resultados se expresan como pg/ml.

### **7.2. Extracción y cuantificación del contenido protéico**

Las proteínas colónicas fueron obtenidas tras la homogenización mecánica en tampón de lisis frío, el cual contiene Igepal CA-630 al 1%, HEPES-Na 20 mM pH 7.5, EGTA 10 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, ortovanadato sódico 2mM, y una mezcla de inhibidores de proteasas añadida de forma extemporánea (fenilmetilsulfonil fluoruro, aprotinina, pepstatina A y fenantrolina) junto con inhibidor de fosfatasas, el orto-vanadato sódico. En el caso de las muestras procedentes de cultivos celulares, utilizando el mismo tampón descrito, éstas fueron sometidas a ultrasonidos para la lisis celular. El homogenado resultante en ambos casos, se sometió a una centrifugación a 10.000 rpm para la eliminación de los restos de membranas celulares. El sobrenadante obtenido contiene las proteínas celulares y fue conservado a -80° C hasta su utilización para el estudio de expresión proteica. El contenido proteico total fue medido mediante el método del ácido bicinchonínico (670), para lo que se empleó albúmina sérica bovina como estándar.

### **7.3. Western Blot**

Las muestras obtenidas mediante el procedimiento anterior fueron calentadas a 95° C durante 5 minutos junto con el tampón de carga, cuya composición es SDS 312 mM, glicerol

50% (V.V<sup>-1</sup>), 2-mercaptoetanol 1% (V.V<sup>-1</sup>), EDTA sal trisódica 22.5 mM, Tris 220 mM y trazas de azul de bromofenol (pH=6.8). Tras la separación de las proteínas mediante la electroforesis en gel de acrilamida, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF (según el anticuerpo primario empleado). Las membranas fueron bloqueadas durante 1.5 horas a temperatura ambiente, utilizando para ello leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T. Un control de carga rutinario se realizó mediante la exposición de la membrana a una solución de ácido acético al 1% (V.V<sup>-1</sup>) que contiene Rojo Ponceau al 0.5% (P.V<sup>-1</sup>). A continuación, se realizó la exposición al anticuerpo primario específico durante toda la noche a 4° C. Las diluciones empleadas de los distintos anticuerpos son:  $\alpha$ -Actina (1:500); COX2 (1:3000); STAT4 (1:2000); fosfo-ERK (1:2500); fosfo-JNK (1:2000); fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$  (1:2500); fosfo-p38 (1:1000); Foxp3 (1:1000); fosfo-STAT4 (1:1000); todos ellos fueron diluidos en TBS-T con albúmina sérica bovina al 5% (m.V<sup>-1</sup>). Como control de carga, todas las membranas fueron expuestas a un anticuerpo frente  $\alpha$ -Actina; dicho anticuerpo fue obtenido a través del Prof. Jim Jung-Ching Lin del Departamento de Ciencias biológicas de la Universidad de Iowa. El anticuerpo secundario de la especie apropiada según el anticuerpo específico empleado, estaba conjugado a peroxidasa, de modo que las bandas fueron detectadas usando un reactivo para el aumento de la quimioluminiscencia (Perkin Elmer, Life Sciences, Boston, MA, EEUU). La cuantificación de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el programa Image J. Para la detección de fosfo-STAT4, fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$ , fosfo-p38, fosfo-ERK y fosfo-JNK, las proteínas nucleares fueron extraídas mediante el kit de Extracción Nuclear (Active Motif Europe®, Rixensart, Bélgica), siguiendo las instrucciones del kit.

#### **7.4. Extracción de RNA y reacción de retrotranscripción**

El RNA total de las distintas muestras fue obtenido usando Trizol Reagent® (Invitrogen), siguiendo para ello las recomendaciones del fabricante. Tras el análisis de la integridad del RNA aislado mediante electroforesis en gel de agarosa (1% P.V<sup>-1</sup>), la cuantificación del contenido de RNA de las distintas muestras se llevó a cabo a través de un Nanodrop®, el cual también determina la absorbancia a 260 y 280 nm. Una cantidad total de 1  $\mu$ g de RNA por muestra fue retrotranscrito para la obtención del DNA complementario, mediante el empleo de la enzima transcriptasa inversa, según las indicaciones del fabricante (iScript Select cDNA Synthesis Kit, Biorad Laboratories®, California, EEUU). El DNA complementario se mantuvo congelado a -20°C hasta su uso, mientras que el RNA se conservó a -80°C.

#### **7.5. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real**

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando Syber Green como fluoróforo (iQ™ SYBR® Green Supermix, Biorad Laboratories, California, EEUU) para el análisis de la expresión de diversos genes. En algunos casos se empleó ROX como fluoróforo de referencia (iTaQ™ SYBR® Green Supermix with ROX sample, Biorad Laboratories, California, EEUU). El gen de referencia elegido fue la subunidad 18 S del RNA ribosómico y su expresión fue empleada como control de carga en los distintos experimentos. Las siguientes secuencias (5'-3') o primers fueron empleadas: AAT GAC CGT TTC TTT GAG GCT G/CGA GAT GCT GCT GTG AGA TTT (IL-1 $\beta$ ); TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG/ CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA (TNF- $\alpha$ ); CTG CTT GGC AGT GCT TGA GAA/CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT (Foxp3; forkhead box P3); AGT CAG



CCA GAC CCA CAT G/TGC TCC ACT GCC TTG CTT TT (IL-10); TGG ACT CTG AGC CGC AAT GAG G/GAC GCA TGG CGG ACA ACA GAG G (IL-17); GCA CAC TAG CCT GGA GGA GTG CA/AGA TGT CCG AGT CCA GCA GG (IL-23); GCT CTG GTC TTC TGG AGT TCC G/TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC (IL-6); ACT GGC GAG CCT TAG TTT G/CGT GGC TTC TAG TGC TGA CG (TGF $\beta$ ); CCA TTG GAG GGC AAG TCT GGT G/CGC CGG TCC AAG AAT TTC ACC (18S; 18S ribosomal RNA); TTC ATT GAC AGC TTT GTG CTG G/ AAC AGT AAA GCA AAA AAG GAT GCA TT (IFN $\gamma$ ); 5'- CAG AGG TGG ATG GGA GTG GAG-3', 5'-CAC AGT GAT TGC CTG AGG AAG AG- 3' (REG3 $\gamma$ ; regenerating islet-derived 3  $\gamma$ ); 5'-CCG AAG TCA TAG CCA CAC TCA AG-3', 5'-GCC TTG GCT GAG TGG TAG AGT C-3' (MMP3; matrix metalloproteinase-3); 5'-GCT CTG AGA CAA TGA ACG CTA CAC-3', 5'-TTC TTC CAC ATC TAT GCC ACT TGA G-3' (GRO $\alpha$  o CXCL1); 5'- GCC CTC TAC AAG AAT GAC TTC AAG-3', 5'-ATC ACC ATC GCA AGG AAC TCC-3' (S100A8; S100 calcium binding protein A8).

## 7.6. Citometría de flujo

Para el análisis de la expresión de determinados marcadores celulares se utilizó el citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EEUU). Las células fueron marcadas y preparadas para su análisis de la siguiente manera. Tras su obtención, fueron lavadas con tampón de marcaje para citometría de flujo (PBS1X, BSA 2%, EDTA 10mM, Azida 0.1%). Seguidamente se les realizó el marcaje de moléculas superficiales mediante anticuerpos específicos, todos ellos suministrados por BD Biosciences®, California EEUU y con una dilución 1:200 en todos los casos. Tras un mínimo de 15 minutos a 4°C de exposición a anticuerpos superficiales, las células fueron de nuevo lavadas y seguidamente permeabilizadas para el marcaje de moléculas intracelulares (BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™). Los anticuerpos para el marcaje intracelular fueron también suministrados por BD Biosciences®, California EEUU y utilizados a una dilución 1:200 en todos los casos. Finalmente las células fueron fijadas en paraformaldehído al 2% hasta su análisis.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para determinar la significancia estadística, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un test de significancia *a posteriori* (Fisher LSD). La significancia estadística se consideró para un valor de  $P < 0,05$ . El análisis estadístico descrito se realizó mediante la plataforma informática SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

# RESULTADOS

Una característica importante en relación al uso de quercetina por vía oral es que resulta esencialmente inactiva en modelos *in vivo* de colitis (12, 13, 671). Por el contrario, los glucósidos de la quercetina, rutina y quercitrina, han demostrado ser eficaces (13, 182, 672). El uso de la rutina en modelos de EII se ha relacionado con una menor infiltración leucocitaria, con protección antioxidativa y con una mejora macroscópica/microscópica generalizada del tejido intestinal (2).

La hipótesis comúnmente aceptada es que estos glucósidos son hidrolizados por enzimas bacterianas en el colon, liberándose así quercetina *in vivo* (15). Así, la rutina (y la quercitrina) actuaría como profármaco, previniendo la absorción prematura de la quercetina en el intestino delgado pero permitiendo su liberación en el colon, donde ejercería su efecto antiinflamatorio.

De acuerdo con esta hipótesis, la quercetina debería ser terapéuticamente activa intrarrectalmente, y de hecho así se ha descrito anteriormente (15). También se infiere de esta hipótesis que la quercetina debería ser efectiva en ileítis, mientras que la rutina debería tener un efecto terapéutico menor o incluso nulo, dependiendo de la fracción de quercetina liberada a este nivel.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en esta Tesis Doctoral se propone un estudio *in vivo* con el fin de dilucidar aspectos mecanísticos de la acción antiinflamatoria intestinal de la rutina y quercetina considerando la influencia del lugar inflamado (ileítis frente a colitis), de la vía de administración (oral frente a intraperitoneal) y las cinéticas de ambos flavonoides en el tejido intestinal. Aceptando que la rutina actúa como profármaco liberando quercetina a nivel del lumen intestinal, se esperaría una posible acción de la genina sobre enterocitos o 82células subyacentes. Para dilucidar este tema se ha estudiado el mecanismo de acción a nivel molecular y celular en diversas poblaciones celulares, tanto cultivos primarios como líneas celulares, concretamente células epiteliales intestinales (IEC18) y linfocitos T, estableciéndose también una relación estructura-actividad.

## **1. ESTUDIOS *IN VIVO***

Se llevaron a cabo tres grandes estudios *in vivo*. En el primero de ellos analizamos la relación entre la vía de administración y la eficacia antiinflamatoria colónica de la rutina y su fracción activa, quercetina, así como su efecto sobre la ileítis, con especial énfasis en la influencia de factores farmacocinéticos. Utilizamos para ello el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) en ratas, siguiendo un protocolo de pretratamiento, manteniendo una cierta continuidad procedimental con experimentos anteriores de nuestro grupo. En segundo lugar, verificamos la eficacia terapéutica de la rutina en el modelo de colitis crónica por transferencia linfocitaria, con el objeto de validar la actividad antiinflamatoria intestinal del flavonoide en un modelo dependiente de linfocitos y de naturaleza estrictamente crónica. Finalmente, con el fin de realizar un estudio en profundidad del mecanismo de acción realizamos un análisis del transcriptoma colónico en el modelo de colitis por TNBS, comparando la modificación ocasionada por el tratamiento con rutina en animales colíticos con la que se produce en tales animales colíticos sin tratamiento

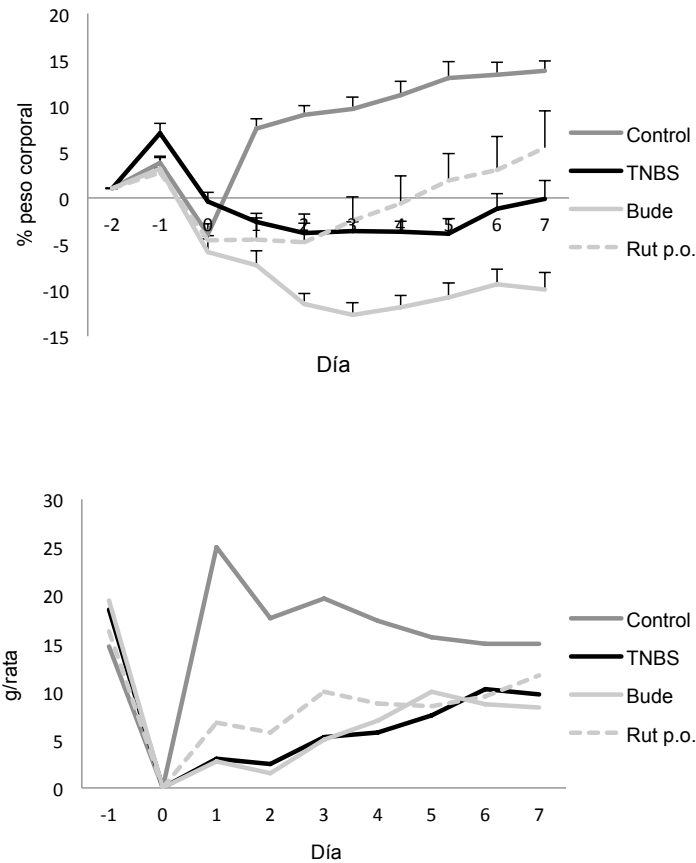
alguno. El procesamiento, aunque iniciado sigue en análisis con lo que solamente discutiremos las sugerencias que nos hemos encontrado hasta el momento.

### 1.1. Efecto de la vía de administración en la actividad antiinflamatoria colónica de rutina y quercetina

En un primer experimento verificamos el efecto de la rutina administrada por vía oral (gastroesofágica). Se trata de un experimento confirmatorio (13) que sirve de referencia a los demás experimentos in vivo llevados a cabo en este modelo y que se presentarán más adelante. La colitis inducida por TNBS/etanol en ratas tiene los efectos esperados. De forma general, los animales presentan diarrea y una marcada pérdida de peso corporal con anorexia que comienza a estabilizarse tras 3-4 días (Tabla 7 y Fig. 1A). Los segmentos colónicos exhiben adhesiones a los órganos adyacentes, así como fibrosis, deformación, hiperemia y una extensa necrosis. Como resultado, el grupo TNBS presenta un aumento significativo en la relación peso/longitud, la longitud del daño y el índice de daño macroscópico (Tabla 7). El tratamiento de los animales colíticos con rutina administrada por vía oral (p.o.) a la dosis de 20 mg/Kg da lugar a una menor pérdida de peso que en el grupo colítico no tratado (grupo TNBS), de forma que comienza a apreciarse una estabilización del peso a partir del día 3 de tratamiento, y un aumento en los días consecutivos. Aunque no se llega a alcanzar una mejoría significativa del peso corporal con respecto al grupo TNBS, sí existe una tendencia en este sentido ( $P=0,113$  Rut p.o frente a TNBS en el día 7) (Fig. 1A). Esta mejora en el estado de los animales se traduce en un mayor consumo de comida, evidenciado desde el día 1 de tratamiento, comparado con el grupo TNBS, aunque igualándose hacia el final del tratamiento por la mejora del grupo TNBS característica del modelo (Fig. 1B). A nivel colónico, el examen macroscópico corrobora el efecto beneficioso de la rutina p.o., con un menor daño colónico, tanto en lo que se refiere al engrosamiento (valorado mediante el cálculo de la relación peso/longitud del colon), como en la longitud del daño colónico o en el índice de daño macroscópico (Tabla 7).

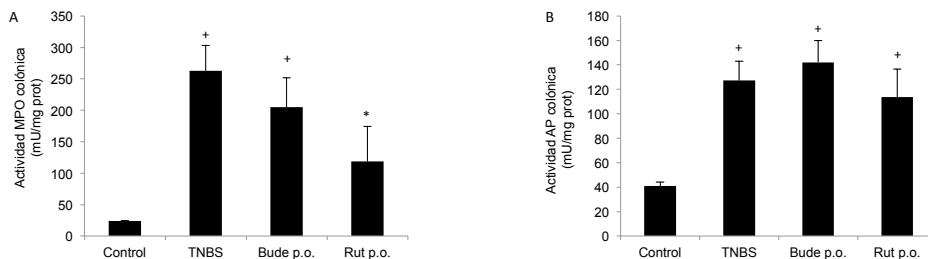
Grupos	% peso corporal	Índice de daño macroscópico (UA)	Relación peso/long (mg/cm)	Longitud de daño (cm)
Control	13.8±1.1	–	74.1±4.6	–
TNBS	-0.1±2.0 <sup>+</sup>	11.7±0.8 <sup>+</sup>	294.0±41.6 <sup>+</sup>	3.4±0.5 <sup>+</sup>
Bude p.o.	-10.0±1.9 <sup>+ *</sup>	10.3±0.8 <sup>+</sup>	195.0±12.1 <sup>+ *</sup>	2.9±0.3 <sup>+ *</sup>
Rut p.o.	5.4±4.0 <sup>+</sup>	7.0±2.1 <sup>+ *</sup>	186.0±37.3 <sup>+ *</sup>	1.8±0.6 <sup>+ *</sup>

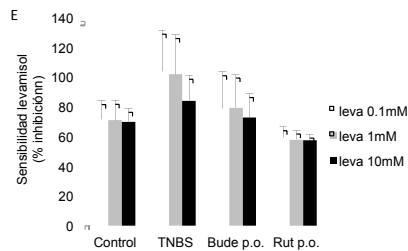
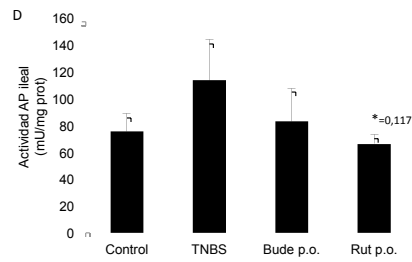
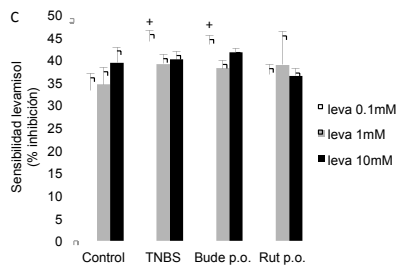
**Tabla 7:** Efecto de la rutina p.o. sobre evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de TNBS en rata. Datos expresados como media ± SEM (n=4-8). +p<0.05 frente a grupo control; \*p<0.05 frente a grupo TNBS.



**Figura 1:** Evolución de los animales en el modelo de colitis por TNBS. (A) Peso corporal, % del peso inicial. (B) Consumo de comida, gramos de comida consumidos por animal al día. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

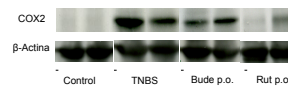
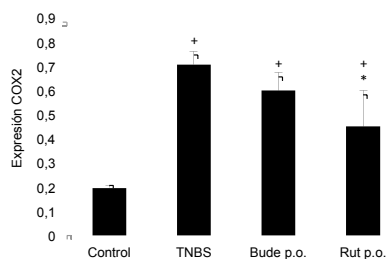
Las determinaciones bioquímicas realizadas en el tejido colónico muestran un incremento en las actividades mieloperoxidasa (MPO) y fosfatasa alcalina (AP), además de un aumento de la sensibilidad al levamisol de ésta, en los animales con colitis inducida por TNBS (Fig. 2A-C). El tratamiento con rutina p.o. se asocia a una inhibición significativa de la actividad MPO colónica respecto al grupo TNBS, lo que indica una menor infiltración neutrofílica (Fig. 2A). Sin embargo la actividad AP en el colon no es significativamente inhibida por la rutina p.o., aunque por otra parte la sensibilidad de la AP al levamisol in vitro (parámetro relacionado con un cambio de isoforma de la enzima) es comparable a la del grupo no inflamado (Figs.2B-C). Esta tendencia también es observada en el íleon ( $P=0,117$  Rut p.o. frente a TNBS) (Fig. 2D-E).





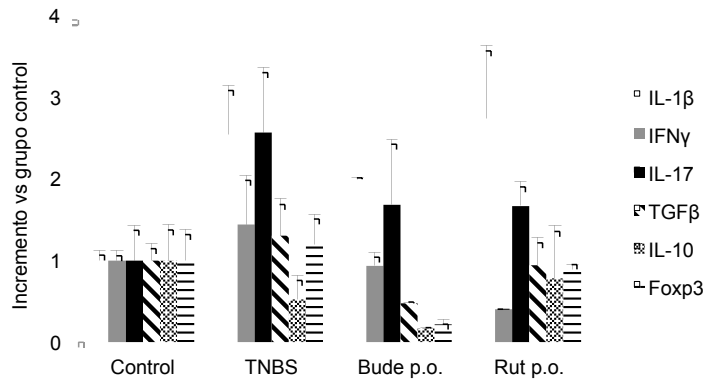
**Figura 2:** Actividades enzimáticas en el tejido colónico e ileal (A) MPO (mU/mg prot), (B) AP (mU/mg prot), (C) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP), (D) AP (mU/mg prot), (E) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; +  $P < 0,05$ , frente a Control; \* $< 0,05$ , frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

La expresión proteica de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2) en colon, determinada por Western Blot, aparece 3,6 veces incrementada en el grupo TNBS (Fig. 3), y queda reducida significativamente en los animales tratados con rutina p.o. (reducción del 50% Rut p.o. frente a TNBS) (Fig. 3).



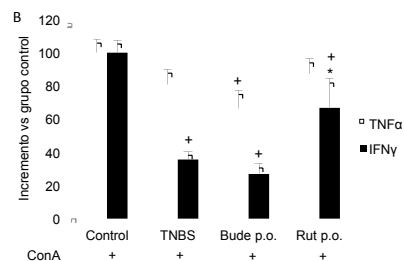
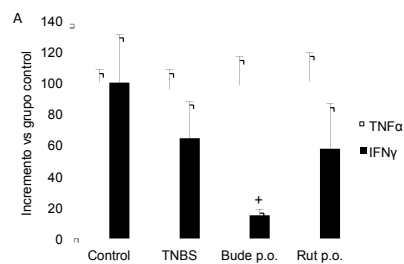
**Figura 3:** Expresión de COX2 en el tejido colónico, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $P < 0,05$ , frente a Control; \* $< 0,05$ , frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

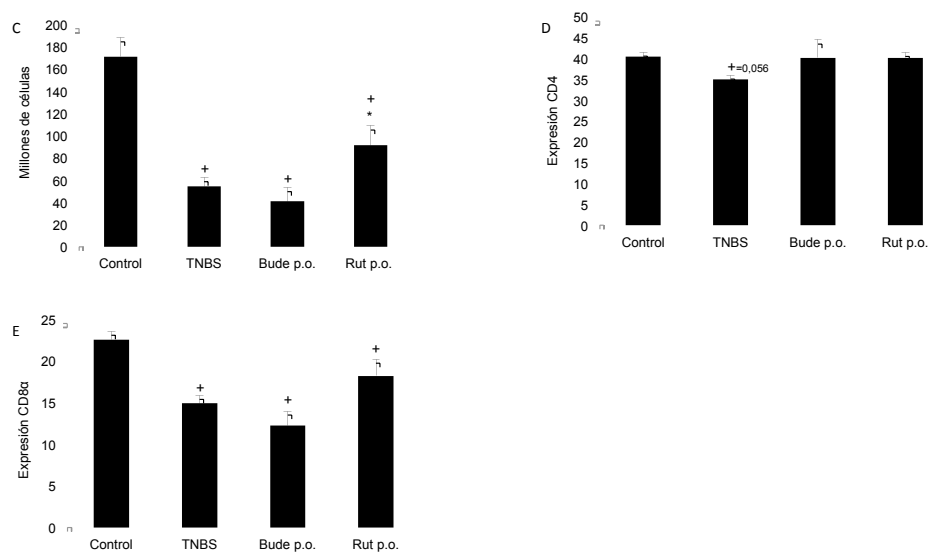
El análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real muestra un aumento generalizado de genes proinflamatorios en el grupo TNBS, así como una disminución de la expresión de IL-10 (Fig. 4). Aunque la variabilidad interindividual impide en este caso la detección de diferencias con carácter significativo, los niveles de IFN $\gamma$ , IL-17, TGF- $\beta$  y Foxp3 son menores en el grupo Rut p.o. con respecto al grupo TNBS (Fig. 4). Cabe destacar que, si bien los valores obtenidos en el grupo de Rutina p.o. no presentan diferencias significativas respecto al grupo TNBS, tampoco resultan ser diferentes de los del grupo no colítico.



**Figura 4:** Expresión génica en el tejido colónico medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

Estudiamos asimismo la secreción *ex vivo* de citoquinas por células mononucleares obtenidas de ganglios linfáticos mesentéricos; para ello, se hicieron dos estudios en paralelo, de forma que estudiamos la secreción espontánea y la de las células estimuladas con la lectina concanavalina A (ConA). Las células obtenidas de los ganglios linfáticos mesentéricos de los grupos control o TNBS tienen una baja secreción espontánea de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ , la cual es marcadamente estimulada en presencia de concanavalina A. La colitis por TNBS da lugar paradójicamente a una menor secreción de IFN $\gamma$ , que resulta significativa respecto al grupo control, así como a una disminución del número total de células obtenidas de ganglios linfáticos mesentéricos (Fig. 5A y 5C). Por el contrario, las células obtenidas de los animales tratados con rutina p.o. muestran una secreción parcialmente normalizada de IFN $\gamma$ , tanto en basal como bajo estimulación con concanavalina A, así como un incremento en el número total de células (Fig.5 A-C). Conviene recordar que el número de células cultivadas es el mismo en cada caso. Por otro lado, en todos los grupos TNBS las células obtenidas de ganglios linfáticos mesentéricos exhiben un menor porcentaje de células CD4+ y CD8+ que en el grupo control, lo que el tratamiento con rutina tiende a restablecer (Fig.5 D-E).





**Figura 5:** Producción ex vivo de citoquinas y expresión de marcadores en células de ganglios linfáticos mesentéricos. (A) a nivel basal, los datos se expresan como incremento frente al grupo control; Control=105.5pg/ml (TNF- $\alpha$ ) y 145.6pg/ml (IFN $\gamma$ ); (B) estimuladas con concanavalina A (5  $\mu$ g/ml), los datos se expresan como incremento frente al grupo control; Control=1766.8pg/ml (TNF- $\alpha$ ) y 54617.7pg/ml (IFN $\gamma$ ); (C) número total de células; (Dy E) expresión de CD4 y CD8 $\alpha$ , detectada por FACs., media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

La budesonida (2 mg/Kg), usada como control positivo para la terapia de la colitis en este experimento, produce un atenuamiento de la respuesta inflamatoria, evidenciada por una disminución en la relación peso/longitud, en la extensión del daño colónico y en la expresión de citoquinas proinflamatorias a nivel de colon (sin significancia estadística), así como por una tendencia a la disminución de la actividad MPO colónica, expresión de COX2, y citoquinas proinflamatorias secretadas por células de los ganglios linfáticos mesentéricos (Tabla 7 y Figs. 2A, 3, 5A y 5B). Sin embargo, el tratamiento con budesonida no llega a mejorar el índice de daño macroscópico, y además da lugar a una disminución significativa del peso corporal comparado con el grupo TNBS, asociada a una ausencia de efecto sobre la anorexia. Por otra parte, es llamativo que el grupo tratado con budesonida presentara una mortalidad del 25%.

Por tanto, nuestros resultados confirman el efecto antiinflamatorio colónico de la rutina a la dosis de 20 mg/Kg, el cual resulta globalmente superior al de budesonida p.o. A continuación llevamos a cabo un segundo experimento en el que ensayamos el efecto sobre el mismo modelo de la quercetina, administrada por vía i.p. a dosis equimolar (11.1 mg/Kg) y siguiendo un protocolo idéntico de pretratamiento. No creímos necesario considerar la administración oral de quercetina porque se ha demostrado sobradamente que ésta carece de efecto (12, 13, 671).

En contraste con el efecto descrito para la rutina p.o, la quercetina i.p. presenta escasos efectos sobre la colitis experimental. En general, el parámetro de daño macroscópico y la evolución de pesos corporal muestran cierta mejoría en el grupo tratado con el flavonoide, siempre sin significancia estadística (Tabla 8).



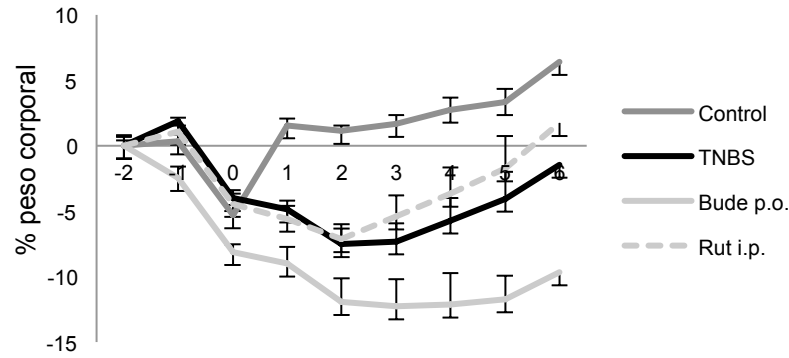
Grupos	% peso corporal	Índice de daño macroscópico (UA)	Relación peso/long (mg/cm)	Longitud del daño (cm)	Actividad MPO colónica (mU/mg prot)	Actividad AP colónica (mU/mg prot)	Sensibilidad levamisol 1mM (% inhibición)
Control	9.6±0.8	–	70.3±4.8	–	39.2±16.2	85.2±11.3	44.3±4.3
TNBS	-2.5±2.9 <sup>+</sup>	10.6±1.5 <sup>+</sup>	154.0±18.1	2.7±0.7 <sup>+</sup>	241.7±67.6 <sup>+</sup>	239.6±131.7	75.6±9.6
Quer i.p.	-1.9±2.2 <sup>+</sup>	8.8±1.9 <sup>+</sup>	148.3±31.7	1.5±0.8 <sup>+</sup>	292.8±116.1 <sup>+</sup>	249.9±114.8	73.1±9.5

**Tabla 8:** Efecto de la quercetina i.p. en la evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de colitis por TNBS en rata. Datos expresados como  $\pm$  SEM (n=4-6). <sup>+</sup>p<0.05 frente a grupo control.

La ausencia total de efecto terapéutico de la quercetina i.p. presenta un conflicto con la hipótesis en virtud de la cual la rutina actúa liberando este flavonoide como fracción activa en la luz del colon, puesto que la administración directa de la molécula, presumiblemente activa por vía parenteral, llega en cantidades sustanciales a la mucosa colónica (ver sección 1.3). En consecuencia, resolvimos estudiar el efecto de la rutina administrada por vía i.p. En este experimento el comportamiento del modelo fue nuevamente el esperado, y los datos son acordes a los obtenidos en los dos anteriores y en general en nuestro laboratorio. El resultado del tratamiento con rutina i.p. muestra un efecto antiinflamatorio significativo, aunque globalmente inferior al obtenido por vía oral. En concreto, se observa una disminución significativa de parámetros macroscópicos como la relación peso/longitud y el índice de daño macroscópico al comparar con el grupo TNBS, así como una mejora de la pérdida de peso corporal asociada a la colitis (Fig. 6 y Tabla 9).

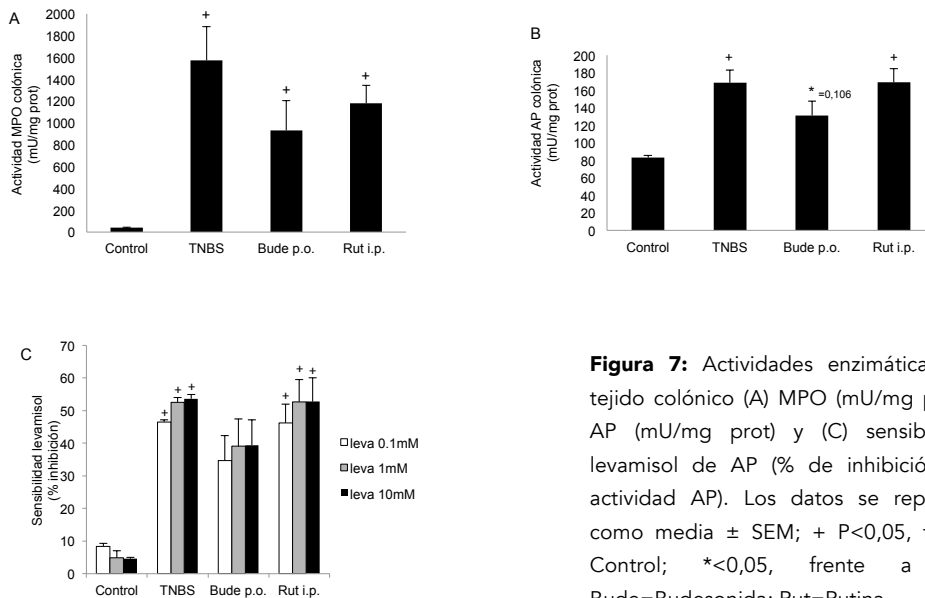
Grupos	% peso corporal	Índice daño macroscópico (UA)	Relación peso/long (mg/cm)	Longitud de daño (cm)
Control	12.4±1.5	–	70.2±3.4	–
TNBS	2.6±1.9 <sup>+</sup>	11.6±1.1 <sup>+</sup>	264.0±31.2 <sup>+</sup>	2.7±0.5 <sup>+</sup>
Bude p.o.	-1.7±1.7 <sup>+</sup>	7.4±1.4 <sup>**</sup>	106.0±19.3 <sup>*</sup>	1.3±0.6 <sup>+</sup>
Rut i.p.	6.4±2.3	8.2±1.0 <sup>**</sup>	194.0±24.9 <sup>**</sup>	2.2±0.5 <sup>+</sup>

**Tabla 9:** Efecto de la rutina i.p. en la evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de colitis por TNBS en rata. Datos expresados como media  $\pm$  SEM (n=4-8). <sup>+</sup>p<0.05 frente a grupo control; <sup>\*</sup>p<0.05 frente a grupo TNBS.



**Figura 6:** Evolución de peso corporal, % del peso inicial. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

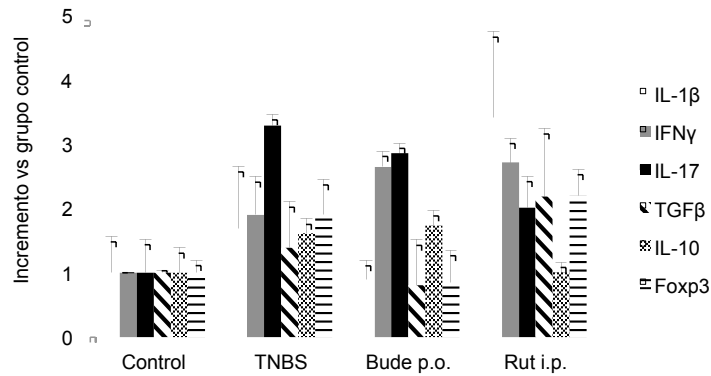
La misma tendencia puede observarse en la longitud del daño (Tabla 9) y en la actividad MPO colónica (Fig. 7A), disminuidas por la rutina i.p. pero sin llegar a la significación estadística. Asimismo, los niveles colónicos de mRNA de IL-17 e IL-10 fueron menores en este grupo que en el grupo TNBS ( $P < 0.05$ , Fig. 8). Por el contrario, no se observan diferencias en la actividad AP colónica entre los grupos TNBS y rutina i.p. (Fig. 7B-C), ni en los niveles de mRNA de TGF- $\beta$  y Foxp3 (Fig. 8), ni a nivel de la secreción ex vivo de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  por células mononucleares obtenidas de ganglios linfáticos mesentéricos, tanto en condiciones basales como bajo estimulación con ConA (que en cualquier caso varía escasamente como consecuencia de la colitis, Fig. 8). Por otra parte, la expresión de IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  fue mayor en ratas tratadas con rutina i.p. que en los controles TNBS ( $P < 0.05$ , Fig. 8).



**Figura 7:** Actividades enzimáticas en el tejido colónico (A) MPO (mU/mg prot), (B) AP (mU/mg prot) y (C) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; +  $P < 0,05$ , frente a. Control; \* $< 0,05$ , frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

En este experimento volvimos a utilizar budesonida 2 mg/Kg como control positivo de tratamiento, administrada por vía oral porque el efecto del corticoide es local y por tanto precisa esta vía (o la intrarrectal). Conforme a lo esperado, la budesonida muestra efectos protectores frente a la colitis ocasionada por el TNBS, evidenciados por la disminución de la relación peso/longitud y del índice de daño macroscópico (Tabla 9), así como por la tendencia

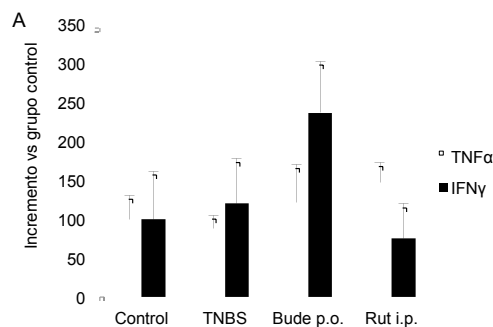
protectora observada en las actividades MPO y AP colónicas (que presentan valores intermedios entre el grupo TNBS y el control, sin ser significativamente distinto de uno ni de otro) (Fig. 7). El tratamiento con budesonida también se asocia a una tendencia a normalizar el incremento de algunos genes proinflamatorios, tales como IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  y Foxp3 (Fig. 8).

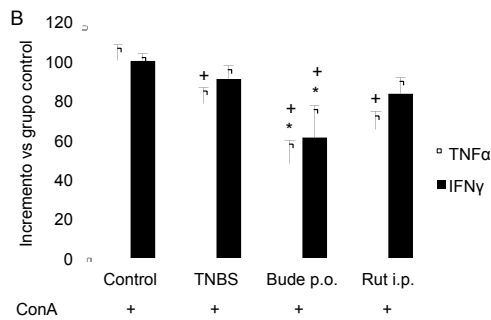


**Figura 8:** Expresión génica en el tejido colónico medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

Asimismo, se aprecia una secreción reducida de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  por células de los ganglios linfáticos mesentéricos, estimuladas con ConA *ex vivo* (Fig. 9). La eficacia antiinflamatoria global de la budesonida oral en este experimento fue por tanto algo superior a la observada en el experimento anterior. Pese a ello, nuevamente se constata un marcado descenso del peso corporal (Tabla 9), así como una mortalidad del 30% (frente a una mortalidad nula en los demás grupos). Estos resultados corroboran observaciones anteriores de nuestro grupo de investigación y están siendo de hecho objeto de estudio paralelo.

En consecuencia, nuestros resultados demuestran que la rutina es eficaz en la colitis experimental inducida por TNBS en ratas a la dosis de 20 mg/Kg administrada tanto por vía oral como intraperitoneal, siendo el efecto más pronunciado en el primer caso. Por el contrario, la dosis i.p. equivalente de quercetina es fundamentalmente inactiva.





**Figura 9:** Producción de citoquinas por parte de células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos. (A) a nivel basal, los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo Control; Control=11.8pg/ml (TNF- $\alpha$ ) y 5.6pg/ml (IFN $\gamma$ ); (B) estimuladas con concanavalina A (5  $\mu$ g/ml), los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo Control; Control=1214.3pg/ml (TNF- $\alpha$ ) y 22935.7pg/ml (IFN $\gamma$ ); media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

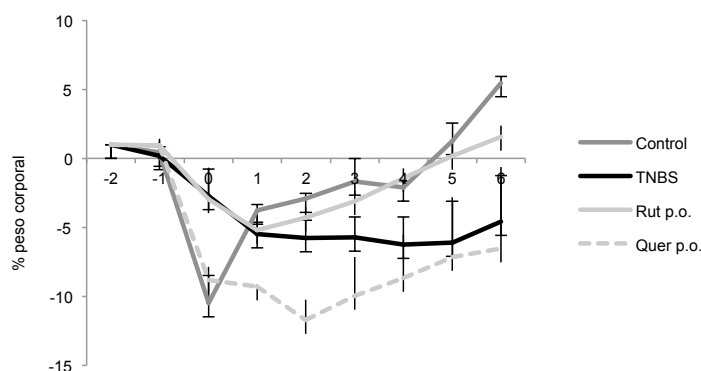
## 1.2. Efecto de la rutina y quercetina en ileítis inducida por TNBS

Como se ha comentado anteriormente, el mecanismo de acción de la rutina (y la quercitrina) implica la liberación de la quercetina como fracción activa del heterósido en el lumen colónico, de forma que la rutina actúa como molécula portadora que impide la absorción en segmentos proximales del intestino (15). Una vez examinada la influencia de la vía de administración del flavonoide en su efecto antiinflamatorio intestinal, abordamos un segundo aspecto de la hipótesis expuesta, concretamente la región del intestino en la que se manifiesta su acción farmacológica. En este sentido, ensayamos el efecto de rutina y quercetina a la misma dosis que en la serie de experimentos anteriores, por vía oral, en un modelo de ileítis experimental. La predicción es que la quercetina debe presentar al menos cierta acción antiinflamatoria en este caso, mientras que la rutina puede ser más o menos eficaz dependiendo de la cantidad de quercetina que libere en el íleon.

El modelo utilizado es la ileítis inducida por TNBS, el cual es análogo al de colitis, excepto por el obvio requerimiento de cirugía para la inducción de la enfermedad, y por un menor grado de inflamación general. En nuestro caso, las ratas expuestas a TNBS experimentan anorexia y pérdida de peso corporal, así como lesiones intestinales similares a las descritas anteriormente en el caso de la colitis, aunque con un menor grado de necrosis. Estas alteraciones ocasionan un incremento significativo del índice de daño macroscópico y de la relación peso/longitud (Tabla 10). Durante el desarrollo del experimento, el tratamiento con rutina a 20 mg/Kg por vía oral da lugar a una mejoría en la ganancia de pesos desde el día 1 de tratamiento, así como en el consumo de comida. Al término del experimento se observa además una reducción significativa de la relación peso/longitud y del índice de daño macroscópico (Tabla 10 y Fig. 10). Esta mejoría no se aprecia en las ratas tratadas con una dosis equimolar de quercetina (11.1 mg/Kg p.o.), aunque sí al menos una cierta tendencia (Tabla 10 y Fig. 10).

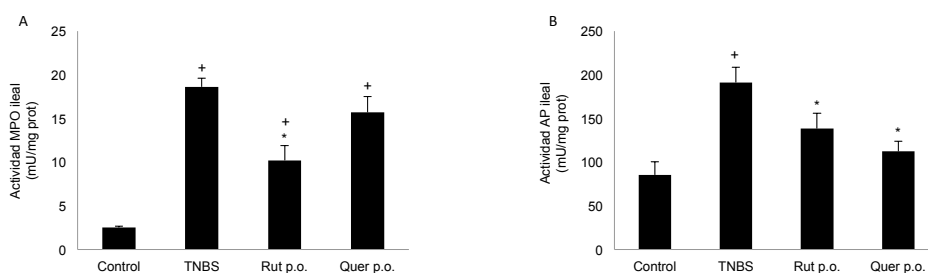
Grupos	% peso corporal	Índice de daño macroscópico (UA)	Relación peso/long (mg/cm)	Consumo de comida (g/rata-día)
Control	5.5 ± 0.5	-	81.3 ± 0.3	20.3 ± 3.1
TNBS	-12.1 ± 8.7 <sup>+</sup>	6.7 ± 0.8 <sup>+</sup>	133.1 ± 19.4 <sup>+</sup>	8.6 ± 1.3 <sup>+</sup>
Rut p.o.	1.8 ± 1.8	3.2 ± 1.1 <sup>+</sup> *	64.1 ± 8.1 <sup>*</sup>	15.5 ± 2.6 <sup>*</sup>
Quer p.o.	-6.5 ± 5.9	5.4 ± 1.8 <sup>+</sup>	118.5 ± 20.2	11.6 ± 2.3 <sup>+</sup>

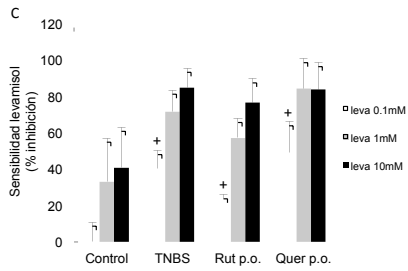
**Tabla 10:** Efecto de la rutina p.o. y quercetina p.o. en la evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de ileítis por TNBS en rata. Datos expresados como media ± SEM (n=4-8). <sup>+</sup>p<0.05 frente a grupo control; <sup>\*</sup>p<0.05 frente a grupo TNBS.



**Figura 10:** Evolución de peso corporal, % del peso inicial. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

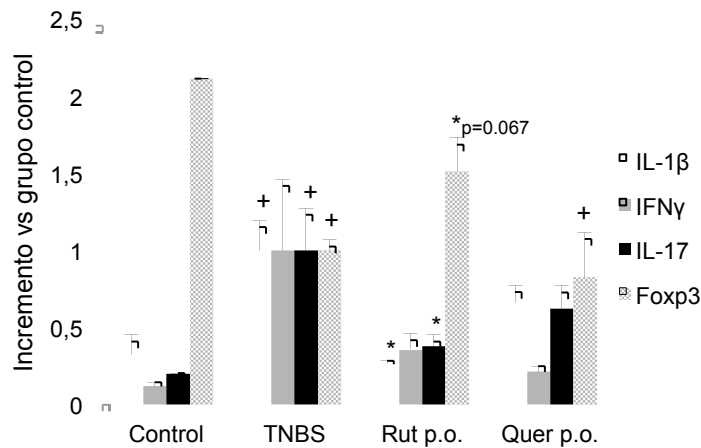
Siguiendo el patrón observado en la inducción de colitis por TNBS, las ratas con ileítis exhiben un incremento de la actividad MPO y AP de 6 y 2 veces, respectivamente, respecto al grupo TNBS, así como una mayor sensibilidad de la AP al levamisol *in vitro* (Fig. 11). El tratamiento con rutina p.o. se asocia con un descenso significativo de la actividad MPO y AP, mientras que la sensibilidad al levamisol de ésta se encuentra asimismo disminuida respecto al grupo TNBS ( $P<0.05$ , Fig. 11). Por el contrario, la quercetina no tiene efecto alguno sobre MPO o sensibilidad al levamisol de la AP, aunque la actividad AP en sí fue comparable a la del grupo control (Fig. 11B).





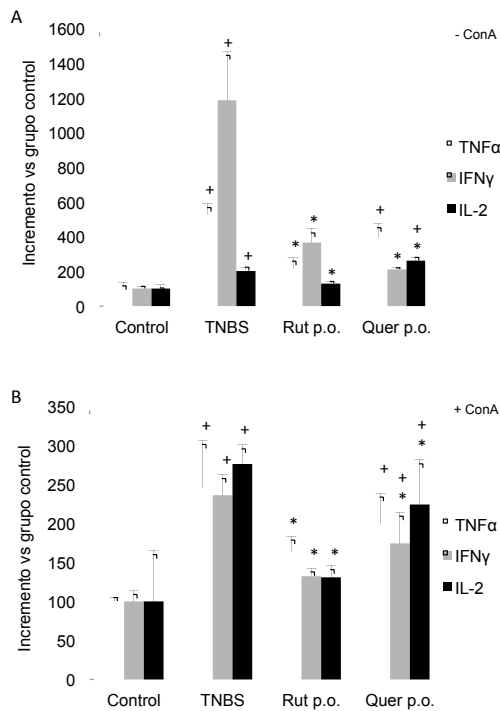
**Figura 11:** Actividades enzimáticas en el tejido ileal (A) MPO (mU/mg prot), (B) AP (mU/mg prot) y (C) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; +  $P < 0,05$ , frente a Control; \* $< 0,05$ , frente a TNBS. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

La ileítis por TNBS también induce un incremento en la expresión ileal de IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  e IL-17 respecto al grupo no enfermo ( $p < 0,05$ , Fig. 12), mientras que los niveles de Foxp3 disminuyen un 50% ( $p < 0,05$ , Fig. 12). La rutina administrada por vía oral normaliza totalmente el incremento de IL-1 $\beta$  e IL-17 producido por el TNBS, y tiene la misma tendencia en el caso del IFN $\gamma$  y Foxp3, rozando la significancia en éste último ( $p = 0,067$  respecto al grupo TNBS). Por su parte, el único aunque marcado efecto de la quercetina oral es una disminución de la expresión de IFN $\gamma$  (Fig. 12).



**Figura 12:** Expresión génica en el tejido ileal medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media  $\pm$  SEM. + $P < 0,05$ , frente a Control; \* $< 0,05$ , frente a TNBS. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

La producción de citoquinas proinflamatorias por células de los ganglios linfáticos mesentéricos *ex vivo* se ve aumentada en la ileítis por TNBS (Fig. 13). Las células procedentes de las ratas tratadas con rutina p.o. muestran una inhibición a este nivel, tanto en condiciones basales como bajo estimulación con ConA. En este caso se constata un efecto similar de la quercetina p.o. sobre la secreción de IFN $\gamma$  e IL-2 por dichas células, en ambas condiciones (Fig. 13A-B).



**Figura 13:** Producción de citoquinas por parte de células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos. (A) a nivel basal, los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo control; Control=27.3pg/ml (TNF- $\alpha$ ), 23.2pg/ml (IFN $\gamma$ ) y 30.8pg/ml (IL-2); (B) estimuladas con concanavalina A (5  $\mu$ g/ml), los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo control; Control=899.4pg/ml (TNF- $\alpha$ ), 41369.2pg/ml (IFN $\gamma$ ) y 21297.8pg/ml (IL-2); media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

Por tanto, la rutina administrada por vía oral ejerce efectos antiinflamatorios sustanciales a nivel ileal, que de hecho son comparables, si no superiores, a los observados en el colon. Por su parte, la quercetina, administrada por la misma vía, mejora ciertos parámetros pero es globalmente inferior a la rutina.

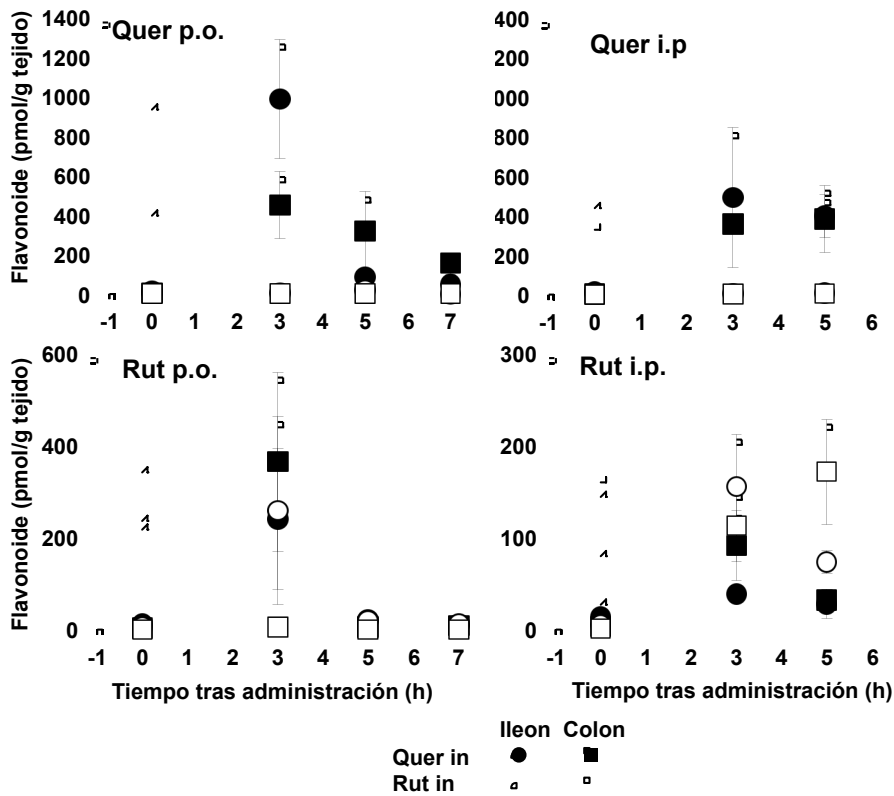
### 1.3. Análisis farmacocinético de rutina y quercetina en la mucosa intestinal sana

Con el fin de comparar el perfil farmacocinético de rutina y quercetina, se planteó un estudio que permitiera la determinación cuantitativa de ambos flavonoides a nivel de las mucosas ileal y colónica tras una administración tanto oral como intraperitoneal de uno u otro. Los niveles de rutina y quercetina en colon e íleon fueron analizados mediante HPLC-MS/MS.

El experimento se diseñó de tal forma que los animales recibieron o rutina a dosis de 20 mg/Kg o quercetina a dosis de 11.1 mg/Kg, por vía, o oral o intraperitoneal, durante 3 días; se sacrificaron a 3, 5 o 7 horas tras la última administración del flavonoide el tercer día de tratamiento.

Los resultados muestran que el tratamiento con los flavonoides da lugar a un incremento en sus niveles mucosales comparado con la concentración basal (Fig. 14). Específicamente, la administración oral de rutina produce un incremento por encima de 200 pmol/g en la mucosa ileal tanto de rutina como de quercetina, cuyo pico se observa a las 3 horas (Fig. 14). En estas mismas condiciones también se detectan altas concentraciones de quercetina a nivel colónico, en el mismo punto de tiempo (3 horas), pero no más tarde. Cabe destacar la ausencia de rutina en la mucosa colónica, lo que es coherente con la rápida metabolización del heterósido en las regiones distales del tubo digestivo (Fig. 14).

Cuando la quercetina fue administrada por la misma vía de administración se encuentran cantidades sustanciales en íleon, pero también en colon, a las 3 horas de la última administración. Los niveles ileales caen drásticamente a las 5 horas, mientras que los niveles colónicos disminuyen más gradualmente (Fig. 14). Como era previsible, no se detecta rutina en este grupo.



**Figura 14:** Niveles de rutina y quercetina en las mucosas colónica e ileal de ratas no colíticas tras la administración de los flavonoides. Concentraciones cuantificadas por HPLC-MS/MS 3, 5 o 7 horas tras administración, seguido de 2 días de pretratamiento, los datos se expresan como pmol/g tejido; media  $\pm$  SEM. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

Al administrar los flavonoides por vía intraperitoneal, el perfil farmacocinético resulta diferente al observado tras la administración oral. Así, la inyección de rutina da lugar a niveles en íleon comparables a los observados tras la administración oral, con la diferencia de que se mantienen elevados hasta las 7 horas. Además, los niveles de rutina aparecen igualmente aumentados en la mucosa colónica (Fig. 14). También se detecta presencia de quercetina, siguiendo un perfil similar a los niveles de rutina en ambas mucosas intestinales pero a concentraciones inferiores (Fig. 14).

Cuando se administra quercetina i.p., los resultados son similares, en el sentido de que los niveles de quercetina permanecen elevados en ambas mucosas intestinales hasta 7 horas tras la última administración (Fig. 14). Resulta interesante recalcar que, aunque el perfil observado



tras la administración de quercetina por cualquiera de las vías es muy similar, el pico a las 3 horas en el caso de la administración oral de quercetina es mucho más elevado que en el caso de la administración i.p. De nuevo, en estas muestras no se detecta rutina.

En consecuencia, nuestros datos confirman que la rutina se biotransforma en quercetina, no sólo en el colon sino también en el íleon, pero por lado revelan que la quercetina llega a la mucosa colónica en cantidades sustanciales cuando se administra como tal.

#### **1.4. Efecto de la rutina por vía oral en el modelo de colitis inducida por transferencia linfocitaria**

La rutina p.o. se ensayó en un segundo modelo preclínico de EII, el modelo de colitis inducida por transferencia linfocitaria. Este modelo, considerado uno de los más cercanos a la enfermedad en humanos, difiere mecanísticamente del anterior por su cronicidad y por tratarse de una colitis inducida por infiltración linfocitaria y por tanto, dependiente de linfocitos como la propia EII. Algunos autores han abogado por el uso de modelos de este tipo frente a otros mucho más utilizados, como el propio modelo de TNBS o el de colitis por sulfatos de dextrano, con el fin de conseguir una mejor predicción de la bioactividad en humanos (673). Por tanto, con el objetivo de validar el carácter antiinflamatorio de la rutina y su posible uso en EII, resulta importante demostrar su bioactividad en este modelo.

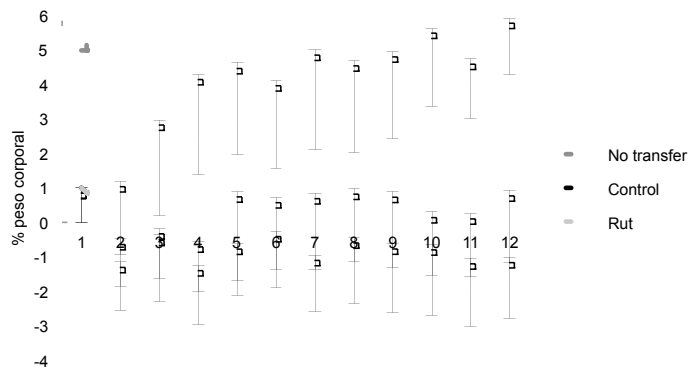
Una vez puesto a punto el modelo, llevamos a cabo dos experimentos distintos, pero idénticos en cuanto al protocolo, en los que se ensayaron dos dosis de rutina. En ambos casos la rutina fue administrada por vía oral una vez la colitis estuvo establecida, es decir, como postratamiento (ver Material y Métodos). La transferencia de linfocitos T CD4+ CD62L+ a ratones Rag1<sup>-/-</sup> da lugar a un progresiva pérdida de peso corporal, siendo significativa entre las semanas 4 y 6 tras la transferencia (606). Por tanto, en nuestro caso los ratones Rag1<sup>-/-</sup> fueron monitorizados tras la transferencia, controlándose semanalmente el peso corporal, la diarrea, la presencia de sangre oculta en heces y los valores hematológicos. Los animales seleccionados para este estudio mostraron una media del 10% de pérdida de peso corporal alrededor de la semana 8, lo cual, junto a los parámetros anteriormente mencionados, nos permitió establecer un índice de actividad de la enfermedad (DAI) el cual nos ayudó a determinar el momento óptimo de los animales para el comienzo de tratamiento.

En el primer experimento, la dosis de rutina utilizada fue de 28.5 mg/Kg, que es la equivalente a la dosis eficaz en rata (20 mg/Kg) ajustada en función de la superficie corporal. Tras la administración oral de rutina durante 22 días, se observa una protección significativa de los ratones frente a la pérdida de peso corporal, así como una menor secreción de TNF- $\alpha$  por parte de las células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos bajo estimulación con ConA *ex vivo*. Sin embargo, ningún otro parámetro se ve significativamente afectado, incluyendo las actividades MPO y AP colónicas, la relación peso/longitud del colon, el índice de daño macroscópico, etc. (datos no mostrados). Por tanto, la rutina en estas condiciones parece ofrecer cierta protección, pero queda muy lejos de los sustanciales efectos mostrados previamente en otros modelos. Por esa razón sospechamos que la dosis aplicada era baja para este modelo y establecimos un segundo experimento.

La dosis de rutina elegida para el segundo experimento fue de 57 mg/Kg (el doble de la dosis anterior). El comportamiento global del modelo experimental es similar al del primer experimento. La administración oral de rutina comienza a la octava semana y el tratamiento se mantiene durante 12 días, en el transcurso de los cuales queda de manifiesto una mejora significativa del DAI (Tabla 11 y Fig. 15). Ésta alcanza el 60% y se debe notoriamente a una ganancia en consistencia de las heces; paradójicamente, no se aprecia una mejora destacable del peso corporal.

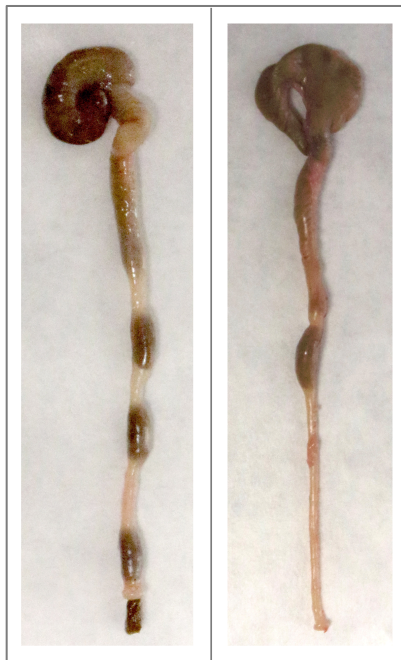
Grupos	Ganancia de peso (relativo al peso corporal original)	Disease activity index (AU)	Índice de daño macroscópico (UA)	Relación peso/long en colon (mg/cm)	Relación peso/long en íleon (mg/cm)	Relación peso/long en yeyuno (mg/cm)
No transfer	13.8±1.1	–	–	21.6±1.4	21.9±2	26.9±2.9
Control	-1.8±0.8*	4.6±0.3*	2.4±0.4*	48.4±5.5*	29.7±1.1*	38.1±1.5*
Rut	-0.2±1.1*	2.2±0.4**	1.4±0.5*	31.3±5.2*	25.9±1.4*	34.6±1.4*

**Tabla 11:** Efecto de la rutina p.o. en la evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria en ratón. Datos expresados como ± SEM (n=6-10). \*p<0.05 frente a grupo No transfer. \*\*p<0.05 frente a grupo Control.



**Figura 15:** Evolución de peso corporal, % del peso inicial. Rut=Rutina.

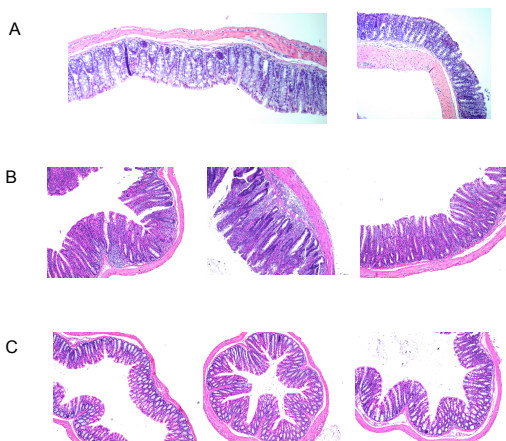
En cuanto al análisis macroscópico, encontramos que el colon de los ratones transferidos con células T CD4+CD62L+ presenta una mucosa colónica hiperémica con engrosamiento de la pared intestinal, rigidez, pero no necrosis (Imagen 5). Todo ello da lugar a un incremento en el índice de daño corporal y la relación peso/longitud (Tabla 11). En la misma línea, la relación peso/longitud de íleon y yeyuno también se encuentra incrementada significativamente con respecto a los animales no colíticos (Tabla 11). El examen macroscópico corrobora el efecto beneficioso de la rutina, normalizando significativamente todos estos parámetros a excepción del índice de daño macroscópico, que queda en cualquier caso a las puertas de la significación estadística (p=0.069; Imagen 5 y Tabla 11).



**Imagen 5:** Cambios macroscópicos de colon. Fotografías de colon diseccionado de ratones C57 transferidos con células T CD4+CD62L+ (izquierda del panel) y ratones C57 transferidos con células T CD4+CD62L+ tratados con rutina (derecha del panel).

1 cm

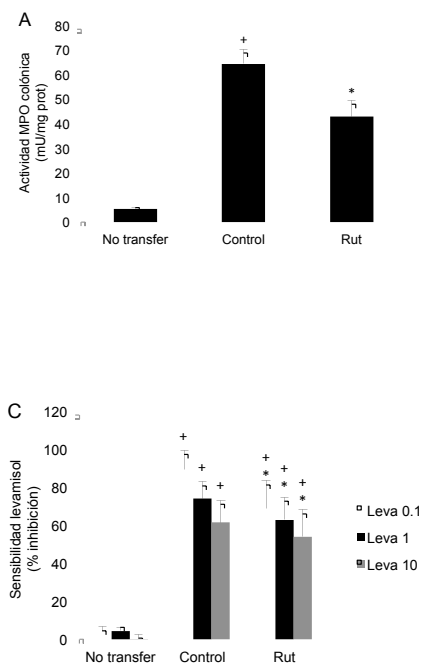
El estudio histológico (tinción hematoxilina-eosina) muestra un menor daño en los tejidos colónicos procedentes de los animales que recibieron rutina en comparación con el grupo colítico no tratado. En la colitis se observa una destrucción del epitelio con acortamiento de las criptas y pérdida de la arquitectura epitelial sumado a infiltración a nivel de la mucosa. El tratamiento con rutina se asocia a un menor daño epitelial; el epitelio presenta una arquitectura prácticamente normal con algunos indicios de destrucción en zonas muy localizadas. La infiltración celular también se ve reducida (Fig. 16).



**Figura 16:** Imágenes histológicas (10X) de muestras colónicas procesadas y teñidas con Hematoxilina/Eosina (A) Grupo No transfer (no colítico) (B) Grupo Control (colítico no tratado) (C) Grupo Rutina

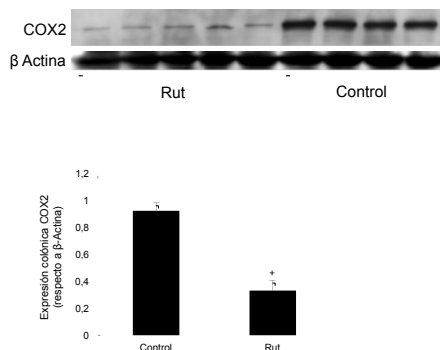
El reclutamiento neutrófilico en la mucosa colónica de los animales colíticos no tratados es evidenciado por un incremento de 11.9 veces en la actividad MPO colónica. Análogamente, la actividad AP colónica se ve incrementada 2.9 veces en el grupo Control respecto al grupo no colítico, asociado con un marcado incremento en la sensibilidad al inhibidor específico

levamisol *in vitro*. El tratamiento con rutina normaliza ambas actividades enzimáticas ( $p < 0.05$ , Fig. 17).

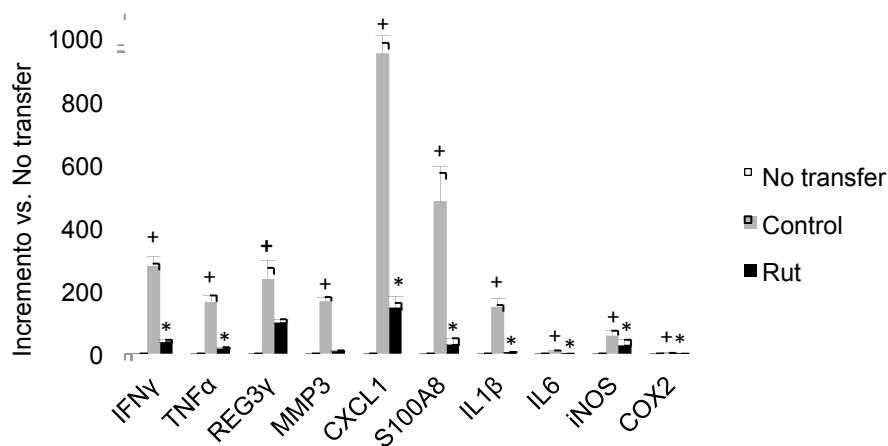


**Figura 17:** Actividades enzimáticas en el tejido colónico (A) MPO (mU/mg prot), (B) AP (mU/mg prot) y (C) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; + $P < 0,05$ , frente a. No transfer; \* $< 0,05$ , frente a Control. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

El incremento en la expresión proteica en colon de COX2 producido por la transferencia linfocitaria disminuye en un 64% como consecuencia del tratamiento con la rutina (Fig. 18). Asimismo, se observa un incremento sustancial de la expresión colónica de marcadores proinflamatorios tales como IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , REG3 $\gamma$ , MMP3, CXCL1, S100A8, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS y COX2 en los animales colíticos, del orden de 150-950 veces, en todos los casos con significancia estadística (Fig. 19). La rutina normaliza por completo (significativamente) el incremento de IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXCL1, S100A8, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS y COX2 (Fig. 19). En el caso de REG3 $\gamma$  y MMP3, a pesar de la tendencia mostrada por la rutina a disminuir ambos marcadores, la variabilidad entre animales en el grupo tratado impide alcanzar el umbral de la significancia (REG3 $\gamma$   $p = 0.113$ ; MMP3  $p = 0.246$ ).

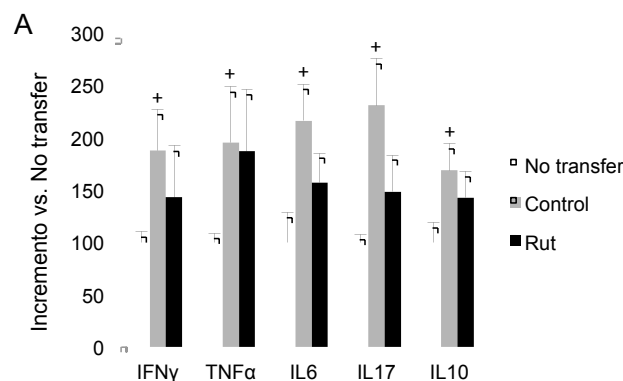


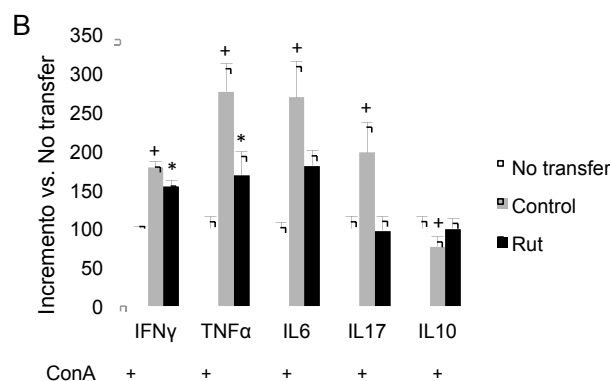
**Figura 18:** Expresión de COX2 en el tejido colónico, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + $P < 0,05$ , frente a. Control; Rut=Rutina.



**Figura 19:** Expresión génica en el tejido colónico medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo No transfer, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. No tranfer; \*<0,05, frente a Control. Rut=Rutina.

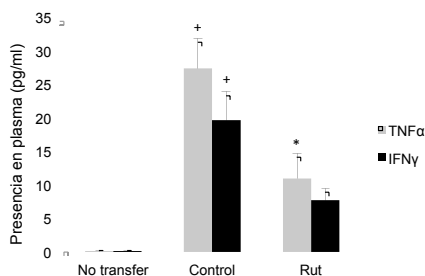
De la misma manera que en el modelo anterior, estudiamos la secreción *ex vivo* de citoquinas por células mononucleares obtenidas de ganglios linfáticos mesentéricos. Este modelo de colitis está caracterizado por una expansión progresiva de la población de linfocitos T transferidos, con un predominio de células Th1/Th17. Acorde con estos datos, las células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos del grupo colítico no tratado exhibe un aumento en la secreción de IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-6 comparada con el grupo No transfer (no colítico), alcanzando significancia en todos los casos (Fig. 20A). La estimulación con ConA induce una robusta respuesta por parte de todos los grupos, de nuevo significativamente incrementada en el grupo Control respecto al grupo no colítico (Fig. 20B). El tratamiento con rutina no afecta a la secreción espontánea de estas citoquinas, aunque pueden apreciarse tendencias de inhibición en la mayoría de ellas (Fig. 20A); sin embargo, la secreción de IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$  inducida por ConA es inhibida significativamente en un 14% y 39%, respectivamente (Fig. 20B), observándose una tendencia similar en el caso de la IL-6 y la IL-17 (Fig. 20B).





**Figura 20:** Producción de citoquinas por parte de células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos. (A) a nivel basal, los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo No transfer; No transfer=98.8pg/ml (IFN $\gamma$ ), 92.9pg/ml (TNF- $\alpha$ ), 11.1pg/ml (IL-6), 8.2pg/ml (IL-17) y 15.2pg/ml (IL-10); (B) estimuladas con concanavalina A (5  $\mu$ g/ml), los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo No transfer; No transfer=5138.9pg/ml (IFN $\gamma$ ), 532.9pg/ml (TNF- $\alpha$ ), 498.1pg/ml (IL-6), 1288.2pg/ml (IL-17) y 1172.3pg/ml (IL-10) media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. No transfer; \*<0,05, frente a Control. Rut=Rutina.

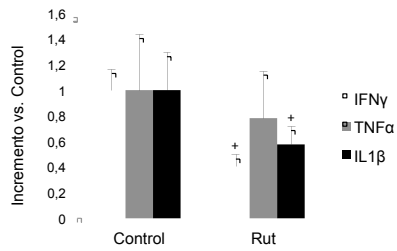
En este modelo preclínico de EII, más cercano a la enfermedad en humanos, tratamos de ir más allá e implicar no sólo un efecto beneficioso regional de la rutina, sino también sistémico. Para ello, un primer estudio fue evaluar los niveles de citoquinas en plasma. La colitis inducida por transferencia linfocitaria tiene unos efectos moderados a este nivel, sin embargo se detecta un incremento en IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , estadísticamente significativo comparado al grupo no colítico (Fig. 21). Los niveles de IL-6, IL-10 o IL-17 fueron indetectables (datos no mostrados). El tratamiento con rutina produce modificaciones sustanciales en los niveles séricos estas citoquinas, disminuyendo significativamente TNF- $\alpha$  y cercano la significancia IFN $\gamma$  ( $p=0.075$ ; Fig. 21).



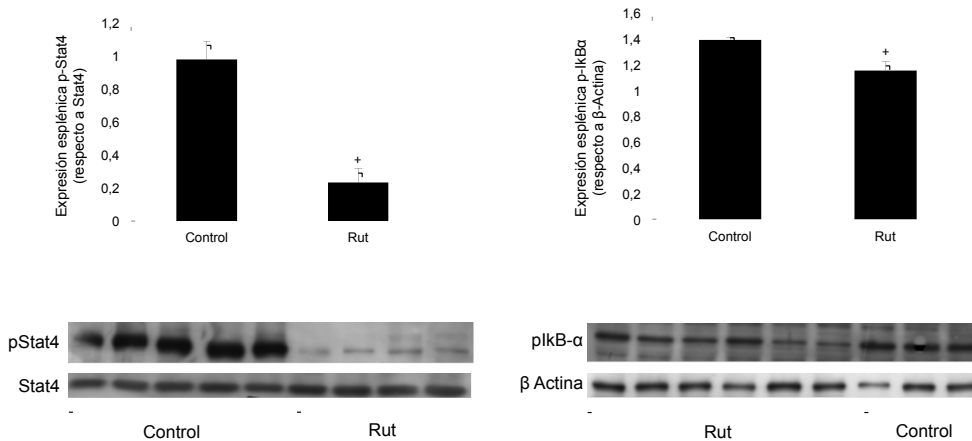
**Figura 21:** Concentración de citoquinas en plasma. Los valores se expresan como incremento frente a dicho grupo. + P<0,05, frente a. No transfer; \* P<0,05, frente a. Control. Rut=Rutina.

Con el mismo fin anterior, aislamos células mononucleares CD4+ de bazo de los tres grupos del experimento, con el objetivo de detectar modificaciones por el tratamiento con rutina. Se realizaron dos estudios en paralelo: determinación de expresión génica de genes proinflamatorios y detección proteica de marcadores proinflamatorios. La cuantificación por RT-PCR revela la capacidad de la rutina para revertir el incremento en la expresión de los genes

proinflamatorios IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ocasionado como consecuencia de la transferencia linfocitaria, con efecto especialmente prominente en el caso de IFN $\gamma$  e IL-1 $\beta$  (Fig. 22). Por otro lado, mediante análisis por Western blot podemos constatar el incremento de fosforilación de Stat4, principal responsable de la diferenciación de linfocitos T al subtipo Th1, y de I $\kappa$ B- $\alpha$ , implicada en la vía clásica o canónica de activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. En ambos casos se produce una inhibición significativa con el tratamiento con rutina, pero este efecto es mucho más intenso en el caso de Stat4 (74%, Fig. 23 A-B).



**Figura 22:** Expresión génica en células CD4+ de bazo medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; Rut=Rutina.



**Figura 23:** Expresión de (A) pStat4 y (B) p-I $\kappa$ B $\alpha$  en células CD4+ de bazo, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; Rut=Rutina.

## 2. ESTUDIOS *IN VITRO*

El objetivo de los ensayos *in vitro* es el de caracterizar el mecanismo de acción del efecto antiinflamatorio y/o inmunomodulador observado en los ensayos *in vivo* expuestos anteriormente, así como en diversos estudios anteriores colitis (12, 13, 671). Aunque nuestro interés se ha centrado hasta el momento en la rutina y la quercetina, los flavonoides constituyen una familia estructuralmente muy variada que incluye múltiples miembros bioactivos. Por esta razón, hemos ampliado nuestro estudio a la caracterización de una serie de 9 flavonoides (agliconas), pertenecientes a 4 subfamilias. Las concentraciones empleadas fueron elegidas en función de resultados preliminares de toxicidad y actividad biológica de estos compuestos en diferentes poblaciones celulares. En algunos casos se han realizado

curvas de concentración extendidas, desde 0.01 a 100  $\mu\text{M}$ . Las agliconas escogidas fueron crisina, diosmetina, luteolina y apigenina como flavonas; daidzeína y genisteína como isoflavonas; hesperetina y naringenina como flavanonas; kaempferol y quercetina como flavonoles. Además, en algunos casos se han utilizado otros derivados de flavonoides.

En cuanto a los modelos y poblaciones celulares empleadas, el propósito ha sido abarcar los tipos celulares más importantes en la respuesta inmunológica implicada en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y la interacción entre ellos, esto es, enterocitos, como parte fundamental de la respuesta inmunológica innata a nivel de la barrera epitelial y células mononucleares, fundamentalmente linfocitos T. En el caso de los enterocitos, nuestros estudios han sido realizados con la línea celular IEC18 (88011801<sup>TM</sup> ECACC<sup>®</sup>), células epiteliales no tumorales procedentes de íleon de rata. El estudio de las células mononucleares se ha llevado a cabo mediante experimentos *ex vivo*, en los que los cultivos primarios se han obtenido a partir de bazo de rata, ya que la cantidad de células contenidas en dicho órgano linfoide es muy elevada, lo que facilita la realización de los experimentos.

En la mayoría de los experimentos se ha realizado un protocolo a corto plazo, con un período de exposición de 24 a 72 horas del flavonoide, con o sin pretratamiento, según tipo celular y estímulo.

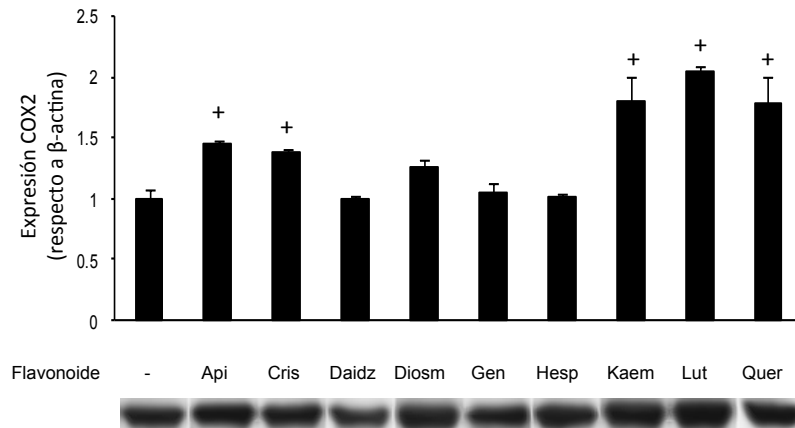
## **2.1. Efecto de los flavonoides sobre enterocitos**

### **2.1.1. Acciones moduladoras de los flavonoides sobre COX2 y NF- $\kappa$ B en enterocitos**

En un principio se valoró la toxicidad de los flavonoides sobre la línea celular IEC18, mediante WST1, revelando que ninguno de los flavonoides es tóxico para dichas células a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  (dato no mostrado).

En una primera aproximación al efecto de los flavonoides en células IEC18 examinamos su capacidad de modular la expresión de la enzima COX2. Para ello se expusieron las células IEC18 a los diferentes flavonoides a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Las IECs expresan COX2 cuando son estimuladas por factores proinflamatorios, incluyendo LPS, TNF- $\alpha$ , estrés oxidativo, etc. La expresión de COX2 en células IEC18 fue medida por Western Blot. En condiciones basales, es decir, sin otros estímulos añadidos, ni las isoflavonas ni las flavanonas muestran ningún efecto. Flavonas y flavonoles incrementan la expresión de COX2, excepto en el caso de la diosmetina (Fig. 24). El efecto de las flavonas es menor que el efecto de los flavonoles. Así, se observa que kaempferol y quercetina casi doblan la expresión de la enzima ( $1.80\pm 0.20$  y  $1.78\pm 0.23$  frente al control, respectivamente,  $p<0.05$ ). La luteolina produce un aumento de  $2.05\pm 0.04$ , comparado con el incremento de  $1.45\pm 0.03$  y  $1.39\pm 0.03$  de la apigenina y crisina, respectivamente ( $p<0.05$  en todos los casos; Fig. 24). Basándonos en estos resultados, el doble enlace entre las posiciones 2 y 3 y la posición 2 en el anillo de C parecen determinantes importantes de la actividad, mientras que la presencia de un grupo 4'-OH intacto tiene un papel menor (compárese diosmetina frente a luteolina). Por otra parte, la hidroxilación en 3- y 3' es aparentemente indiferente.

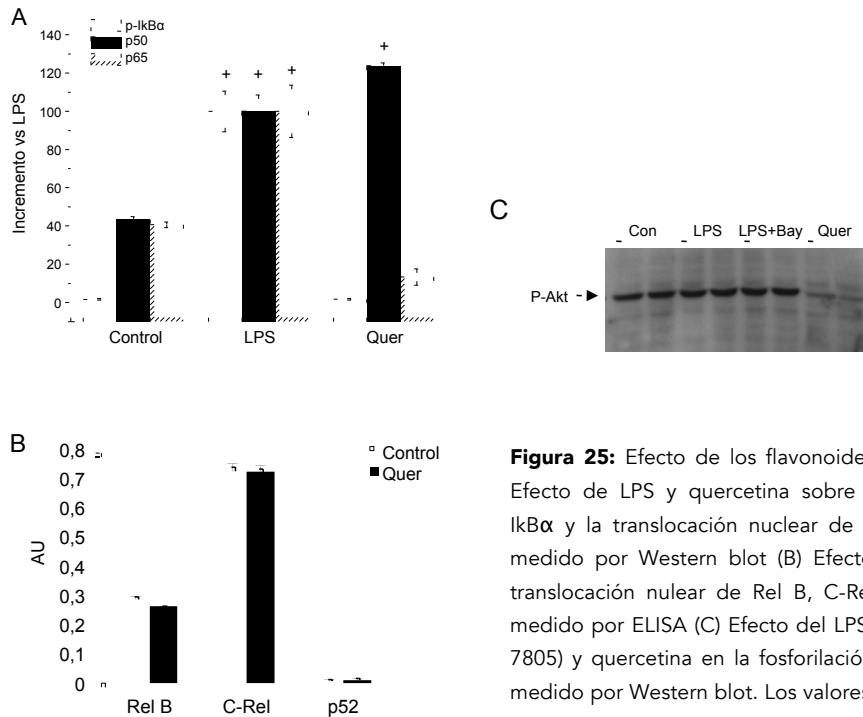




**Figura 24:** Expresión basal de COX2 en IEC18, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como incremento respecto a células no tratadas (media  $\pm$  SEM). +  $P < 0,05$ , frente a. Control. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaemferol; Quer=Quercetina.

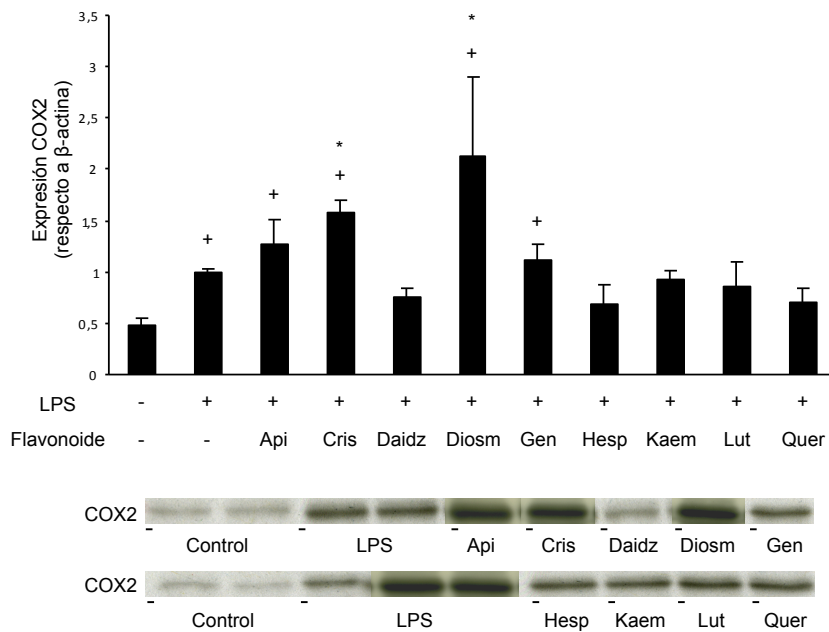
Para entender la regulación que ejercen los flavonoides sobre la expresión de COX2 a nivel basal, estudiamos la activación de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión de múltiples, incluyendo COX2 (674). NF- $\kappa$ B es activado en respuesta a varios estímulos externos, como interleuquinas, factores de crecimiento, infecciones virales y bacterianas, factores físicos (luz UV, por ej.) y LPS. La principal vía de transducción que permite la activación de NF- $\kappa$ B, la vía clásica, se caracteriza por la fosforilación de la Ser32 de la proteína inhibidora I $\kappa$ B- $\alpha$ , que en ausencia de estímulo está ligada a NF- $\kappa$ B, impidiendo su migración al núcleo.

La quercetina, seleccionada como flavonoide activo en la modulación de la expresión de COX2 en IEC18 quiescentes, no fosforila I $\kappa$ B- $\alpha$ , a pesar de ser una clara inductora de COX2 (Fig. 25A); sin embargo, la quercetina sí estimula la translocación nuclear de p50 (pero no p65) en la misma medida que el LPS (Fig. 25A), mientras que el LPS provoca la translocación al núcleo de ambas subunidades. Por tanto, LPS y quercetina producen distintos efectos sobre las células IEC18, aunque ambos inducen la expresión de COX2. Para dilucidar si otras subunidades de NF- $\kappa$ B están involucradas en la regulación transcripcional de COX2, estudiamos la posible translocación al núcleo de otros 3 miembros de la familia NF- $\kappa$ B. La quercetina no induce la translocación de ninguna otra subunidad (Fig. 25B). También estudiamos la vía PI3K/Akt mediante la fosforilación de Akt, como ruta alternativa de estimulación de NF- $\kappa$ B. Como puede observarse en la Fig. 25C, el LPS aumenta la fosforilación de Akt por una vía independiente de Bay11-7805 (inhibidor de la vía clásica de activación de NF- $\kappa$ B), mientras que la quercetina inhibe la fosforilación basal de Akt. Por lo tanto, parece improbable que la quercetina induzca COX2 por esta vía.



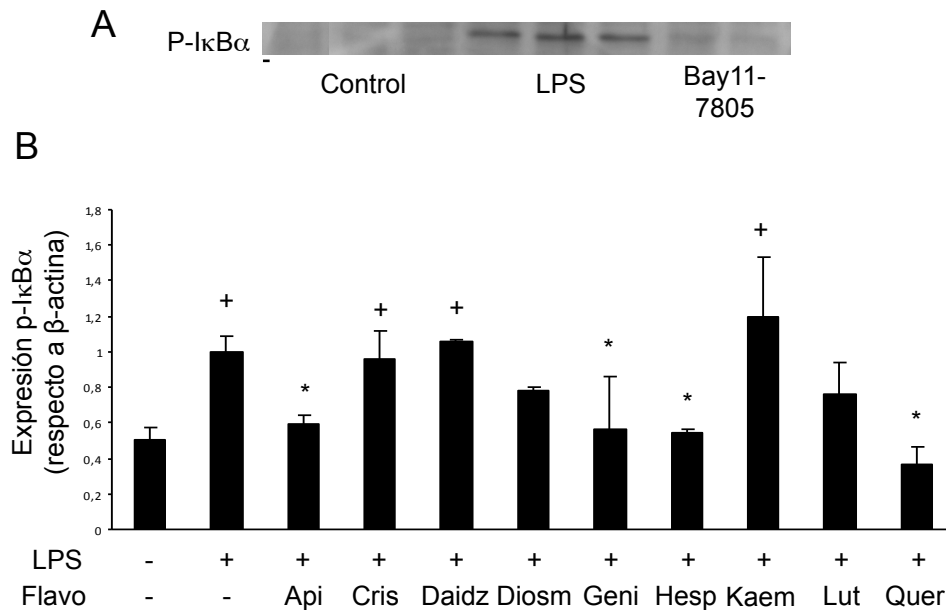
**Figura 25:** Efecto de los flavonoides sobre NF-kB. (A) Efecto de LPS y quercetina sobre la fosforilación de IκBα y la translocación nuclear de p50/p65 en IEC18 medido por Western blot (B) Efecto quercetina en la translocación nuclear de Rel B, C-Rel y p52 en IEC18 medido por ELISA (C) Efecto del LPS (con y sin Bay 11-7805) y quercetina en la fosforilación de Akt en IEC18 medido por Western blot. Los valores han sido referidos a la expresión de β-actina. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control. Quer=Quercetina; LPS=Lipopolisacárido.

A continuación, nuestro objetivo fue determinar el efecto de los flavonoides tras la inducción de COX2 por un estímulo proinflamatorio. Con este fin, tratamos a las células con vehículo o flavonoide y, tras 1 h de pretratamiento, se añadió 10 µg/ml de LPS. Tal como se esperaba, el LPS incrementa la expresión de COX2 (doblando el nivel de las células control, Fig. 26). El efecto más destacable de todos los flavonoides fue el incremento en la expresión de COX2 producido por la flavona diosmetina. La flavonas crisina y la apigenina también incrementan la inmunoreactividad de COX2, pero en menor medida. En contraste, todos los demás flavonoides, exceptuando la genisteína, es decir flavonoles, la flavanona hesperetina y la isoflavona daidzeína, no aumentan los niveles de COX2 en absoluto, sino que manifiestan una cierta tendencia al efecto contrario, dando lugar a unos niveles de COX2 intermedios entre la expresión basal y la inducida por LPS (Fig. 26). Claramente, las flavonas son los únicos flavonoides que favorecen la expresión de COX2 bajo estimulación con LPS, con la importante excepción de la luteolina. Este dato sugiere que la metoxilación en 4' es importante para esta actividad. Además, el doble enlace 2-3 es necesario para la actividad (diosmetina frente a hesperetina), así como el anillo B en posición 2 (apigenina/genisteína) y la ausencia del 3-OH característico de los flavonoles. Globalmente los flavonoides presentan efectos distintos en condiciones basales y bajo estimulación con LPS.



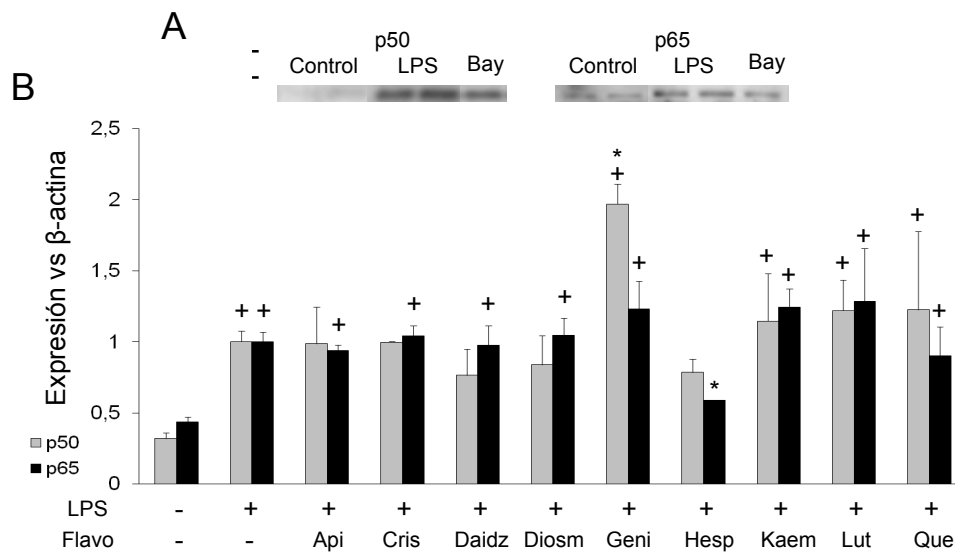
**Figura 26:** Expresión de COX2 bajo estimulación de LPS en IEC18, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de β-actina. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaempferol; Quer=Quercetina.

De forma similar al estudio de la activación de NF-κB en la expresión basal de COX2 por ciertos flavonoides, estudiamos la posible implicación en el caso de la expresión inducida por LPS. Como hemos comentado anteriormente, el LPS induce una rápida fosforilación de IκB-α (15 minutos), lo cual fue completamente prevenido por el inhibidor específico Bay 11-7082 a una concentración de 10 μM (Fig. 27A). Análogamente, varios flavonoides inhiben totalmente la fosforilación de IκB-α inducida por LPS, incluyendo quercetina, hesperetina, genisteína y apigenina (Fig. 27B). Diosmetina y luteolina parecen tener un efecto parcial a este nivel. Por el contrario, crisina, daidzeína y kaempferol no tienen efecto alguno. La única característica estructural requerida para la inhibición de la fosforilación de IκB-α que puede ser establecida es la presencia del grupo 4'-OH (apigenina frente a crisina) y el grupo 5-OH (genisteína frente a daidzeína), mientras que la posición del anillo B (genisteína frente a apigenina) y la metoxilación en 4' (diosmetina frente a luteolina) son irrelevantes. El doble enlace 2-3 parece debilitar la actividad (diosmetina frente a hesperetina). La contribución del grupo 3-OH es compleja, porque favorece la inhibición en algunos casos (quercetina frente a luteolina), pero la debilita en otros (kaempferol frente a apigenina).



**Figura 27:** Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de IκBα medida por Western blot. Se usaron proteínas citoplasmáticas para medir p-IκBα. Tras 1h de pretratamiento con el flavonoide, se añadió LPS a 1μg/ml durante 30 minutos. (A) Efecto LPS ± Bay 11-7805. (B) Efectos flavonoides. Los valores han sido referidos a la expresión de β-actina. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaemferol; Quer=Quercetina.

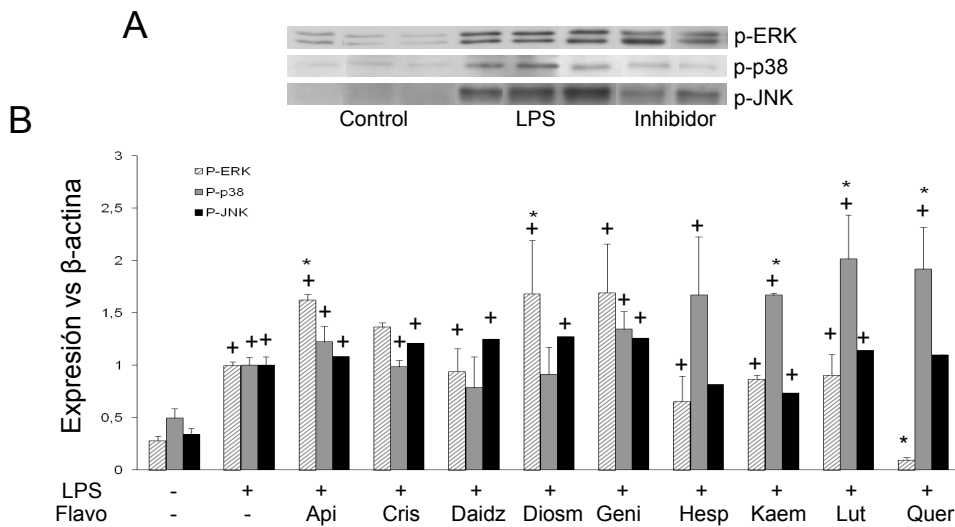
En la vía canónica de activación de NF-κB la fosforilación de IκB-α determina su ubiquitinación y degradación por la maquinaria del proteasoma, lo que deja libres los dímeros de NF-κB para su translocación al núcleo donde ejercen sus acciones transcripcionales. En enterocitos, los dímeros de NF-κB están compuestos principalmente por p50 y p65 (675, 676), aunque como se ha visto anteriormente la quercetina induce la translocación de p50 exclusivamente. Por esta razón examinamos el efecto de los flavonoides sobre la translocación de p50/p65 en el núcleo de células IEC18 tratadas con LPS. La inmunoreactividad de p50 y p65 se incrementa notablemente (3 y 2 veces, respectivamente, p<0.05) 30 minutos después de la estimulación con LPS (Fig. 28A), confirmando la translocación del dímero estándar en los enterocitos expuestos a la endotoxina. Sorprendentemente, el inhibidor Bay 11-7802 solo bloquea parcialmente (~40%) la migración de p50/p65, sugiriendo la existencia de una vía de activación alternativa en respuesta a LPS, dado que la inhibición de la fosforilación de IκB-α es total (Fig. 28A). Contrariamente a lo esperado, los flavonoides no modifican el efecto del LPS en p50/p65, con la única excepción de la genisteína, que potencia la migración nuclear de p50, y la hesperetina, que tuvo el efecto contrario sobre p65 (Fig. 28B).



**Figura 28:** Efecto de los flavonoides sobre la translocación al núcleo de p50 y p65 medida por Western blot. Se usaron proteínas nucleares para medir p50 y p65. Tras 1h de pretratamiento con el flavonoide, se añadió LPS a 1µg/ml durante 30 minutos. (A) Efecto LPS ± Bay 11-7805. (B) Efectos flavonoides. Los valores han sido referidos a la expresión de β-actina. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daidz=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaempferol; Quer=Quercetina.

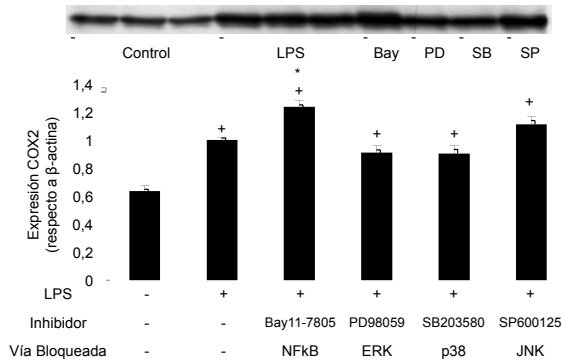
A continuación analizamos la regulación de la cascada de señalización por MAPK, al objeto de comprobar su posible implicación en los efectos de los flavonoides. Las MAPK son proteínas quinasas específicas serina/treonina que responden a estímulos extracelulares y regulan varias actividades celulares, como la expresión de genes, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia celular y la apoptosis. Existen cuatro grupos distintos de MAPK caracterizados en mamíferos. Nosotros estudiamos el efecto de los flavonoides en 3 de las vías más estudiadas de MAPK: ERK, JNK y p38. Como se muestra en la Fig. 29A, estas vías son activadas a los 30 minutos de la exposición a LPS, activación que se revierte en gran medida (pero no totalmente) con los inhibidores respectivos, específicos de ERK (PD098059), JNK (SP600125) y p38 (SB-203580). En lo que respecta a la modulación por flavonoides, no se registra efecto alguno a nivel de JNK (Fig. 29B). Por el contrario, la fosforilación de ERK es incrementada por 3 de las flavonas, concretamente diosmetina, apigenina y crisina (ésta última no llegó a ser significativa), pero no luteolina, y por la isoflavona genisteína. El incremento es de ~60%. Es interesante destacar que la quercetina exhibe el efecto contrario, es decir, una inhibición completa de la fosforilación de ERK, mientras que otro flavonol, el kaempferol, y la flavanona hesperetina, carecen de efecto (Fig. 29B). Basándonos en estas observaciones, el doble enlace 2-3 (diosmetina frente a hesperetina), la hidroxilación del anillo B (apigenina frente a crisina), y la presencia del grupo 5-OH (genisteína frente a daidzeína) parecen ser importantes para la fosforilación de ERK, mientras que las posiciones 2-3 del anillo B parecen ser indiferentes (genisteína frente a apigenina). La doble hidroxilación en el anillo B debilita el efecto (luteolina frente a apigenina), a no ser que uno de ellos esté metoxilado (diosmetina). Por otro lado, el grupo 3-OH tiene carácter inhibitorio (kaempferol frente a apigenina), que se atenúa con la hidroxilación en 3'.

En el caso de la fosforilación de p38, los resultados muestran que los flavonoles quercetina y kaempferol, la flavona luteolina y la flavanona hesperetina potencian la activación de esta vía ( $p < 0.05$ ), siendo todos los demás flavonoides inactivos (Fig. 29B). De acuerdo con estos resultados, un grupo hidroxilo en 2 en vez de en 1 en el anillo B (luteolina frente a apigenina) y la hidroxilación en 3 (kaempferol frente a apigenina) son las principales claves de las características estructurales para esta actividad. Dado que el doble enlace 2-3 parece asociarse a un efecto inhibitor (diosmetina frente a hesperetina), es posible que esta vía pueda activarse aún más por compuestos del tipo flavanona.



**Figura 29:** Efecto de los flavonoides sobre MAPK quininas medido por Western blot. Se usaron proteínas citoplasmáticas para medir pERK, p-p38 y p-JNK. Tras 1h de pretratamiento con el flavonoide, se añadió LPS a 1 $\mu$ g/ml durante 30 minutos. (A) Efecto LPS  $\pm$  inhibidores. (B) Efectos flavonoides. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $P < 0,05$ , frente a. Control; \*  $P < 0,05$ , frente a. LPS. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaempferol; Quer=Quercetina.

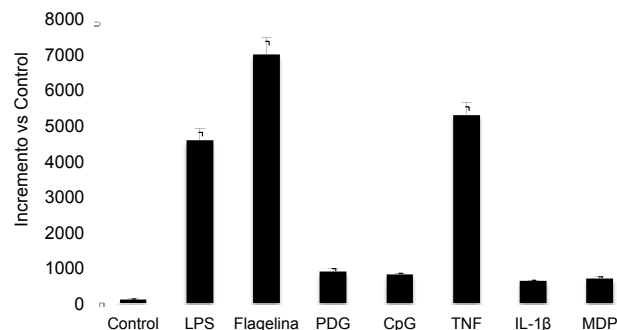
A pesar de lo anterior, ninguno de los inhibidores de MAPK afecta a la expresión de COX2 inducida por LPS (Fig. 30). De ahí que los efectos de los flavonoides en estas vías de señalización sean poco relevantes en la modulación de COX2, aunque puedan afectar lógicamente a otras dianas del LPS. Más sorprendente aún es la constatación de que, lejos de inhibir la inducción de COX2 por LPS, el bloqueante de la vía NF- $\kappa$ B Bay11-7082 potencia de forma consistente (fue detectado en tres ocasiones diferentes) el incremento de expresión de COX2 (Fig. 30).



**Figura 30:** Efecto de los inhibidores de NF-κB y MAPK quinasas sobre la expresión de COX2 medido por Western blot. Los valores han sido referidos a la expresión de β-actina. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. LPS=Lipopolisacárido.

### 2.1.2. Acciones moduladoras de los flavonoides sobre la activación de PRRs, IL-1R y TNFR en enterocitos

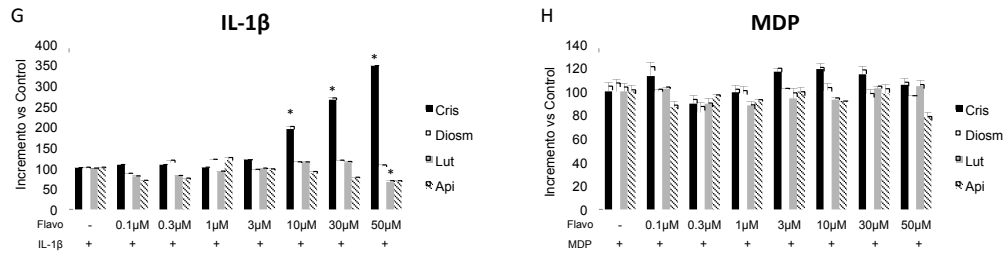
En una segunda aproximación, al efecto de los flavonoides sobre COX2 y NF-κB, sumamos el estudio de su capacidad de modulación de la secreción de las citoquinas quimioatrayentes MCP-1 y GRO-α, tanto en condiciones basales como tras la estimulación de las IEC18 con un amplio grupo de factores proinflamatorios (Fig. 31). Para ello, se expusieron las IEC18 a una curva de concentración de las diferentes agliconas (desde 0,1 a 50 μM) durante 24 horas (condiciones basales) o durante 1 hora de pretratamiento, tras el cual se aplicaron los diferentes estímulos durante 24 horas. Las IECs secretan MCP-1 y GRO-α tras la estimulación de varios tipos de receptores, incluyendo receptores asociados a patrones moleculares de patógenos y receptores de citoquinas como TNFR o IL-1R. Estos receptores, ubicados la mayoría en la superficie celular, pero en algún caso también a nivel intracelular, reconocen ligandos como LPS, flagelina, peptidoglicano (PDG), CpG (cytosine phosphate guanine), TNF-α, IL-1β, o muralmildipéptido (MDP), todos ellos usados en nuestro estudio. Estos factores se unen a TLR4, TLR5, TLR2, TLR9, TNFR, IL1R y NOD2, respectivamente. La secreción de MCP-1 y GRO-α fue medida por ELISA. Con el fin de facilitar el estudio, se muestran los resultados de la secreción de MCP-1 por subtipos de flavonoides, habiéndose obtenido resultados muy similares en GRO-α (de la cual se muestran únicamente los resultados en basal, Fig. 42).



**Figura 31:** Secreción de MCP-1 medido por ELISA en IEC18 a nivel basal. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a Control; \* P<0,05, frente a Estímulo. Control=10050.6 pg/ml; LPS=458667.4 pg/ml; Flagelina=701218.3 pg/ml; PDG=88424.9pg/ml; CpG=80063 pg/ml; TNF=530860.3 pg/ml; IL-1β=62573.9 pg/ml; MDP=69828.6 pg/ml; LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido.

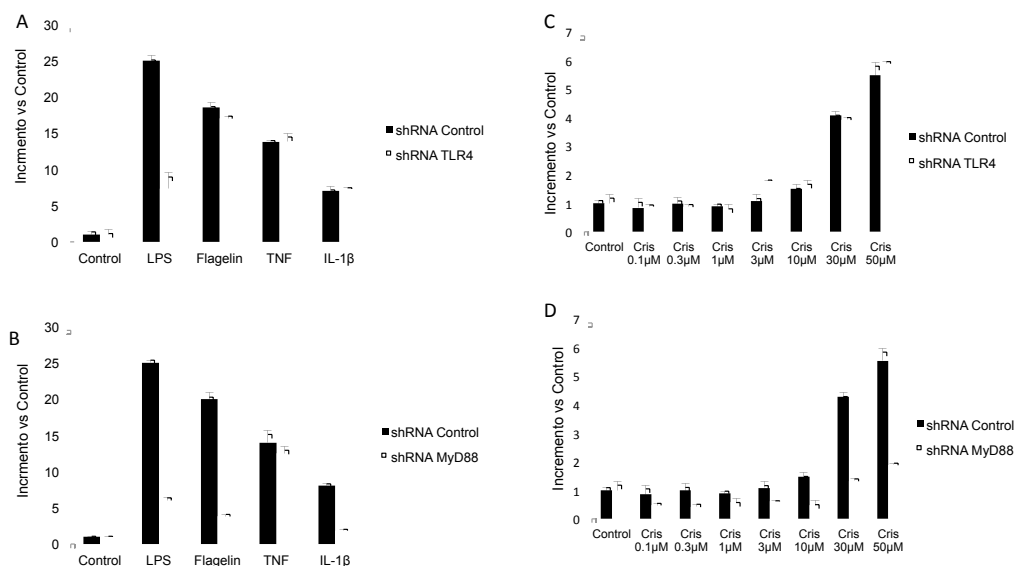






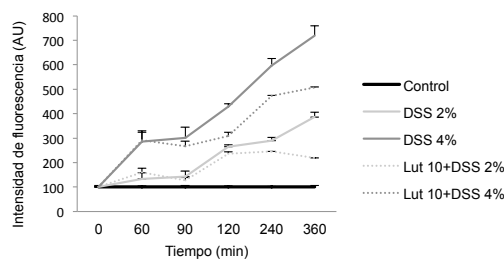
**Figura 32:** Efecto de las flavonas sobre IEC18 medido por ELISA. (A) A nivel basal (B) Bajo estimulación lipopolisacárido (C) Bajo estimulación Flagelina (D) Bajo estimulación Peptidoglicano (E) Bajo estimulación CpG (F) Bajo estimulación TNF- $\alpha$  (G) Bajo estimulación IL-1 $\beta$  (H) Bajo estimulación Muramildipéptido. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estimulo. LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido; Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina.

Con el fin de dilucidar la vía implicada en la estimulación basal de MCP-1 y GRO- $\alpha$  por las flavonas, se escogió la crisina como flavona representativa y se expuso 24 horas a células IEC18 silenciadas de forma estable frente a la expresión de MyD88 o TLR4. MyD88 actúa como molécula adaptadora en la vía de transducción de señal de la mayoría de los receptores de nuestro estudio. Tras comprobar que el silenciamiento se había producido correctamente en ambos casos (Fig. 33A-B), observamos que el efecto estimulador de la flavona se pierde en ausencia de MyD88, pero no de TLR4, es decir, se trata de un efecto MyD88 dependiente (Fig. 33C-D). Este hecho es coherente con la potenciación de los estímulos MyD88 dependientes peptidoglicano, CpG e IL-1 $\beta$  (Figs. 32D-E-G). En contrapartida, el carácter inhibitorio del resto de flavonas señalado anteriormente, se produce tras la inducción de las IEC18 por todos los factores proinflamatorios, exceptuando TNF- $\alpha$  y muramildipéptido, los únicos no dependientes de MyD88 (Fig. 33). Destaca en este sentido la luteolina, por inhibir significativamente la secreción producida por la mayoría de los estímulos.

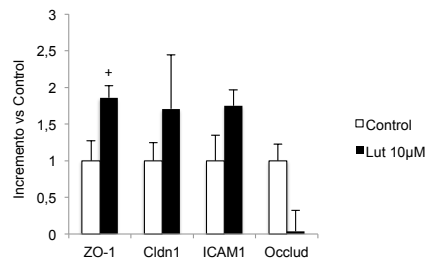


**Figura 33:** Efecto de la crisina sobre IEC18 silenciadas medido por ELISA. (A) Control de silenciamiento específico para TLR4 (B) Control de silenciamiento específico para MyD88 (C) Efecto crisina sobre IEC18 silenciadas para TLR4 (D) Efecto crisina sobre IEC18 silenciadas para MyD88. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $P < 0,05$ , frente a. Control; \*  $P < 0,05$ , frente a. Estimulo. LPS=Lipopolisacárido; Flagelin=Flagelina; Cris=Crisina;

Quisimos corroborar este efecto de la luteolina, diosmetina y apigenina a nivel del epitelio mediante un estudio de permeabilidad epitelial *in vitro* con FITC-dextrano. Para ello se expuso la monocapa de IEC18 a DSS, tras lo cual se añadió luteolina como flavona representativa a 30  $\mu$ M. La menor capacidad del FITC-dextrano para atravesar la monocapa demuestra la capacidad de la flavona para reducir el daño epitelial ocasionado por el DSS (Fig. 34). También se midió la modulación en la expresión de genes involucrados en las uniones estrechas por RT-PCR, tales como ZO-1, claudina 1, ICAM-1 y ocludina. Para ello se expuso la flavona a una monocapa de IEC18, y tras 24 horas, pudimos constatar cómo la luteolina (10  $\mu$ M) tiende a incrementar la expresión de la mayoría de estos genes (Fig. 35).



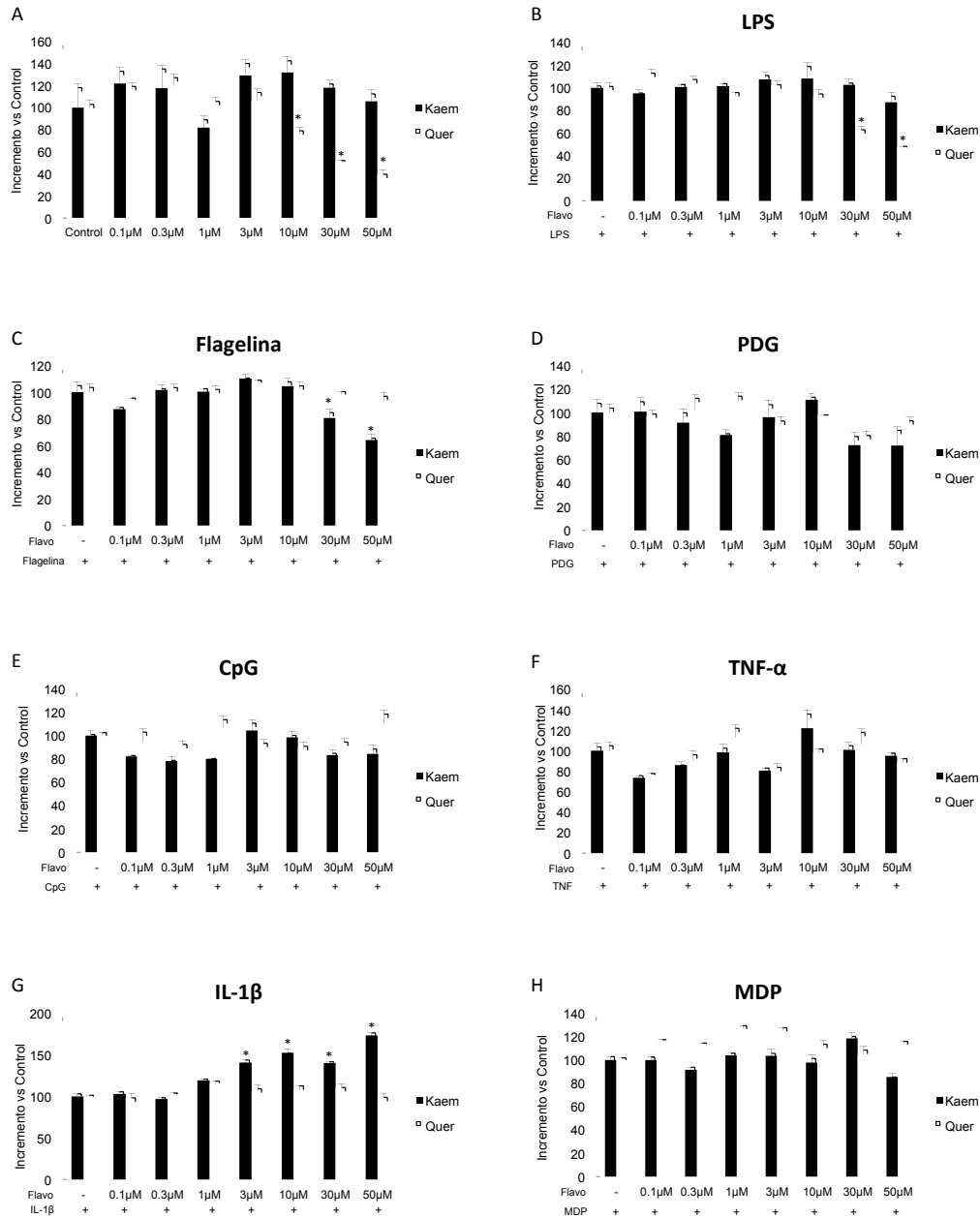
**Figura 34:** Efecto de la luteolina sobre el daño epitelial inducido por DSS (2% y 4%) *in vitro* medido por permeabilidad a FITC-Dextrano. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Lut=Luteolina.



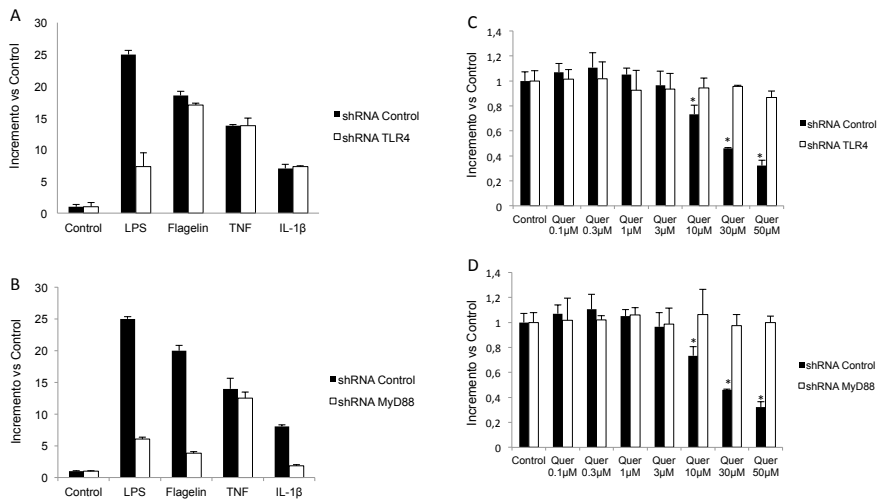
**Figura 35:** Expresión génica en IEC18 medida por PCR a tiempo real. El "fold change" se calculó refiriendo el incremento de Ct al grupo Control. Los datos se expresan media  $\pm$  SEM. + $P < 0,05$ , frente a. Control. Lut=Luteolina.

Por otra parte, los flavonoles presentan un perfil sustancialmente distinto del de las flavonas. La quercetina inhibe la secreción de MCP-1 desde 10  $\mu$ M, alcanzando un máximo de inhibición del 61% a 50 $\mu$ M ( $p < 0.05$ , Fig. 36A). Tras la estimulación de las IEC18 por los diferentes agentes proinflamatorios, la quercetina inhibe específicamente la secreción de citoquinas estimulada por LPS (inhibición del 53% a 50 $\mu$ M, Fig. 36B), sin modificar en absoluto el efecto de los demás ligandos. Este efecto tan específico sugiere una implicación de la vía de transducción dependiente del receptor TLR4. Para corroborar esta hipótesis, tratamos células IEC18 silenciadas genéticamente frente a TLR4 o MyD88 con quercetina, y en ambos casos desaparece por completo el efecto inhibitor de la misma (Fig. 37C-D). Por tanto nuestros resultados apuntan globalmente a un efecto específico de la quercetina sobre TLR o su vía de transducción de señal. Por su parte, el kaempferol muestra también efectos específicos, pero diferentes a los de la quercetina; concretamente, este flavonol presenta cierta tendencia

inhibidora tras la estimulación por flagelina y, por el contrario, un aumento en la secreción producida por IL-1 $\beta$  (Figs. 36C-G), sin afectar la secreción basal de citoquinas.

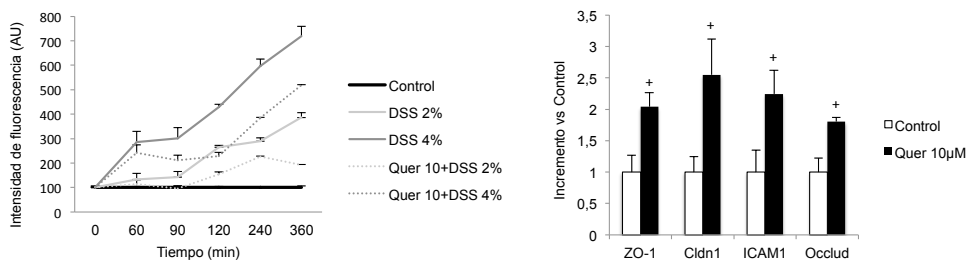


**Figura 36:** Efecto de los flavonoles sobre IEC18 medido por ELISA. (A) A nivel basal (B) Bajo estimulación lipopolisacárido (C) Bajo estimulación Flagelina (D) Bajo estimulación Peptidoglicano (E) Bajo estimulación CpG (F) Bajo estimulación TNF- $\alpha$  (G) Bajo estimulación IL-1 $\beta$  (H) Bajo estimulación Muramildipéptido. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido; Kaem=Kaempferol; Quer=Quercetina.



**Figura 37:** Efecto de la quercetina sobre IEC18 silenciadas medido por ELISA. (A) Control de silenciamiento específico para TLR4 (B) Control de silenciamiento específico para MyD88 (C) Efecto quercetina sobre IEC18 silenciadas para TLR4 (D) Efecto quercetina sobre IEC18 silenciadas para MyD88. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $P < 0,05$ , frente a. Control; \*  $P < 0,05$ , frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; Flagelin=Flagelina; Quer=Quercetina;

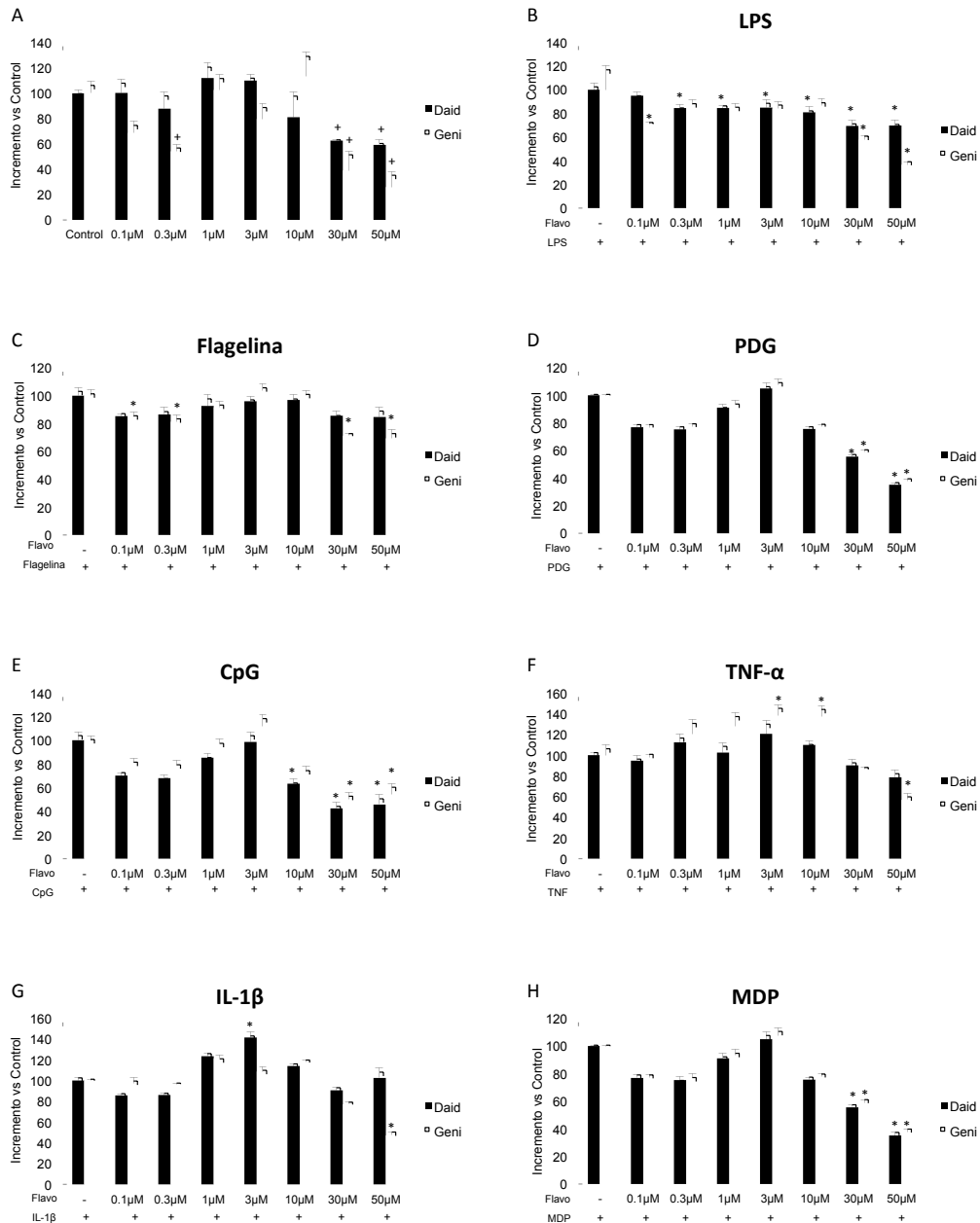
Al igual que en el caso de las flavonas, con el fin de corroborar un efecto de la quercetina sobre el epitelio intestinal, se realizó un estudio de permeabilidad *in vitro* con FITC-dextrano, en el que esta vez tras una exposición de la monocapa de IEC18 a DSS, se añadió quercetina a 30  $\mu$ M. En estas condiciones la quercetina disminuye el daño epitelial provocado por el DSS, añadido en dos concentraciones distintas (Fig. 38). El análisis por RT-PCR revela que la exposición a quercetina (10  $\mu$ M) durante 24 horas aumenta la expresión de genes involucrados en las uniones estrechas en células IEC18, de forma significativa en todos los casos (Fig. 39).



**Figura 38:** Efecto de la quercetina sobre el daño epitelial inducido por DSS (2% y 4%) *in vitro* medido por permeabilidad a FITC-Dextrano. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Quer=Quercetina.

**Figura 39:** Expresión génica en IEC18 medida por PCR a tiempo real. El "fold change" se calculó refiriendo el incremento de Ct al grupo Control. Los datos se expresan media  $\pm$  SEM. +  $P < 0,05$ , frente a. Control. Quer=Quercetina.

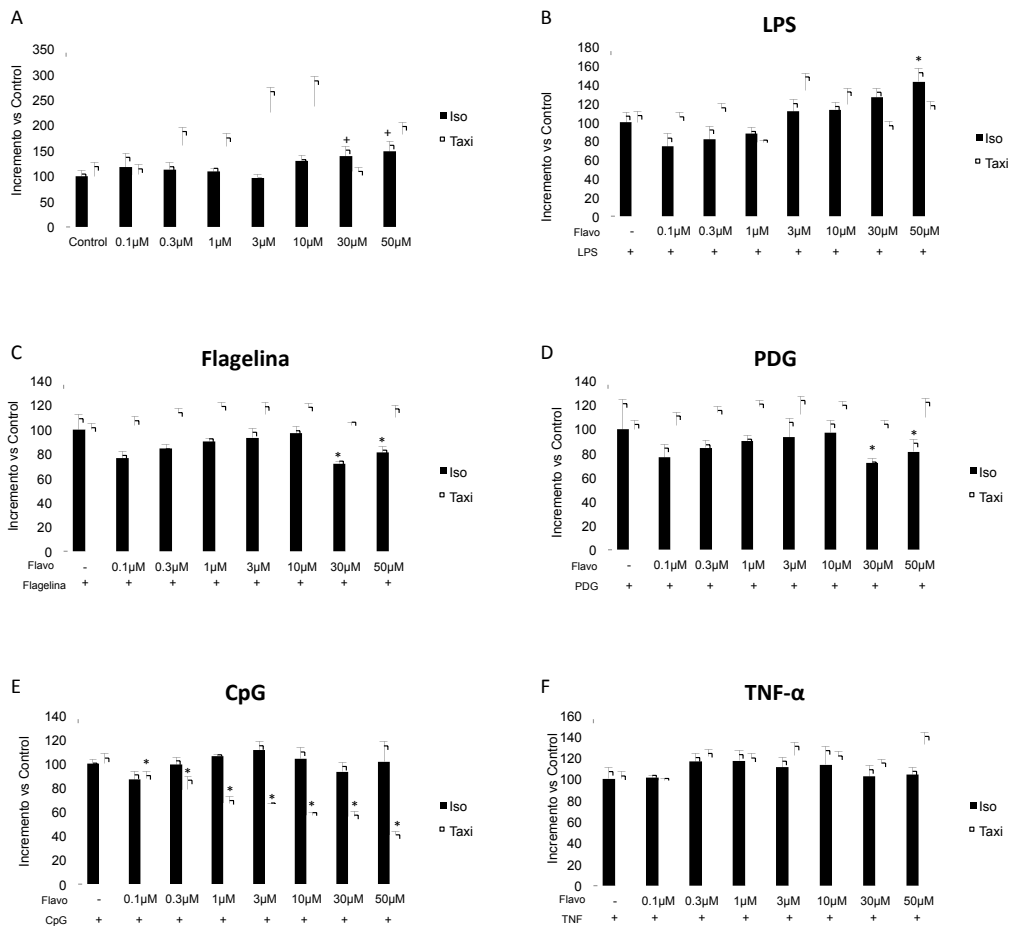
En el caso de las isoflavonas, se puede apreciar un efecto bastante similar tanto a nivel basal como bajo cualquiera de los estímulos ensayados, indicando un posible efecto no específico de esta familia de flavonoides sobre las células IEC18. De forma general, se observa un efecto inhibitorio, más destacado en el caso de la genisteína (Fig. 40).

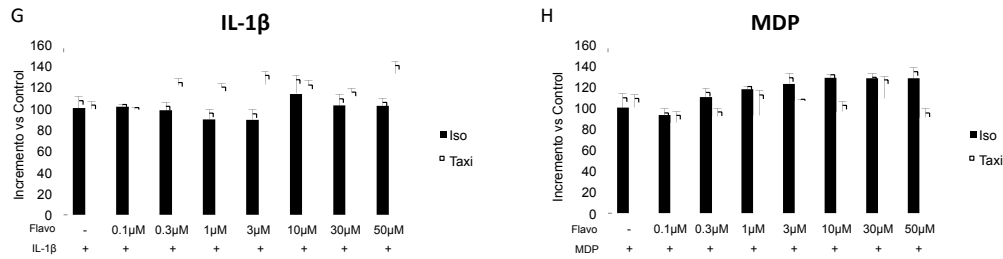


**Figura 40:** Efecto de las isoflavonas sobre IEC18 medido por ELISA. (A) A nivel basal (B) Bajo estimulación lipopolisacárido (C) Bajo estimulación Flagelina (D) Bajo estimulación Peptidoglicano (E) Bajo estimulación CpG (F) Bajo estimulación TNF- $\alpha$  (G) Bajo estimulación IL-1 $\beta$  (H) Bajo estimulación Muramildipéptido. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P < 0,05, frente a. Control; \* P < 0,05, frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína.

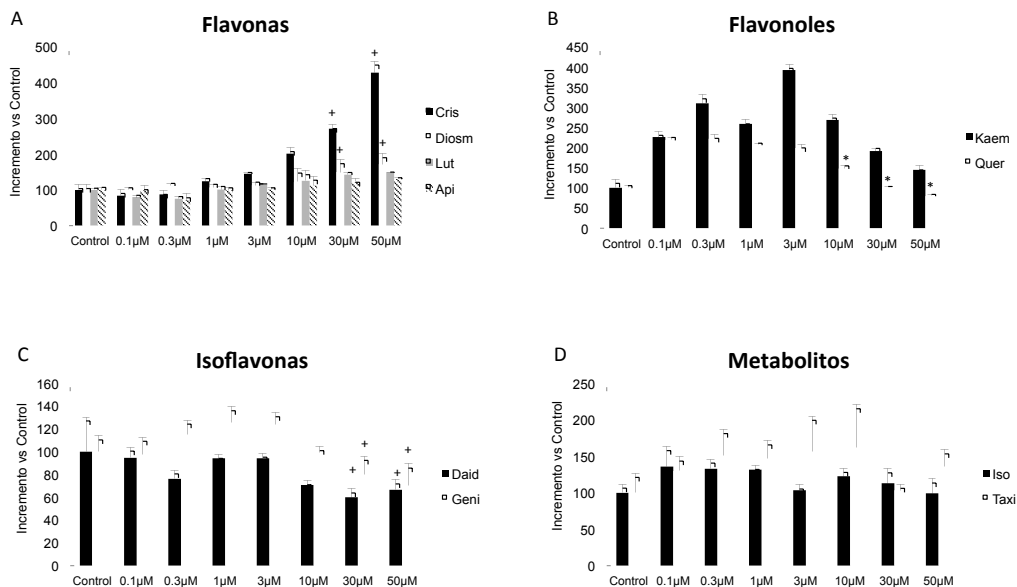
No se observa ningún efecto de las flavanonas sobre la secreción de MCP-1 o GRO- $\alpha$  (datos no mostrados).

Finalmente, cabe destacar la modulación producida por determinados metabolitos de la quercetina, concretamente la isoramnetina y la taxifolina. Debido al efecto protector de la rutina observado *in vivo*, y a la posibilidad de que tal efecto sea debido a la capacidad del glucósido a actuar como profármaco de la quercetina, nos planteamos en qué medida sus metabolitos pueden cooperar en el efecto antiinflamatorio observado. A este respecto, el efecto más destacado fue la inhibición por la taxifolina del efecto prosecretor de CpG (~60%, Fig. 41E). Este dato no deja de ser importante, ya que el receptor de CpG, TLR9, tiene una localización intracitoplasmática, a diferencia de otros TLR. Por su parte, la isoramnetina muestra efectos no destacables, que se resumen en cierta tendencia inhibitoria frente a la estimulación por flagelina o peptidoglicano (Fig. 41C-D).





**Figura 41:** Efecto de metabolitos de la quercetina sobre IEC18 medido por ELISA. (A) A nivel basal (B) Bajo estimulación lipopolisacárido (C) Bajo estimulación Flagelina (D) Bajo estimulación Peptidoglicano (E) Bajo estimulación CpG (F) Bajo estimulación TNF- $\alpha$  (G) Bajo estimulación IL-1 $\beta$  (H) Bajo estimulación Muramidipéptido. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramidipéptido; Iso=Isoramnetina; Taxi=Taxifolina.



**Figura 42:** Secreción de GRO- $\alpha$  medido por ELISA en IEC18 a nivel basal. (A) Flavonas (B) Flavonoles (C) Isoflavonas (D) Metabolitos. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Kaem=Kaempferol; Quer=Quercetina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Iso=Isoramnetina; Taxi=Taxifolina.

## 2.2. Efecto de la quercetina y rutina sobre linfocitos T

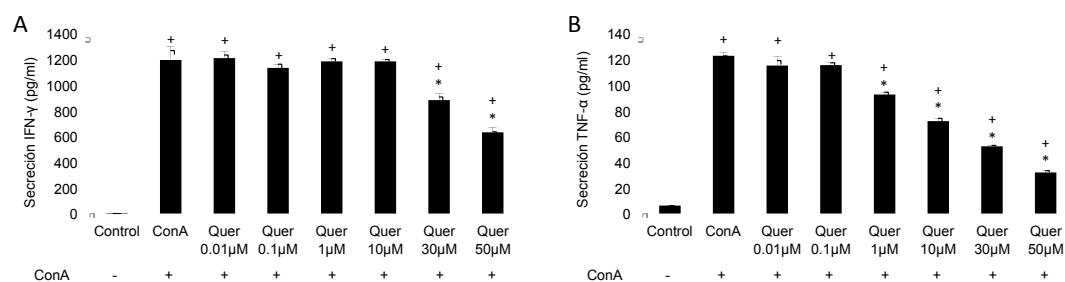
### 2.2.1. Acciones moduladoras de la quercetina y rutina sobre linfocitos T y Th1

Los estudios realizados sobre linfocitos T tienen como base una serie de experimentos realizados sobre células mononucleares, concretamente esplenocitos, por nuestro grupo de investigación (677). Este estudio previo demuestra que los flavonoides tienen efectos

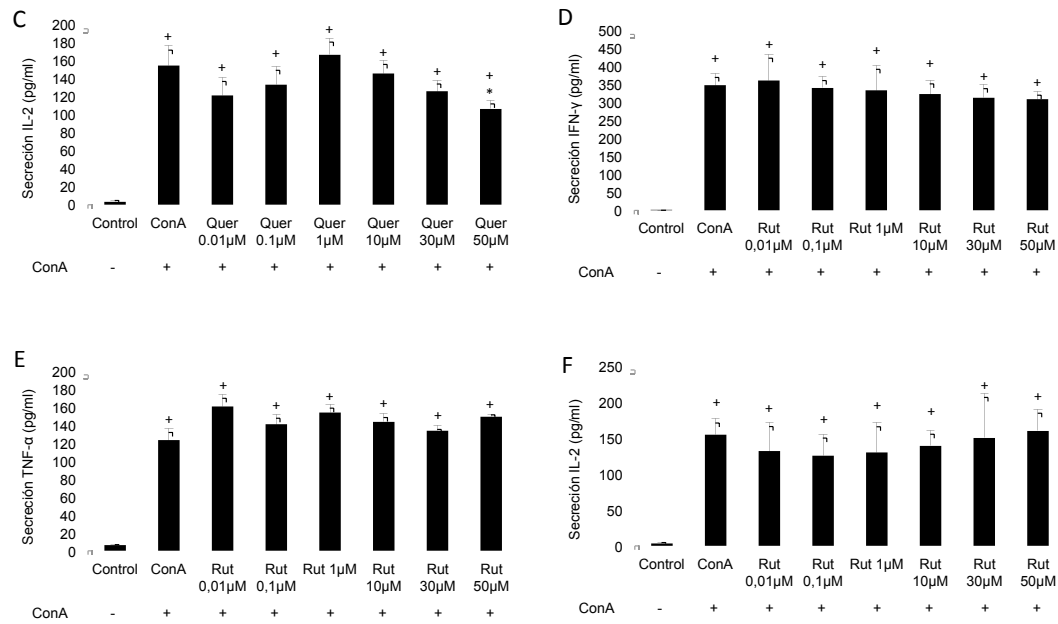
importantes sobre los esplenocitos, los cuales dependen de sus características estructurales. En aquel estudio los flavonoides fueron estudiados a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Diversos trabajos realizados en distintos tipos celulares han puesto de manifiesto que el efecto de los flavonoides es más pronunciado en células estimuladas que en condiciones basales (173). Nuestros resultados obtenidos en esplenocitos mostraron esta misma tendencia, de forma que los flavonoides seleccionados no alteran los niveles de COX2 o iNOS, o la liberación de citoquinas, en células quiescentes. Sin embargo, bajo estimulación con Concanavalina A, los flavonoides quercetina, luteolina, apigenina, diosmetina y genisteína muestran una disminución de la expresión de iNOS y un bloqueo total de la secreción de citoquinas. Los efectos antisecretores se asocian con la existencia de acciones citotóxicas/proapoptóticas, que son especialmente determinantes en estas células porque la liberación de citoquinas es parcialmente dependiente de una fuerte respuesta proliferativa. Todos los flavonoides del estudio suprimen considerablemente la proliferación de los esplenocitos dependiente de ConA, e incluso en condiciones basales.

Considerando, en primer lugar, que la Concanavalina A es un estímulo mitogénico de linfocitos T y en segundo lugar, que ésta es la población mayoritaria en el conjunto de esplenocitos, es plausible que el efecto de los flavonoides sobre esta población se deba al menos en parte a una acción sobre los linfocitos T. De ahí nuestro interés en examinar los efectos del flavonoide quercetina y su glucósido en este tipo celular. A tenor del carácter proapoptótico/citotóxico y antiproliferativo de la quercetina sobre esplenocitos a 50  $\mu\text{M}$ , el estudio sobre linfocitos se realizó en rangos de concentraciones subtóxicas.

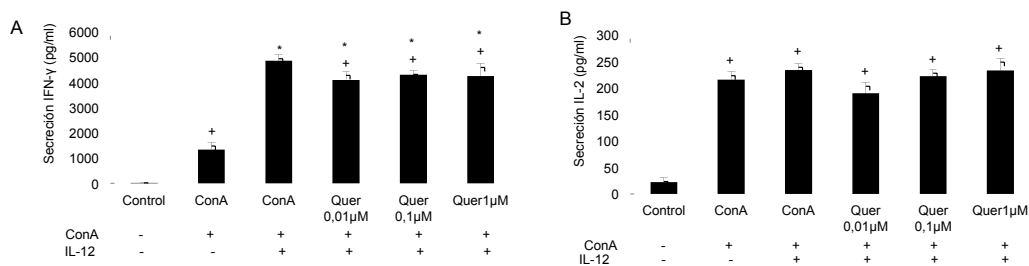
Por tanto, obtuvimos linfocitos T primarios aislados de bazo de rata mediante separación inmunomagnética. La Fig. 43 muestra la ausencia de efecto de ambos flavonoides a concentraciones subtóxicas sobre la secreción de IFN $\gamma$  e IL-2. Por el contrario, sí se observa una inhibición débil de la producción de TNF $\alpha$  por la aglicona. Tampoco se aprecia ningún efecto de la quercetina a bajas concentraciones en la secreción de IFN $\gamma$  e IL-2 en condiciones que favorecen la polarización a Th1 (Fig. 44). La rutina también resulta ineficaz en este sentido (Dato no mostrado). Asimismo, no se detecta efecto alguno de la quercetina en estas condiciones sobre la proliferación linfocitaria basal o estimulada con concanavalina A, aunque sí de la rutina (Fig. 45). Este resultado encaja con la ausencia de inhibición de la quercetina sobre IL-2 observada previamente (Figs. 43C y 44B).



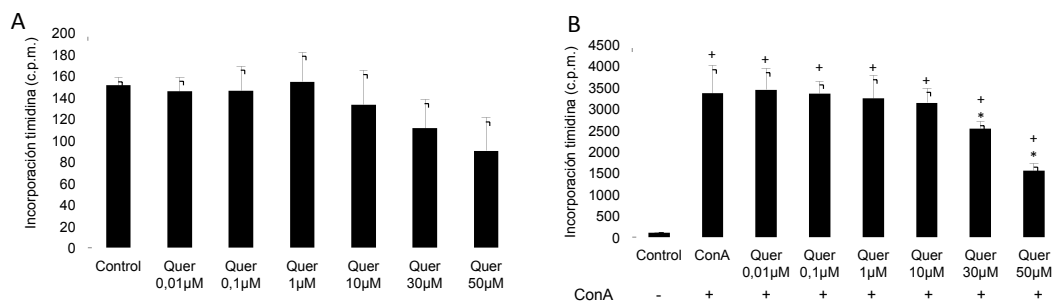


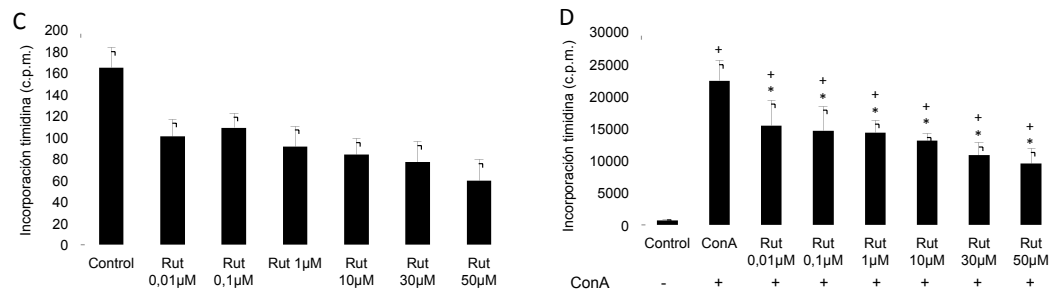


**Figura 43:** Efecto de la quercetina y rutina (0.01μM a 1μM) sobre la secreción de citoquinas por linfocitos T aislados medida por ELISA. (A) Secreción de IFNγ (B) Secreción de TNF-α (C) Secreción de IL-2. Los datos se expresan como media ± SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*P<0,05, frente a. ConA; ConA=Concanavalina A; Quer=Quercetina; Rut=Rutina.



**Figura 44:** Efecto de la quercetina (0.01μM a 1μM) sobre la secreción de citoquinas por linfocitos Th1 aislados y diferenciados con IL-12, medida por ELISA (A) Secreción de IFNγ (B) Secreción de IL-2. Los datos se expresan como media ± SEM. +P<0,05, frente a. ConA; \*P<0,05, frente a. IL-12; ConA=Concanavalina A; Quer=Quercetina

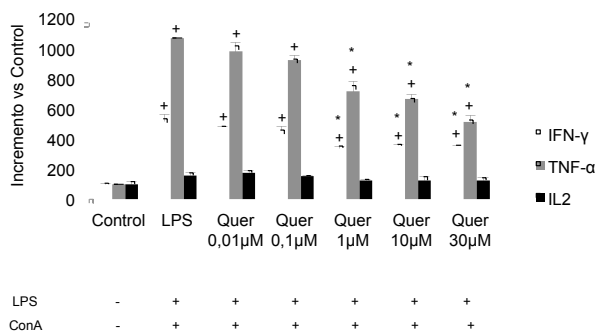




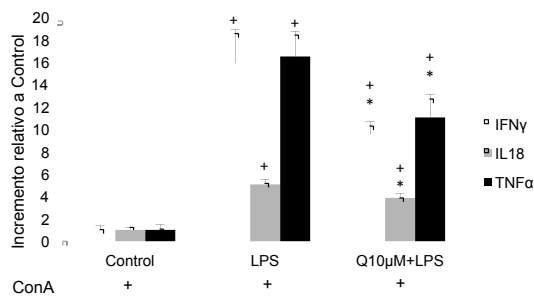
**Figura 45:** Efecto de la quercetina y rutina (0.01µM a 50µM) sobre la proliferación linfocitaria, medida por captación de timidina-[H<sup>3</sup>] (A) En condiciones basales (B) Bajo estimulación con ConA. Los datos se expresan como media ± SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*P<0,05, frente a. ConA; ConA=Concanavalina A; Quer=Quercetina; Rut=Rutina.

### 2.2.2. Acciones moduladoras de la quercetina y rutina en un sistema cocultivo enterocitos-linfocitos T

La ausencia de efecto inmunomodulador de la quercetina sobre los linfocitos T nos llevó a plantear la hipótesis de una acción inmunomoduladora indirecta por parte del flavonoide, concretamente a través del epitelio intestinal, que constituye la diana farmacológica más inmediata de estos compuestos, al menos por vía oral. Para verificar esta hipótesis utilizamos un modelo de cocultivo de epitelio intestinal (monocapas confluentes de células IEC18 cultivadas sobre filtros tipo Transwell®) y células T primarias de rata situadas en cámara basolateral. Para ello, la monocapa fue generada en primera instancia y su integridad comprobada por medida de la resistencia transepitelial (TEER; datos no mostrado), y posteriormente se añadió el flavonoide en su cara apical durante 1 hora (0.01 µM a 30 µM), con o sin LPS, y linfocitos T estimulados con concanavalina A en el dominio basolateral. En estas condiciones, y tras 72 horas de exposición, la quercetina inhibe significativamente desde 1 µM la liberación basolateral de TNF-α e IFNγ por los linfocitos T (Fig. 46). El efecto es específico para estas dos citoquinas, ya que la secreción de IL-2 no se ve afectada. Se obtienen datos similares cuando se mide la expresión de TNF-α, IFNγ e IL-18 por RT-PCR en los linfocitos basolaterales (Fig. 47), demostrando un efecto de la quercetina sobre linfocitos T a nivel transcripcional.

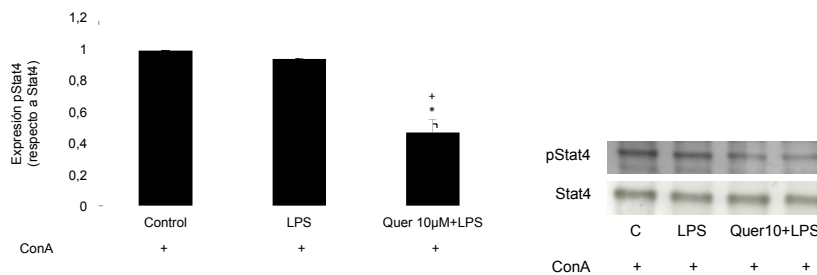


**Figura 46:** Secreción de citoquinas en cocultivo (Transwell®) enterocito-linfocito T. Los datos muestran la secreción por parte de los linfocitos T dispuestos en el compartimento inferior y estimulados con Con A. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina.



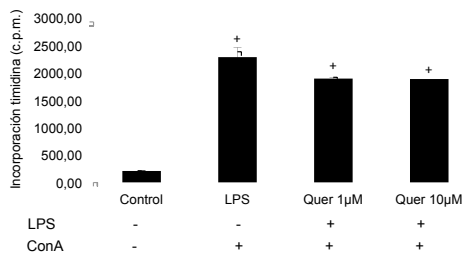
**Figura 47:** Expresión génica en linfocitos T dispuestos en cocultivo (Transwell®) enterocito-linfocito T, medida por PCR a tiempo real. El "fold change" se calculó refiriendo el incremento de Ct al grupo LPS. Los datos se expresan media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a LPS. Quer=Quercetina.

Debido a que la presencia de quercetina en el lado apical promueve una disminución significativa de los niveles de IFN $\gamma$ , nos planteamos si en este sistema de cocultivo la aglicona sería capaz de reducir la respuesta Th-1, midiendo específicamente la fosforilación de Stat4, en relación a la cantidad total de Stat4. Tanto Stat4 como pStat4 fueron examinados en los linfocitos T de la cara basolateral por Western Blot. Efectivamente, la fosforilación de Stat4 se ve reducida tras 15 minutos de exposición con quercetina, mientras que ningún cambio se detecta en la expresión de Stat4 (Fig. 48). Los niveles de IL12p70 no se ven afectados (datos no mostrados).

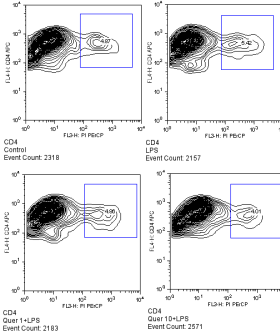


**Figura 48:** Expresión de pStat4 en células linfocitos T cultivados basolateralmente en sistema cocultivo, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de Stat4. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina

Para comprobar la actividad citotóxica/antiproliferativa de la quercetina sobre linfocitos T en el sistema de cocultivo, se realizó un ensayo de proliferación por incorporación de timidina-[H<sup>3</sup>] así como un ensayo de fluorescencia de yoduro de propidio. Tras 72 horas de contacto de la aglicona (1 y 10  $\mu$ M) con IEC18 estimuladas con LPS, se recogieron los linfocitos basolaterales estimulados con ConA. No se observa apoptosis de linfocitos T basolaterales bajo la acción de la quercetina (Fig.49) aunque sí cierta tendencia a la reducción de la proliferación, no significativa (17.2%; Fig. 50). Por tanto, la modulación indirecta de la producción de IFN $\gamma$  por la quercetina no parece ser achacable a una acción citotóxica/antiproliferativa. Esto encaja con la ausencia de efecto en la modificación de los niveles de IL-2 en linfocitos basolaterales (Fig. 47).

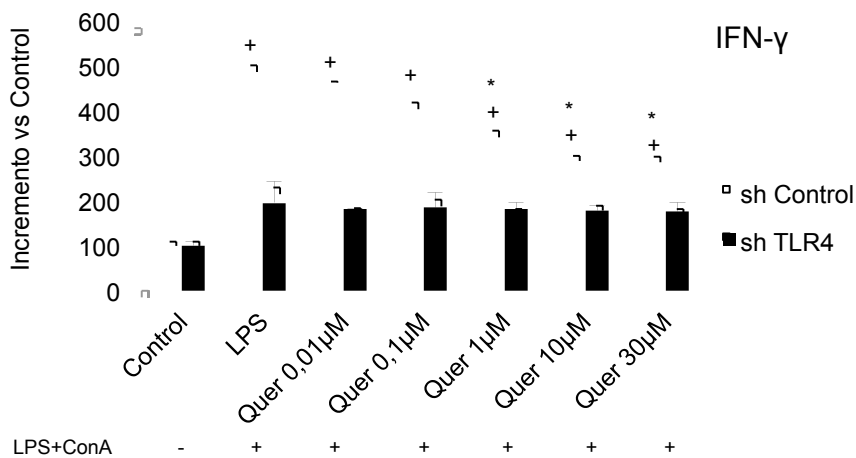


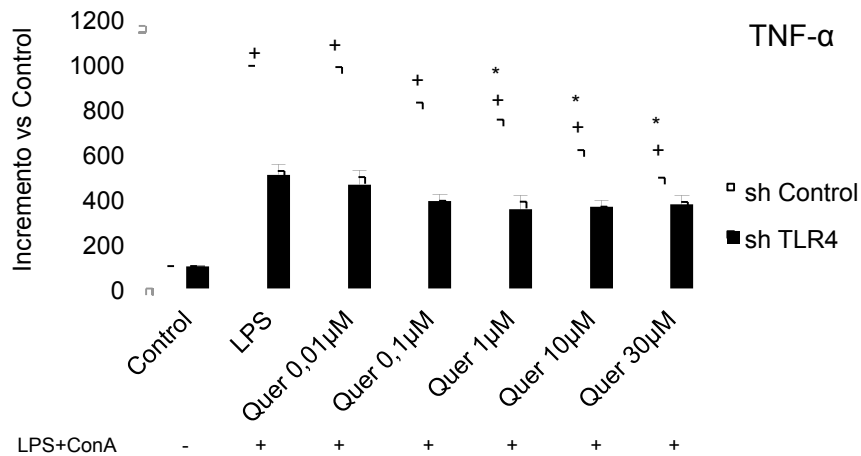
**Figura 49:** Efecto de la quercetina (0.01µM a 1µM) sobre la proliferación de linfocitos basolaterales dispuestos en sistema cocultivo, medida por captación de timidina-[<sup>3</sup>H] (A) En condiciones basales (B) Bajo estimulación con ConA. Los datos se expresan como media ± SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*P<0,05, frente a. LPS; ConA=Concanavalina A; LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina



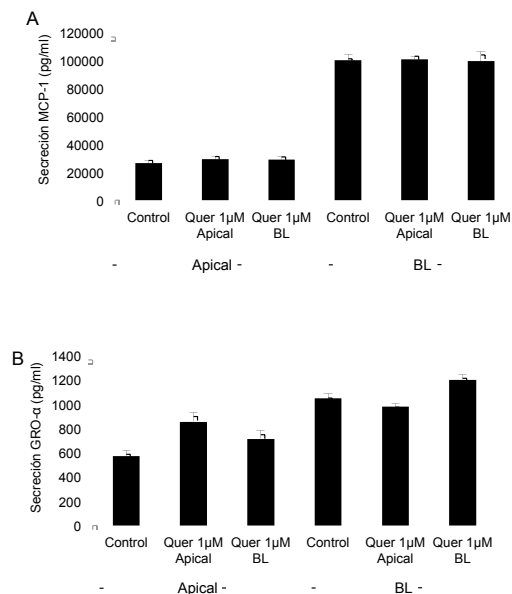
**Figura 50:** Efecto de la quercetina (1 y 10µM) sobre la apoptosis de linfocitos basolaterales dispuestos en sistema cocultivo, medida por el ensayo de yoduro de propidio por FACs; Q=Quercetina.

Nuestro siguiente paso fue examinar la naturaleza de la regulación indirecta de los linfocitos T por la quercetina. Dado que el cocultivo no permite el contacto directo entre la monocapa y los linfocitos, la modulación debe ser de carácter paracrino. Efectivamente, el efecto requiere de la interacción de quercetina con IEC18 y además de forma TLR4-dependiente, ya que en ausencia de la expresión del receptor se inhiben las acciones moduladoras de la aglicona sobre linfocitos T (Fig. 51). Se ha descrito que la quercetina, como aglicona, es capaz de entrar en las células epiteliales eficientemente y ser transportada hacia la cara basolateral, principalmente en forma de metabolitos conjugados, aunque también es parcialmente excretada por la cara apical, pero en mucha menor medida (40). La Fig. 52 recoge los datos de secreción de MCP-1 y GRO-α en los polos apical y basolateral de monocapas de células IEC18 tratadas con 1 µM de quercetina en una u otra cara. Puede observarse que la secreción de citoquinas está polarizada, con predominio de la liberación basolateral. No se aprecia ningún efecto de la quercetina a este nivel.





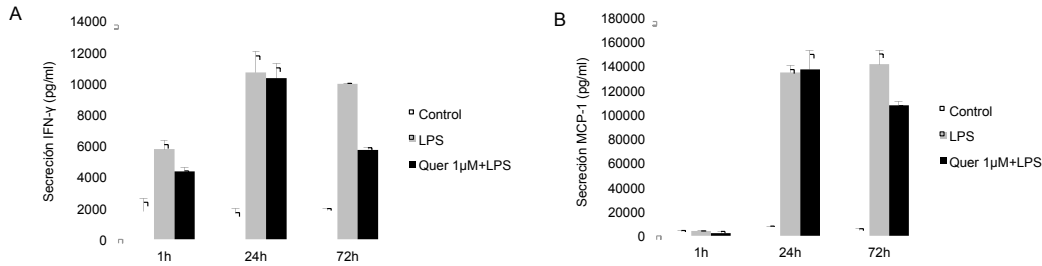
**Figura 51:** Secreción de citoquinas en cocultivo (Transwell®) IEC18 silenciadas para TLR4-linfocito T. Los datos muestran la secreción por parte de los linfocitos T dispuestos en el compartimento inferior y estimulados con Con A. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina.



**Figura 52:** Secreción apical y basolateral de MCP-1 (A) y GRO- $\alpha$  (B) por IEC18 expuestas a quercetina en la cara apical o basolateral, medida por ELISA. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Quer=Quercetina; BL=Basolateral.

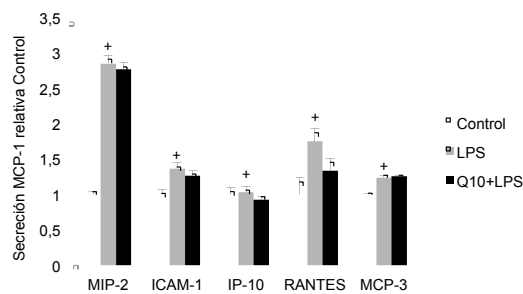
Confirmada la polaridad de las IEC18, nos adentramos en la afectación del sistema cocultivo. Tras 72 horas de contacto de la aglicona con la monocapa de IEC18 estimulada con LPS, el medio basolateral (sin linfocitos T) fue recogido y se añadió directamente a una población de linfocitos T aislada. Bajo estas condiciones, efectivamente se observa una disminución en la secreción de IFN $\gamma$  por parte de los linfocitos T (Fig. 53A). Simultáneamente se detecta una disminución de MCP-1 en el medio basolateral (sin linfocitos T), sugiriendo que esta citoquina en estas circunstancias podría estar relacionada con el efecto sobre los linfocitos (Fig. 53B). Resulta importante destacar dos matices: en primer lugar, no se detecta inhibición de MCP-1 en respuesta a quercetina (1  $\mu$ M) cuando ésta se ensaya en monocapas estándar, es decir, cultivadas sobre placas en vez de sobre sistemas Transwell®, lo que sugiere

que la polarización, siquiera parcial, de las células puede tener relevancia en este sentido. En segundo lugar, estos resultados son obtenidos tras una exposición de 72 horas al flavonoide (exposiciones de menos tiempo fueron realizadas sin ningún resultado), lo que sugiere que existe un período mínimo de exposición al flavonoide para que tenga lugar el efecto sobre células T.



**Figura 53:** Secreción basolateral de IFN $\gamma$  (A) y MCP-1 (B) por IEC18 expuestas a quercetina en la cara apical, medida por ELISA. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Quer=Quercetina; LPS=Lipopolisacárido.

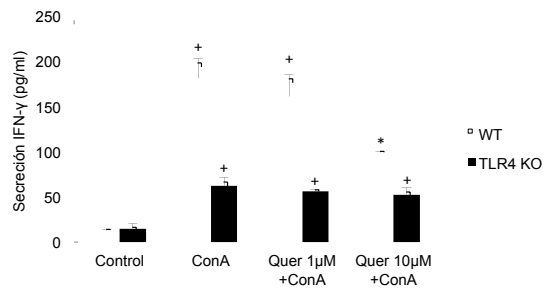
Como segunda aproximación, realizamos un inmunoensayo para la medida de una amplia variedad de quimioquinas con la intención de obtener una valoración general de los efectos del flavonoide sobre la liberación mediadores. En concreto, las muestras analizadas correspondieron a medio del dominio basolateral de monocapas de células IEC18 confluentes expuestas a quercetina (10  $\mu$ M) durante 1 hora de pretratamiento, tras la cual añadimos LPS y que fueron recogidas 72 horas después (en ausencia de linfocitos). La Fig. 54 muestra la mínima afectación en la secreción de MIP-2, ICAM-1, IP-10, RANTES y MCP-3 por la aglicona.



**Figura 54:** Secreción basolateral de IEC18 expuestas a quercetina (10 $\mu$ M) en la cara apical, medida por inmunoensayo. Valores referidos al grupo Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Q=Quercetina; LPS=Lipopolisacárido.

Con el fin de relacionar la preferencia de unión de la quercetina por el receptor TLR4 demostrada anteriormente y su posible influencia en la inhibición de la secreción de IFN $\gamma$  por parte de linfocitos subepiteliales, extraímos linfocitos T de esplenocitos de ratones WT y *knock out* para TLR4. A continuación expusimos esta población a quercetina (1 y 10  $\mu$ M) durante un pretratamiento de 1 hora, tras la cual estimulamos con ConA para forzar la secreción de IFN $\gamma$ . Tras 48 horas de contacto, la quercetina inhibe la secreción de IFN $\gamma$  en linfocitos T aislados de ratones WT, efecto que desaparece en aquellos procedentes de ratones *knock out* para TLR4

(Fig. 55).



**Figura 55:** Secreción de IFN $\gamma$  en esplenocitos extraídos de ratones WT y TLR4 KO. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina, WT=Wild type; KO=Knock out; TLR4=Toll like receptor 4.

# DISCUSIÓN



La terapia farmacológica de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal se dirige fundamentalmente a la limitación de la inflamación y de la respuesta inmunológica de forma inespecífica. Esto se debe a la caracterización insuficiente de la etiología, lo que ha impedido hasta la fecha abordar una diana farmacológica concreta. Aunque la eficacia del tratamiento antiinflamatorio en la EII está demostrada y en general asegura un manejo adecuado de la enfermedad, los fármacos utilizados producen importantes efectos adversos, casos de dependencia en el caso del uso de glucocorticoides, y casos de resistencia o pérdida de eficacia. Todos estos inconvenientes justifican la búsqueda de nuevos agentes que puedan aportar un mejor perfil farmacológico, así como un cuadro reducido de complicaciones secundarias.

Las terapias naturales, como su propio nombre indica, son aquéllas que emplean sustancias que se encuentran en mayor o menor proporción en la naturaleza y que en muchos casos se han utilizado tradicionalmente para mejorar el estado de salud. Entre las más conocidas y reconocidas desde el ámbito científico están la fitoterapia, basada en el uso de plantas medicinales, y la dietoterapia, que emplea la nutrición y suplementos vitamínicos o minerales. Aunque en muchos casos carecen de base empírica sólida, las terapias naturales gozan del beneplácito de los pacientes (y de muchos profesionales sanitarios) en la medida en que puedan constituir una alternativa, o complemento, a los tratamientos farmacológicos habituales, debido a su reducida toxicidad (asumida o demostrada) y a una idea difusa de bondad/inocuidad asociada a su origen natural. Por este motivo la Organización Mundial de la Salud la recomienda como herramienta eficaz para el tratamiento de enfermedades crónicas. Es fundamental sin embargo apoyar cualquier terapia de este tipo en ensayos científicos fiables. Por otra parte, los componentes fitoterapéuticos pueden ser aplicados de forma aislada, a modo de fármaco *convencional*. Paradójicamente, sin embargo, esta aproximación se ve obstaculizada por las mismas razones que hacen atractivo su uso, dado que se trata de compuestos no susceptibles en general de protección mediante patente, por lo que su ensayo a nivel clínico es improbable, salvo a través del patrocinio público. En cualquier caso, se hace imprescindible la caracterización de los efectos de estos agentes a nivel preclínico previamente a cualquier consideración de aplicación en el hombre.

Nuestro grupo de investigación presenta un historial de estudio de flavonoides que arranca en los años 90. Estos compuestos polifenólicos presentan un interesante potencial debido a su baja toxicidad y numerosas propiedades biológicas evidenciadas tanto *in vivo* como *in vitro*. Clásicamente han sido estudiados por sus propiedades antioxidativas/antirradicalarias y, en ese sentido, la relación estructura actividad (REA) ha sido extensamente caracterizada (663). Sin embargo, también presentan numerosas propiedades antiinflamatorias no relacionadas con este mecanismo, ampliamente estudiadas por nuestro grupo de investigación y otros durante todos estos años. A pesar de éstos estudios, aún quedan múltiples interrogantes por resolver; entre ellos, las causas de la ineficacia de la aglicona quercetina como tal *in vivo*, la relación estructura-actividad antiinflamatoria, especialmente a nivel del epitelio intestinal, y la falta de correlación entre el poderoso efecto de los flavonoides sobre linfocitos y su efecto biológico *in vivo*, el cual queda enormemente atenuado, lo que se ha achacado a una metabolización rápida y eficiente. De estos interrogantes surgen nuestros objetivos, con el fin último de explorar y en su caso facilitar su aplicación clínica.

A pesar de que existen flavonoides que como geninas presentan actividad antiinflamatoria intestinal (4-11), en el caso de la quercetina es obligada la administración en forma de heterósido (678). Por otra parte, el efecto de la quercetina podría potenciarse considerablemente, al menos en teoría, mediante la utilización de la vía parenteral, asumiendo una metabolización menos eficiente en este caso y una acción destacada como mínimo sobre linfocitos, teniendo en cuenta los datos obtenidos en esplenocitos de rata *in vitro* (677). Esta hipótesis nos lleva al primer objetivo de esta Tesis Doctoral, el estudio de la relación entre la farmacocinética de quercetina y su glucósido rutina y su efecto antiinflamatorio a nivel de intestino delgado y grueso. Los resultados obtenidos en el modelo de colitis en rata por TNBS muestran que la rutina administrada por vía oral posee efecto antiinflamatorio en el intestino grueso, mientras que su aglicona quercetina administrada por vía intraperitoneal carece de efecto reseñable. La eficacia de la rutina ya había sido puesta de manifiesto anteriormente en modelos preclínicos, pero su mecanismo de acción es esencialmente desconocido (679). Clásicamente se ha considerado que la rutina actúa como un profármaco, de forma que libera quercetina intraluminalmente en el colon, siendo ésta la responsable del efecto antiinflamatorio. Esta hipótesis está respaldada fundamentalmente por numerosos ensayos *in vitro* que la validan como biológicamente activa en este sentido, mientras que los heterósidos son casi universalmente inactivos (15). En este sentido se ha propuesto el mismo mecanismo de acción para la quercitrina, otro glucósido de la quercetina (12). Desde el punto de vista farmacocinético, la quercetina es absorbida muy eficientemente en el intestino delgado tras su administración por vía oral, previniendo de esta manera una exposición prolongada de la mucosa colónica, análogamente a lo que ocurre en el caso de la mesalamina, fármaco utilizado en el tratamiento de la EII, cuya actividad en el intestino grueso es inexistente sin medidas que prevengan su absorción prematura (29, 52, 680). Todo lo anterior sugiere, en cambio, que la quercetina puede tener efectos antiinflamatorios en el intestino delgado. Por el contrario, sorprendentemente, la quercetina administrada por vía oral resulta sustancialmente menos activa que la rutina administrada por la misma vía no sólo en colitis, sino también en ileítis. De hecho, los resultados mostrados en la presente Tesis Doctoral indican que la rutina es igual de eficaz, sino más, en la inflamación ileal que en la colónica.

El análisis farmacocinético llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral demuestra que la quercetina es efectivamente liberada por la rutina en el tracto gastrointestinal pero, a diferencia de los resultados obtenidos en otros estudios (46, 681), ésta no se acumula en cantidades significativas en la mucosa colónica. Por el contrario, cuando la quercetina como tal fue administrada oralmente sus niveles en colon fueron similares a los encontrados tras la administración de rutina, pero permanecieron elevados más tiempo en la mucosa colónica. Tal y como cabría esperar, los niveles de la aglicona en íleon fueron mucho más elevados al administrarse como aglicona que como rutina, administradas ambas por vía oral (~1000 pmol/g frente a ~250 pmol/g). Más sorprendente aún resulta el hallazgo de que incluso la administración intraperitoneal de quercetina se asocia a una exposición colónica más prolongada que tras la administración oral de rutina. Dado que la quercetina es ineficaz en la colitis experimental, tanto por vía oral (12, 13) como intraperitoneal (nuestro estudio), y es sólo parcialmente activa en la ileítis inducida por TNBS, no existe una correlación directa entre la presencia de quercetina en las mucosas de colon e íleon y su efecto antiinflamatorio.

Estudios farmacocinéticos previos se han centrado en la presencia de flavonoides en el lumen intestinal o bien en diferentes tejidos extraintestinales, pero se ha prestado poca atención a la mucosa en sí (15, 680, 682). Como se ha indicado, está ampliamente aceptado que la rutina (así como la quercitrina) libera quercetina en el lumen colónico (12, 15, 683). En ratas con TNBS, Kim et. al detectaron altos niveles (~200  $\mu\text{M}$ ) de quercetina en el lumen del colon tras 5 horas de la administración oral de rutina, pero las concentraciones del glucósido también fueron bastante elevadas (~100  $\mu\text{M}$ ) (15). En este estudio no se detectó quercetina en el intestino delgado, pero Manach et al. (1997) detectaron la llegada de quercetina en el ciego de ratas a las que se administró rutina, demostrando que la hidrólisis tiene lugar en alguna medida en el intestino delgado (681). Nuestros resultados indican que al administrar el doble de dosis de rutina que en el estudio de Kim et al. por vía oral, tanto el glucósido como la aglicona alcanzan la mucosa del íleon en proporciones similares a las 3 horas de la última administración, mientras que solo se detecta quercetina en la mucosa del intestino grueso. Aunque existe mucha controversia a este respecto, hay estudios que demuestran que tanto la rutina como la quercetina pueden ser absorbidas en el intestino delgado (39, 684). En un interesante trabajo en el que usan un modelo de perfusión en intestino delgado de rata aislado muestran que la quercetina, entre otros flavonoles y flavonas, es glucuronizada eficientemente conforme es absorbida (685), mientras que la rutina escapa de tal glucuronidación y es absorbida principalmente de forma no metabolizada (682). En pacientes ileostomizados la absorción de rutina parece ser mínima, en consonancia con la hipótesis de que la absorción requiere en buena medida la hidrólisis a quercetina (29). Estos resultados concuerdan con los nuestros obtenidos con la línea celular de enterocitos ileales de rata IEC18, donde efectivamente la rutina no sufrió metabolización durante su transporte por la monocapa celular. Por tanto, la combinación de una absorción eficiente junto con la resistencia a un metabolismo de primer paso pueden justificar una acción directa de la rutina, o preservarla para la liberación de quercetina en la mucosa o zonas proximales.

Como se ha dicho, tras la administración oral de rutina los niveles de quercetina en íleon son menores que al administrar la aglicona sola. De hecho, la cantidad es inferior a la suma de quercetina y rutina; teniendo en cuenta que la proporción de quercetina que alcanza la mucosa colónica es similar en ambos casos, cabe preguntarse dónde se encuentra la quercetina/rutina restante. Una explicación es que se produzca una mayor metabolización mucosal de la rutina pero, como hemos visto, estudios anteriores indican que de hecho la rutina es mucho más resistente a la biotransformación que la aglicona (30, 686), resultados que son corroborados por nuestro experimento en células IEC18. Una segunda explicación plausible tiene que ver con diferencias en el transporte vectorial de rutina y quercetina por el epitelio intestinal. Concretamente, el glucósido puede ser absorbido más eficientemente y/o retenido con menor eficacia en los segmentos proximales del intestino. A juzgar por los datos de niveles de quercetina en mucosa colónica, que muestran concentraciones apreciables incluso tras 7 horas de la última administración oral, esta tendencia no parece darse en el caso de la aglicona. Una vez descartada la metabolización, la menor retención de rutina por el epitelio ileal puede deberse al paso a sangre portal, o a la secreción luminal. Ahora bien, dado que la actividad antiinflamatoria de rutina/quercetina se correlaciona con la presencia del heterósido en la mucosa ileal, tanto en la colitis como en la ileítis, nuestros datos serían coherentes con dos posibles hipótesis: (1) la rutina experimentaría un ciclo enterohepático, abandonando el hígado de forma intacta (ya que las ramnosidasas hepáticas no degradan el

glucósido), secretarse y volver al lumen intestinal, que no a la mucosa colónica, (ya que la rutina no es detectada en la mucosa a tiempos más allá de las 3 horas de la última administración); o (2) la rutina sería secretada de forma directa por el propio epitelio ileal. En ambos casos la rutina llegaría al lumen colónico, liberando quercetina como fracción activa, pero con un efecto más prolongado debido a la recirculación del heterósido, a modo de *goteo*. Esta última hipótesis ha sido demostrada para otros glucósidos (32, 137) y específicamente para la rutina en esta Tesis Doctoral utilizando células IEC18 (correspondientes a íleon de rata precisamente), las cuales se caracterizan por el transporte vectorial basolateral-apical del heterósido, mientras que la quercetina no presenta polaridad y tiene una velocidad aproximadamente un 50% menor. Choudhury et al. (686) mostraron que la rutina no desaparece de la solución situada en el polo apical del colon de rata montado en cámara de Ussing, resultado que es coherente con una recirculación eficiente del heterósido una vez absorbido. Por tanto, sin excluir la posibilidad de recirculación enterohepática (44), nuestros datos indican que el efecto diferencial de rutina y quercetina *in vivo* obedece a la mayor resistencia a la metabolización de la primera, unida a su secreción apical.

Esta hipótesis también justifica el menor, pero existente, efecto antiinflamatorio presentado por la quercetina oral en el modelo de ileítis por TNBS y, a su vez, el mayor efecto de la rutina a este nivel. Si bien para observar un efecto antiinflamatorio colónico se hace necesaria la administración de un profármaco (rutina) que pueda dar lugar a una presencia prolongada en el tiempo de la aglicona en lumen colónico, a nivel de inflamación ileal parece suficiente, aun cuando menos eficaz, la administración de la aglicona directamente, ya que aunque su presencia en el lumen es relativamente corta debido a la gran eficiencia en su absorción y metabolización en el intestino delgado, ésta permite un leve efecto antiinflamatorio. Por su parte, la rutina libera quercetina también en el íleon, que ejercería el efecto antiinflamatorio observado, y que se prolongaría por las mismas razones que en la colitis. La capacidad de secreción apical de rutina justifica igualmente que el heterósido pueda ejercer efectos antiinflamatorios en el colon a través de la liberación luminal de quercetina cuando se administra por vía parenteral. La magnitud relativamente menor de dichos efectos es coherente con pérdida de una fracción de la dosis asociada a la distribución por los distintos tejidos. Además, hay que tener en cuenta que la vía parenteral evita la exposición directa inicial de la mucosa colónica a la rutina/quercetina administrada por vía oral.

Aunque no se muestran en esta Tesis Doctoral, por ser datos preliminares que aún están en procesamiento, hemos llevado a cabo análisis genómicos utilizando *microarrays* del colon de ratas colíticas tratadas con rutina. Los datos analizados hasta la fecha nos permiten indicar un posible mecanismo de acción a nivel celular. Así, hemos observado un incremento en la expresión de CCL19 en ratas colíticas tratadas con rutina. Esta quimioquina está implicada en el reclutamiento de células T vírgenes hacia las placas de Peyer intestinales. Aunque este mecanismo requiere una mayor investigación, es consistente con la observación de que los animales colíticos tratados con rutina presentan un mayor número de células en los nódulos linfáticos mesentéricos (en el caso de la ileítis el comportamiento fue diferente, probablemente debido a la cirugía). Es por tanto posible que la migración de linfocitos T potencie la defensa contra antígenos y microorganismos, reforzando la función de barrera y dando lugar a una inflamación menos pronunciada.

Los modelos preclínicos de EII son ampliamente usados para el estudio de aspectos fisiopatológicos de la enfermedad, así como para evaluar la eficacia de tratamientos experimentales *in vivo*, incluyendo por supuesto los propios flavonoides (606, 687, 688). Teniendo en cuenta que no existe un modelo de EII ideal, la mayoría de estudios publicados hasta la fecha han empleado modelos de colitis inducidos químicamente, especialmente TNBS y DSS, debido a su simplicidad y reproducibilidad, y obviamente porque comparten características con la enfermedad humana. Sin embargo, estos modelos presentan varias desventajas debido a que no son estrictamente crónicos (los animales se curan con el tiempo) y a que la inflamación no está inducida por linfocitos, como ocurre en la EII humana. Algunos autores defienden el uso de modelos de colitis inducidos por transferencia linfocitaria con el objetivo de conseguir una mejor predicción de la bioactividad humana (673). Por tanto, la validación de la eficacia antiinflamatoria intestinal de la rutina constituye el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral.

El modelo de colitis por transferencia linfocitaria se desarrolla lentamente y, una vez establecido, permanece relativamente estable durante semanas o bien ocasiona un deterioro progresivo hasta llegar a la muerte del animal, de forma espontánea o por eutanasia basada en motivos éticos. Debido a que los síntomas de la enfermedad aparecen de forma paulatina y no sincronizada entre animales, aplicamos en este caso un protocolo de postratamiento, a diferencia del modelo anterior, en el que el tratamiento con glucósido comenzó antes de la inducción de la colitis. En general, el protocolo de pretratamiento tiende a dar efectos más marcados en la colitis experimental. La dosis inicialmente utilizada de rutina fue de 28.5 mg/kg, equivalente a la dosis de 20 mg/kg que resultó efectiva en el modelo de colitis por TNBS en rata (equivalencia basada en la superficie corporal de ambos animales). En este primer experimento, el tratamiento con el glucósido dio lugar a una protección significativa en cuanto a la pérdida de peso y a una secreción de TNF- $\alpha$  reducida en ganglios mesentéricos *ex vivo*. Sin embargo, ningún otro parámetro se vio significativamente afectado, incluyendo las actividades enzimáticas colónicas MPO y AP, la relación peso/longitud del colon, el índice de daño macroscópico, etc. Por tanto, bajo estas condiciones, la rutina parece ofrecer cierta protección, pero muy alejada de los efectos sustanciales demostrados en el modelo anterior, o en otros estudios (13, 678).

Este efecto, francamente decepcionante, podía deberse a la insensibilidad a la rutina del modelo o bien a una mala elección de dosis. Con el objeto de comprobar este extremo llevamos a cabo un segundo experimento en el que la dosis aplicada se incrementó al doble: 57 mg/kg o 1.1 mg/d. Esta dosis se correspondería con una dosis diaria de 448 mg en humanos (equivalencia basada en la superficie corporal). Sin embargo, teniendo en cuenta que la rutina actúa mediante la liberación de quercetina, probablemente el tamaño del colon es un factor de ajuste más relevante que la superficie corporal. A este respecto, el colon de rata es aproximadamente dos veces más largo que el de ratón y 5 veces más pesado, mientras que el factor de superficie corporal es de 9 (empleado en nuestro experimento inicial). Esta dosis presentó un marcado efecto antiinflamatorio, por lo que el criterio del tamaño del colon parece ofrecer efectivamente una mejor correlación para el establecimiento de la dosis eficaz que el de la superficie corporal. En este sentido, cabe recordar que Nones et al. administraron una dieta suplementada con un 0.1% de rutina a ratones *knockout* para MDR1A (un modelo de colitis crónica), lo cual, asumiendo una ingesta dietética de  $\sim 3$  g/d, se correspondería con una dosis de 0.3 mg de rutina por día, es decir, casi 4 veces menos de la dosis que ha resultado

activa en nuestro estudio, y también menor que la dosis inicialmente utilizada que mostró leves efectos protectores. Por tanto, parece probable que una dosis insuficiente sea la responsable de la ausencia de efecto observada con rutina en ratones *knockout* para MDR1A (689).

Globalmente, el modelo de colitis por transferencia linfocitaria se caracteriza por una inflamación persistente pero moderada del intestino grueso, con incremento de múltiples marcadores de respuesta inmunológica/inflamatoria, diarrea, hematoquezia y pérdida de peso. El tratamiento con rutina (57 mg/kg) tiende a evitar la pérdida de peso pero sobre todo disminuye el daño colónico, con reducción del índice de daño macroscópico (incrementado en ratones colíticos debido a la presencia de adhesiones y fibrosis), efecto que quedó a las puertas de la significación estadística. Cabe destacar a este respecto que el modelo de colitis por transferencia linfocitaria es menos agresivo que los modelos inducidos químicamente. Resulta difícil encontrar algún precedente del uso de este modelo para la investigación de nuevos tratamientos, más allá de maniobras inmunológicas (664), por lo que adaptamos un índice de daño macroscópico de los ya establecidos para modelos de colitis por TNBS o DSS en rata y ratón.

Estos efectos beneficiosos iniciales fueron confirmados histológicamente y por una menor actividad MPO y AP colónica. Además, se detectó un efecto prominente sobre diversos parámetros inflamatorios a nivel de la mucosa colónica, incluyendo GRO- $\alpha$  (CXCL1), COX2, S100A8, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , REG3 $\gamma$  y MMP3. También se observó una acción extraintestinal de la rutina, concretamente a nivel de la producción de citoquinas por células de ganglios mesentéricos *ex vivo* y de los niveles plasmáticos de IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Es interesante constatar el efecto específico observado sobre células T CD4+. El tratamiento con rutina produce efectivamente una inhibición de la expresión de IFN $\gamma$  en células T CD4+ aisladas del bazo de los ratones mediante separación magnética, asociada a una menor fosforilación de STAT4 y, en menor medida, de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Estos datos son coherentes con el efecto inmunomodulador indirecto de la quercetina que se comentará más abajo.

Por otra parte, el tratamiento con rutina se traduce en una mejoría de carácter puramente fisiológico en cuanto al transporte iónico. La inflamación intestinal crónica, como la que se produce en diversos modelos de colitis (TNBS, DSS, oxazolona, HLA-B27, etc.) y en la propia EII está ligada a una inhibición general de la secreción y absorción hidroelectrolítica (690, 691). En este sentido, se diferencia de los procesos agudos de colitis, en los que típicamente la absorción se reduce pero hay una estimulación de la secreción, debido a que los mediadores implicados en la respuesta inflamatoria poseen propiedades prosecretoras. Técnicamente, la medida de la absorción *in vitro* exige la utilización de isótopos radiactivos o bien de marcadores fluorescentes sensibles a los iones implicados, detectables mediante microscopía multifotón. La razón es que los procesos absorptivos son electroneutros y por tanto no detectables por técnicas eléctricas estándar. Por el contrario, la secreción iónica en el colon, que implica fundamentalmente a los iones cloruro y bicarbonato, es electrogénica y puede cuantificarse de forma sencilla mediante la técnica de fijación de voltaje en cámara de Ussing. Nosotros analizamos el transporte basal y estimulado por una concentración de eficacia submáxima de carbacol, un agonista colinérgico. Debido a las limitaciones asociadas a la realización de esta prueba funcional de forma simultánea al sacrificio de los animales no disponemos de datos en el grupo no colítico, pero disponemos de datos de otro grupo de

investigación que confirman que la secreción iónica está inhibida en este modelo (688). Nuestros datos indican que los ratones tratados con rutina presentan un incremento en la respuesta secretora a carbacol, lo que debe interpretarse como una recuperación de la capacidad de transporte iónico. Los datos de permeabilidad, aunque no significativos, también indican una tendencia a la mejora de la función barrera tras el tratamiento con rutina. Actualmente estamos obteniendo medidas adicionales en ratones normales para confirmar este extremo.

Los resultados sobre este modelo sugieren que células secretoras de IFN $\gamma$ , posiblemente linfocitos Th1, podrían actuar como una diana importante en los efectos inmunomoduladores de rutina/quercetina extendidos desde la mucosa colónica hacia nódulos linfáticos mesentéricos, bazo y plasma, sugiriendo un efecto sistémico. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de otros mecanismos que de forma indirecta den lugar a este tipo de acción sobre los linfocitos. En cualquier caso, se demuestra un poderoso efecto antiinflamatorio de la rutina en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria, lo que aporta una evidencia clínica sólida de la bioactividad del glucósido.

Se acepta en general, y nuestros resultados son coherentes con ello, que el efecto de la rutina se ejerce por una liberación de quercetina en el lumen colónico o ileal, la cual actuaría sobre enterocitos o células subyacentes. Parte de los estudios *in vitro* expuestos en esta Tesis Doctoral demuestran la capacidad de la quercetina para modular significativamente la función del epitelio intestinal. La integridad del epitelio intestinal es mantenida principalmente por complejos intercelulares compuestos por uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas (692). Las proteínas transmembrana que forman parte de estos complejos están unidas a componentes del citoesqueleto, estableciendo conexiones con otras células. Además, existe un creciente número de moléculas citoplasmáticas asociadas a estas uniones que están involucradas en la regulación de diversos procesos, como transcripción, proliferación celular y polaridad celular (692-694). Nuestros datos demuestran la capacidad de la quercetina de incrementar la expresión de genes involucrados en las uniones estrechas, además de para restablecer la integridad de una monocapa de células IEC18 dañada con sulfato de dextrano sódico (DSS), impidiendo el paso de FITC-dextrano a través de la monocapa significativamente.

Desde el punto de vista de la regulación de la respuesta inmunológica, la quercetina ha mostrado en estudios anteriores un comportamiento generalmente inhibitorio de la secreción de citoquinas proinflamatorias y de vías de transducción de señal, particularmente NF- $\kappa$ B y Akt (3), aunque estas acciones han recibido globalmente menos atención que en otros tipos celulares, particularmente macrófagos. Nuestros datos indican efectos dispares sobre células IEC18. Contrariamente a lo esperado, la quercetina induce la expresión génica dependiente de NF- $\kappa$ B (luciferasa) en células quiescentes, activando la translocación al núcleo de p50 y dando lugar a una mayor expresión de COX2. Por el contrario, la secreción de quimioquinas (MCP-1 y GRO- $\alpha$ ) resulta inhibida, tanto en condiciones basales como tras la inducción por LPS, pero no por otros estímulos de TLR o NOD. Los experimentos llevados a cabo en células IEC18 inhibidas genéticamente para la expresión de TLR4 o MyD88 demostraron que tal efecto depende de ambas proteínas. Dado que MyD88 está implicado de forma general en el mecanismo de transducción de los TLR y que la quercetina no afecta a otros ligandos de TLR, el mecanismo del flavonoide debe estar situado corriente arriba de MyD88. En este sentido, se ha descrito recientemente que la quercetina induce la expresión de Tollip (Toll-interacting protein), un

regulador negativo de la señalización por TLR, en macrófagos (695). Aunque en principio se trata de una hipótesis atractiva, nuestros datos no encajan bien con la misma, puesto que Tollip actúa asociado con IRAK1/2 uniéndose al complejo TIRAP-MyD88-IRAK-4 que surge de la estimulación no sólo de TLR4, sino también de TLR2 y del IL-1R (696), y la quercetina no afecta a PDG ni a IL-1 $\beta$ . El perfil de actuación de la quercetina es en cualquier caso único dentro del conjunto de flavonoides estudiados, por su carácter sumamente específico (ver más adelante). Por otra parte, nuestros resultados tampoco encajan con un mecanismo inhibitorio sencillo de la quercetina o, en general, de los flavonoides, en virtud de su capacidad común de estimular la vía NF- $\kappa$ B. En el caso de la quercetina, ésta se asocia a una mayor translocación nuclear de p50 pero no p65 (presumiblemente dímeros p50/p50). Estos efectos se aprecian a la concentración fija de 50  $\mu$ M, con la que se observa una mayor expresión de COX2 en células IEC18 expuestas a quercetina. Sin embargo, tanto a esta concentración como a 10 y 30  $\mu$ M el flavonoide inhibe la liberación de MCP-1 y GRO- $\alpha$  en condiciones basales. Queda por verificar si efectivamente la razón de esta regulación diferencial está relacionada con cambios en las subunidades activadas del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo que tratamos de dilucidar en la actualidad. Otros autores han sugerido mecanismos adicionales, como la inhibición de la fosforilación de p65 o cambios en la acetilación de histonas (138).

En estudios previos de nuestro grupo de investigación la quercetina mostró efectos citotóxicos en esplenocitos de rata a 50  $\mu$ M (16). En consonancia con estos datos, nuestros resultados actuales muestran una actividad antiproliferativa sobre linfocitos T, población celular mayoritaria en esplenocitos, estadísticamente significativa a partir de 30  $\mu$ M. A estas concentraciones la aglicona inhibe la secreción de IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , probablemente a consecuencia de dicha acción antiproliferativa. Es posible que se manifiesten acciones proapoptóticas también. Nuestro interés se ha centrado sin embargo en los posibles efectos inmunomoduladores que la quercetina pudiera ejercer a concentraciones subtóxicas. A la concentración de 1  $\mu$ M la quercetina no afecta a la secreción de IFN $\gamma$ , aunque sí a la de TNF- $\alpha$ . Estos datos indican que el efecto directo de la quercetina sobre linfocitos T depende fundamentalmente de su acción proapoptótica/citotóxica. Sorprendentemente, la rutina mostró efectos antiproliferativos a concentraciones mucho más bajas (significativos desde 0.01  $\mu$ M); esta observación tiene un precedente en esplenocitos y timocitos de rata, donde la rutina (10 nM-10  $\mu$ M) inhibió la proliferación bajo estimulación con Con A (126). A pesar de ello, no se observó efecto alguno del heterósido sobre la secreción de citoquinas a ninguna de las concentraciones ensayadas. Es difícil explicar esta discrepancia; es posible que la rutina sea capaz de estimular la síntesis de citoquinas al tiempo que inhiba la proliferación linfocitaria, cancelándose ambos efectos entre sí. Alternativamente, teniendo en cuenta que el estudio de proliferación examina a las células a las 72 h, mientras que el de liberación de citoquinas lo hace a las 48 h, es posible que el efecto antiproliferativo sea relativamente tardío. La solución a este problema exigirá experimentos adicionales en el futuro.

Debido a que la quercetina modula a las células epiteliales intestinales, y éstas a su vez a los linfocitos T (entre otras células), es plausible que la genina pueda ejercer efectos indirectos sobre éstos a través de su interacción con el epitelio. Los datos farmacocinéticos apoyan además la idea de que la actividad de la quercetina se ejerce desde el lumen, como hemos comentado anteriormente. Mediante un sistema cocultivo para simular la comunicación entre células epiteliales intestinales y linfocitos subepiteliales, demostramos que la quercetina, a concentraciones ni tóxicas ni inmunomoduladoras para linfocitos T (<30  $\mu$ M), modula la



secreción de citoquinas por linfocitos T de forma más eficaz que mediante la interacción directa. Este efecto está ligado necesariamente a cambios en la regulación de estas células por los enterocitos estimulados por LPS, es decir, se trataría de un efecto indirecto de tipo paracrino. Las células epiteliales intestinales liberan diversos mediadores inflamatorios que afectan a poblaciones celulares subepiteliales. Además de los datos ya mencionados correspondientes a MCP-1 y GRO- $\alpha$ , hicimos un barrido mediante una técnica multiplex, pero ninguno de los candidatos estudiados parece ser responsable de este efecto, en función de la ausencia de correlación entre el efecto observado y los niveles de los mismos en el medio de cultivo de la cámara basolateral. Es importante destacar que el efecto inmunomodulador dependiente del epitelio fue significativo desde la concentración de 1  $\mu$ M, mientras que el efecto sobre MCP-1/GRO- $\alpha$  requiere una concentración 10 veces mayor. Debido al carácter específico de la inhibición por quercetina sobre la estimulación por LPS/TLR4 en células IEC18, es probable que el efecto modulador indirecto sobre linfocitos sea igualmente específico.

La naturaleza paracrina de la regulación de células T quedó confirmada mediante el ensayo del efecto de medio condicionado de células IEC18 tratadas con quercetina+LPS sobre los linfocitos. Con exposición de 72 horas a la quercetina se observaron los efectos inhibidores esperados. Además también se observó en el mismo experimento, una disminución de MCP-1 en el medio basolateral, sugiriendo que esta citoquina puede estar relacionada con las modulaciones sobre linfocitos T. Otra posibilidad sería la actuación de metabolitos de la quercetina sobre las células T. Ésta, como aglicona, es capaz de ser absorbida por las células epiteliales muy eficientemente y de transportarse hacia la cara basolateral, principalmente en forma de metabolitos conjugados (41), principalmente sulfatados en la línea celular humana Caco-2 y glucuronidados en células IEC18 según nuestros resultados (697). A este respecto, el efecto más destacado es la inhibición de la estimulación por el CpG en células IEC18 por parte de la taxifolina (dihydroquercetin), de hasta un 60% a 50 $\mu$ M, aunque con carácter no significativo. Este dato no deja de ser importante, ya que el receptor del CpG, el TLR9, tiene una localización intracitoplasmática, además de superficial como otros TLR, lo que sugiere una posible actividad de la taxifolina en el efecto antiinflamatorio de la rutina observado *in vivo*. La rutina no produjo efecto alguno en el cocultivo.

Globalmente, nuestros resultados indican que la quercetina ejerce efectos antiproliferativos y posiblemente proapoptóticos/citotóxicos en linfocitos T de rata a concentraciones relativamente elevadas, y acciones inmunomoduladoras directas a concentraciones bajas que se potencian cuando la regulación es indirecta, a través del concurso del epitelio intestinal. Por tanto, la rutina puede ejercer este tipo de efectos mediante la liberación de quercetina en el lumen intestinal. Por el contrario, la propia rutina tiene efectos antiproliferativos potentes que por razones poco claras no se traducen aparentemente en efectos inmunomoduladores.

La mayor parte del trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral, así como en estudios anteriores de nuestro grupo de investigación y de otros autores, se ha centrado en los efectos antiinflamatorios de rutina/quercetina en el intestino. La razón fundamental estriba en la abundancia de heterósidos de quercetina en la naturaleza, que se traduce en un consumo predominante de éstos frente a otros flavonoides en la dieta (23, 25, 26). No obstante, una vez demostrada y caracterizada dicha actividad, es importante considerar el impacto de variantes estructurales en la bioactividad de este tipo de compuestos, al objeto de dilucidar si es posible

mejorar la eficacia clínica en último término. En otras palabras, ¿es la quercetina el mejor flavonoide posible para tratar la inflamación intestinal? En este sentido, los requerimientos estructurales de los flavonoides para sus acciones antiinflamatorias/inmunomoduladoras han sido relativamente poco estudiados, aunque queda de manifiesto que diferentes respuestas biológicas están influidas efectivamente por las variaciones en la estructura y, en particular, que los requerimientos difieren de los correspondientes a sus propiedades antioxidativas/antirradicalarias.

Como se ha expuesto anteriormente, y como se recopiló en una revisión de nuestro grupo de investigación (3), de forma general los flavonoides presentan una actividad inhibidora, tanto *in vivo* como en la mayoría de las poblaciones celulares, con la posible excepción de los enterocitos, donde sus efectos son un tanto atípicos. Por ello en nuestro segundo objetivo quisimos abordar un estudio de la relación estructura-actividad de los flavonoides en células epiteliales intestinales, utilizando la línea celular de enterocitos de rata IEC18. Con el fin de abarcar los principales subtipos de flavonoides, escogimos al menos un representante por grupo. La estructura de los flavonoides consiste en 3 anillos fenólicos, A, B y C, con una gran variedad de sustituyentes (Tabla 1). Nosotros hemos estudiado el efecto de 9 flavonoides con el fin de identificar los requerimientos estructurales para cada una de las principales actividades examinadas.

En dicho estudio se examinaron 3 productos asociados a la respuesta inflamatoria, concretamente COX2, MCP-1 y GRO- $\alpha$ , además de vías de señalización (NF- $\kappa$ B, Akt, MAPK). Los flavonoides fueron estudiados a concentraciones  $\leq 50 \mu\text{M}$ , dado que no se observaron signos de toxicidad. La enzima COX2 cataliza el paso limitante en la biosíntesis de prostaglandinas en focos inflamatorios. Las células IEC18 en estado quiescente expresan niveles muy bajos de COX2, pero su expresión es rápidamente inducida tras su exposición a estímulos proinflamatorios como el LPS. Se trata de una diana interesante, ya que esta enzima está involucrada tanto en el desarrollo como en la recuperación de la respuesta inflamatoria. Ésta última es la base en intervenciones terapéuticas para paliar condiciones inflamatorias o de dolor con NSAIDs e inhibidores selectivos de la COX2, denominados Coxibs. Los Coxibs presentan un buen perfil gastroprotector aunque tienen importantes efectos adversos cardiovasculares. Está ampliamente aceptado que las prostaglandinas, en particular la PGE<sub>2</sub>, son esenciales en el control de la proliferación epitelial y la apoptosis (698). Por ello, la proliferación epitelial se ve reducida en ratones COX2-/- con colitis inducida por DSS pero se recupera tras la administración exógena de PGE<sub>2</sub> (699). Por otro lado, el perfil de producción de prostaglandinas cambia durante las diferentes fases de la inflamación. Así la PGE<sub>2</sub> se ve incrementada inicialmente, mientras que la PGD<sub>2</sub> parece ser el principal mediador en estados tardíos (700). También se ha sugerido que en este estadio final puede tener un carácter antiinflamatorio (701). Cabe destacar que la enzima COX1 también participa en la producción de prostaglandinas durante los procesos inflamatorios, y que existen otros eicosanoides, como las lipoxinas, que pueden ejercer funciones antiinflamatorias y de reparación de tejido (702).

El estudio de efectos de los flavonoides sobre COX2 fue llevado a cabo con una concentración fija de  $50 \mu\text{M}$ , dada la complejidad del análisis por Western blot y la multitud de grupos experimentales. Los flavonoides ejercen diferentes acciones sobre la expresión de COX2 dependiendo de sus características estructurales. Al igual que vimos para el caso de la quercetina, también el flavonol kaempferol, así como las flavonas estudiadas, con excepción

de la diosmetina, inducen la expresión de COX2 a nivel basal. La magnitud de tal incremento fue similar la inducida por el LPS, por lo que debe considerarse muy relevante. El doble enlace entre las posiciones 2 y 3, la posición 2 del anillo C y la presencia del grupo 4'-OH intacto son los principales determinantes de la actividad. El efecto de los flavonoides se vio modificado sustancialmente con la coestimulación con LPS, de forma que únicamente dos de ellos, concretamente las flavonas crisina y diosmetina, potenciaron la inducción de COX2 en estas condiciones. Por tanto, la metoxilación en 4' es importante para esta actividad, mientras que la hidroxilación en el mismo C puede resultar en detrimento (luteolina). Sin embargo, la mayoría de los flavonoides, incluyendo quercetina, kaempferol y luteolina, que anteriormente exhibieron la mayor inducción en células quiescentes, no incrementan los niveles de COX2 bajo estimulación con LPS y de hecho tienden a disminuirlos, aunque no de forma significativa.

Estudios previos han mostrado que MAPK (703) así como NF- $\kappa$ B (704, 705) participan en la activación de enterocitos por LPS. En concreto, COX2 es regulada por NF- $\kappa$ B a nivel postranscripcional y por la MAPK p38 en enterocitos (706, 707). Nuestros resultados indican que los efectos de los flavonoides sobre la translocación nuclear de p50/p65, la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  y la fosforilación de ERK/p38 en condiciones de estimulación con LPS son dependientes de su estructura. Así, para la inhibición de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , la única característica estructural que puede establecerse es la presencia de grupos 4'-OH (apigenina frente a crisina) y 5-OH (genisteína frente a daidzeína), mientras que la posición del anillo B (genisteína frente a apigenina) y la metoxilación en 4' (diosmetina frente a luteolina) son irrelevantes. El doble enlace 2-3 parece entorpecer esta actividad (diosmetina frente a hesperetina). La contribución del grupo 3-OH no está clara, ya que favorece por una parte la inhibición en algún caso (quercetina frente a luteolina), pero la impide en otros (kaempferol frente a apigenina). En el caso de la fosforilación de ERK, el doble enlace 2-3 (diosmetina frente a hesperetina), la hidroxilación en el anillo B (apigenina frente a crisina) y el grupo 5-OH (genisteína frente a daidzeína) parecen promover esta actividad, mientras que la posición 2-3 del anillo B resulta indiferente (genisteína frente a apigenina). La doble hidroxilación en el anillo B reduce el efecto (luteolina frente a apigenina), a no ser que uno de ellos esté metoxilado (diosmetina). Por otro lado, el grupo 3-OH dirige la actividad hacia la inhibición (kaempferol frente a apigenina), lo que se atenúa en el caso de una hidroxilación en 3'. Para la inhibición de p38, la presencia de dos en vez de un grupo hidroxilo en el anillo B (luteolina frente a apigenina) y la hidroxilación en 3 (kaempferol frente a apigenina) o, alternativamente, un mayor grado global de hidroxilación, son las claves estructurales para la actividad. El doble enlace en 2-3 parece oponerse a este efecto (diosmetina frente a hesperetina), sugiriendo que un mayor incremento de la fosforilación de p38 es posible.

Los resultados relacionados con la vía de señalización NF- $\kappa$ B son particularmente desconcertantes, ya que clásicamente los flavonoides han mostrado inhibir esta vía (99). Teniendo en cuenta que nuestros datos indican que la translocación y la regulación transcripcional de NF- $\kappa$ B se llevan a cabo incluso tras el total bloqueo de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , debemos asumir que las células IEC18 no dependen de la vía clásica para la regulación de genes dependientes de la activación de NF- $\kappa$ B, al menos en algunos casos. En contrapartida, MCP-1 y GRO- $\alpha$  se inhiben considerablemente en respuesta a Bay11-7082, lo que indica un funcionamiento estándar de esta vía. De hecho, otro resultado sorprendente fue el incremento en la expresión de COX2 tras la completa inhibición de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  por la adición de este inhibidor. Recientemente se ha demostrado que la composición de los dímeros de NF-

$\kappa$ B que se translocan al núcleo puede ser modificada farmacológicamente, de forma que el bloqueo del proteasoma inhibe la formación de los dímeros p50/p65 y p50/p50, mientras que el bloqueo de IKK (diana de Bay11-7082) solamente inhibe los heterodímeros (708). En nuestros experimentos, la translocación de p65 se vio de hecho más afectada que la de p50 en estas condiciones. Debido a que la quercetina solamente incrementó los niveles nucleares de p50, así como la expresión basal de COX2, es probable que tanto este flavonoide como el propio Bay11-7082 produzcan este efecto mediante la translocación de homodímeros p50/p50. En la medida en que la expresión de MCP-1/GRO- $\alpha$  requiera la participación de heterodímeros p50/p65, el efecto divergente de los flavonoides sobre estos genes y sobre COX2 quedaría explicado. Actualmente estamos tratando de confirmar este extremo. Por otra parte, la mala correlación que existe entre la inhibición de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  y la expresión de COX2 sugiere la implicación de otras dianas moleculares.

A tenor de los resultados correspondientes a COX2 obtenidos *in vitro*, los efectos *in vivo* son difíciles de predecir, pero es posible que algunos flavonoides induzcan la expresión de COX2 y la subsiguiente producción de prostaglandinas en condiciones inflamatorias mínimas o de normalidad, pero que no presenten efecto alguno o bien tengan un efecto inhibitor en condiciones de intenso estrés oxidativo, como una reacción inflamatoria. Nuestros propios datos *in vivo* confirman que la administración de rutina *in vivo* produce un claro efecto inhibitor de la expresión de COX2 en colon tanto en el modelo de colitis por TNBS en rata como en el de transferencia linfocitaria en ratón. Por tanto, la liberación intraluminal de quercetina parece tener efectos inhibidores en el intestino inflamado. No obstante, desconocemos si la rutina ejerce acciones moduladoras sobre COX2 directamente, al no haber sido ensayada en nuestro estudio.

Como se ha indicado anteriormente, parece existir una relación más sencilla o directa entre NF- $\kappa$ B y la producción de MCP-1 y GRO- $\alpha$  tras la estimulación de distintos receptores en enterocitos. La EII es una enfermedad en la que la microbiota desempeña un papel absolutamente fundamental, hasta el punto de que se considera que la presencia de microorganismos en el lumen intestinal es condición necesaria para el desarrollo de la reacción inflamatoria (308). Los antígenos de la microbiota son reconocidos por una serie de receptores que median en buena medida la inmunidad innata. Estos receptores son denominados receptores de reconocimiento de patrones de patógenos (PRRs) y se unen a moléculas no específicas, pero sustancialmente diferentes a las encontradas en células eucariotas, es decir, reconocen patrones moleculares más que moléculas específicas. Los PRRs comprenden los TLR (Toll like receptors), NLRs (Nucleotide-binding and oligomerization domains (NODs)-like receptors) y la familia helicasa (retinoic inducible gene I (RIG-I) o MDA5). Los TLR se expresan abundantemente en una gran variedad de células y tejidos y cada uno de ellos reconoce moléculas específicas. Aunque la activación de NOD2 y TLR da lugar a una activación celular de carácter pro-inflamatorio, en el intestino su papel es más complejo, posiblemente por su implicación en la función de barrera intestinal frente a los componentes de la microbiota, o por sus efectos sobre la dinámica epitelial. En este sentido, se ha descrito que la supresión de la expresión de varios de estos receptores aumenta la susceptibilidad a la colitis experimental en ratones, y que variantes polimórficas de NOD2 asociadas a un mayor riesgo de padecer EII presentan una menor grado de actividad (317, 319, 709).

Por otra parte, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  son citoquinas proinflamatorias del sistema inmunológico que presentan acciones sustancialmente similares, mediadas a través de sus respectivos receptores, IL-1R y TNFR. Como en el caso de los PRRs, la activación de estos receptores induce la activación de NF- $\kappa$ B y MAPK. La inhibición de la activación de estos receptores se ha usado ampliamente como diana farmacológica. De hecho, anticuerpos específicos contra el TNF son usados con éxito para el tratamiento de condiciones inflamatorias como EII o artritis reumatoide.

Existen varios estudios que han abordado los efectos de los flavonoides sobre la respuesta a LPS a través de TLR4, pero son escasos los datos sobre efectos moduladores de la respuesta a otros PRRs, TNFR o IL-1R. Por ello, parte del segundo objetivo de esta Tesis Doctoral está relacionado con la caracterización de los efectos de los flavonoides en la modulación de la actividad de diferentes receptores que señalizan vía MAPK y NF- $\kappa$ B, concretamente en cuanto a la producción de dos quimioquinas proinflamatorias ampliamente descritas, MCP-1 y GRO- $\alpha$  (710-712), incluyendo el estudio de la relación estructura-actividad. De nuevo para este propósito seleccionamos la línea celular IEC18, y se utilizaron los mismos compuestos de este tipo: 4 flavonas (crisina, luteolina, diosmetina y apigenina), 2 flavonoles (kaempferol y quercetina), 2 isoflavonas (daidzeína y genisteína) y 2 flavanonas (hesperetina y naringenina).

En consonancia con los resultados estimuladores observados anteriormente en estas mismas células, dos flavonoides, concretamente crisina y, en mucha menor medida, diosmetina, inducen la secreción de MCP-1 y GRO- $\alpha$ . Por el contrario, la quercetina y las isoflavonas daidzeína y genisteína inhiben la secreción basal de ambas citoquinas. El resto de flavonoides no mostró efecto alguno a este nivel. Estos resultados ponen de manifiesto nuevamente la heterogeneidad de la acción de los diferentes flavonoides y desde luego no apoyan un efecto proinflamatorio generalizado. Desde el punto de vista de la REA, el único elemento claro es que la presencia de un grupo hidroxilo intacto en 4' inhibe la actividad estimulante y que el grupo 3'-OH parece ser irrelevante, mientras que la actividad inhibidora no tiene determinantes estructurales discernibles. Debido al gran efecto mostrado por la crisina, estudiamos el mecanismo de acción subyacente centrándonos en la implicación de MyD88, molécula adaptadora involucrada en la activación de vías de señalización de varios receptores incluyendo TLR (excepto TLR3), NOD2 e IL1R. Al silenciar esta molécula en IEC18, la estimulación producida por la crisina a nivel basal desapareció. Debido a que varios flavonoides como quercetina o naringenina regulan la señalización inducida por LPS a través del TLR4 (9, 695), pensamos que podría ser una buena diana también en el caso de la crisina. Sin embargo, tras inhibir genéticamente la expresión de TLR4 en IEC18, se observó que el efecto de esta flavona es independiente de TLR4. Por tanto, la crisina debe modular la función de alguna molécula que interacciona con MyD88 (ver más adelante).

En condiciones de estimulación de las células IEC18 con los distintos agonistas, las flavonas (excepto la crisina) inhiben la producción de citoquinas asociada a la estimulación de TLR2/4/5/9, mientras que sólo en algunos casos inhiben la respuesta a TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , y no afectan a NOD2. Por su parte, la crisina potencia la respuesta secretora inducida por la ocupación de receptores TLR2, TLR5, TLR9 e IL-1R. Por el contrario, las isoflavonas presentan un amplio espectro de actuación, inhibiendo incluso la respuesta a la estimulación de NOD2 y TNFR. La comparación entre apigenina y genisteína, que difieren únicamente en la posición relativa de los sustituyentes en posiciones 2 y 3, indica que las isoflavonas tienden a producir

una inhibición más amplia de la respuesta. El hecho de que en cada uno de estos casos se verifique una acción moduladora de la respuesta a la activación de un grupo de distintos receptores sugiere que estos compuestos afectan a algún eslabón común de la cadena de transducción de señal de los mismos. Sin embargo, no está clara la identidad de la diana. El hecho de que las isoflavonas sean las únicas que inhiben la secreción inducida por MDP (es decir, por la ocupación de NOD2), así como por el resto de estímulos, sugiere que su diana está situada en la ruta común, que comienza en la activación del complejo IKK. Las flavonas carecen de efecto estimulante o inhibidor sobre la respuesta a NOD2, lo que indica que actúan en dianas situadas corriente arriba. El hecho de que las flavonas “inhibidoras” tengan un efecto más marcado sobre la respuesta a TLR, frente a la inducida por IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , parece sugerir una actuación en un intermediario al menos relativamente específico de la transducción de señal de TLR. Sin embargo, la vía de transducción de IL-1R y de los TLR, con excepción del TLR3, es esencialmente común en la mayoría de células, desde la activación de IRAK1/4 hasta la estimulación del complejo IKK, pasando por elementos intermedios como TRAF6 o TAK1.

Es interesante considerar la posibilidad de que la crisina estimule las mismas dianas que son inhibidas por luteolina, apigenina o diosmetina. Aunque a primera vista los efectos no son totalmente correspondientes, hay que considerar que la respuesta a LPS, flagelina y TNF- $\alpha$  es mucho más elevada en células IEC18 que en el resto de agonistas, y además muy similar en los 3 casos. Por tanto, es posible que en estas condiciones se alcance el máximo de respuesta farmacológica, lo que haría inviable un incremento ulterior por parte de la crisina. De ser así, puede asumirse que la crisina produzca de hecho una potenciación de la secreción dependiente de estimulación de TLR, IL-1R y TNFR, que sería la contrapartida de la inhibición observada con las demás flavonas. Sin embargo, dado que el efecto de la crisina es dependiente de MyD88 debe existir una acción predominante a nivel de esta molécula o corriente arriba de la misma. Esta observación es coherente asimismo con la hipótesis del efecto de amplio espectro de la flavona.

En contraste con las acciones de amplio espectro comentadas hasta ahora, los flavonoles presentan efectos mucho más restringidos. El efecto de la quercetina es sumamente específico, puesto que la eliminación del grupo 3-OH (luteolina) o del grupo 3'-OH (kaempferol) altera drásticamente la actividad. El hecho de que el kaempferol presente un efecto específico sobre la respuesta a flagelina (TLR5) es coherente con un mecanismo de la quercetina no mediado por Tollip sino por la modulación de algún otro intermediario específico de la vía de transducción de señal de TLR4 (TLR5 para kaempferol, en su caso). Lógicamente, se infiere que la presencia del grupo 3-OH que define a los flavonoles restringe la actividad farmacológica de los flavonoides. En este sentido, sería interesante evaluar el efecto de isoflavonas con grupo 2-OH.

Nuestros resultados demuestran por primera vez que los flavonoides tienen una acción determinante sobre la respuesta no sólo a LPS sino a múltiples estimulantes bacterianos, dependiente de su estructura, lo que puede condicionar su relación con la microbiota. Debido a que flavonoides con diversas estructuras se consumen diariamente como parte de la dieta humana, es posible que estas acciones formen parte de sus efectos saludables. Con todo, el objetivo último de estos experimentos es la búsqueda del compuesto con el mejor perfil antiinflamatorio intestinal. Nuestro estudio muestra que los flavonoides presentan efectos sobre las células epiteliales intestinales que son divergentes en cuanto a su carácter

inhibidor/estimulador y en cuanto a los marcadores considerados (COX2, citoquinas). En consecuencia, cabría esperar que sus efectos *in vivo* fueran igualmente variados. Sin embargo, no es éste el caso, observándose que la mayor parte de flavonoides estudiados presentan actividad antiinflamatoria intestinal en modelos de colitis experimental, incluyendo la crisina, la genisteína y, naturalmente, la quercetina (en forma de heterósido) (4-11). Por tanto, no parece existir una relación directa entre los efectos de los flavonoides observados en enterocitos e *in vivo*, aunque es posible que otras acciones epiteliales de estos compuestos tengan un papel más relevante, como el puesto de manifiesto en la presente Tesis Doctoral por quercetina y luteolina a nivel de la función de barrera intestinal. Por otro lado, es innegable que la rutina/quercetina ejerce una acción inmunomoduladora sobre linfocitos T a través del epitelio intestinal, al menos *in vitro*, lo que apoya la tesis de que el mecanismo de este flavonoide esté relacionado con este tipo de efecto. A su vez, este tipo de mecanismo es coherente con nuestros datos farmacocinéticos.

# CONCLUSIONES



1. La rutina presenta actividad antiinflamatoria intestinal tanto en colon como en íleon, que es favorecida por la utilización de la vía oral.
2. La ventaja de la rutina frente a la quercetina en este sentido no estriba tanto en la prevención de la absorción en el intestino delgado, sino en su menor metabolización y en la secreción hacia el lumen por el epitelio intestinal, lo que prolonga la presencia de la quercetina en el lumen.
3. La rutina es activa en un modelo de colitis crónica mediada por linfocitos, lo que constituye una validación adicional de la eficacia terapéutica de este flavonoide.
4. La quercetina ejerce efectos antiproliferativos a concentraciones a partir de 30  $\mu\text{M}$  en linfocitos T de rata y efectos inmunomoduladores a concentraciones más bajas, las cuales se ven potenciadas por una acción paracrina sobre las células IEC18 y, por extensión, por el epitelio intestinal en general. La rutina, por el contrario, carece en general de efectos directos sobre células IEC18 o linfocitos T de rata. Los datos obtenidos in vivo apoyan la relevancia biológica de un mecanismo de este tipo en el efecto antiinflamatorio intestinal de la rutina.
5. Los flavonoides presentan acciones moduladoras de la funcionalidad de las células IEC18, que se traducen en alteraciones diversas de la expresión de COX2, MCP-1 y GRO- $\alpha$ , de las vías de señalización y de los niveles de proteínas implicadas en la función de barrera. Estos efectos difieren sustancialmente en función de las variantes estructurales de los flavonoides ensayados.

# CONCLUSIONS

1. Rutin shows intestinal antiinflammatory activity in both the colon and ileum, which is favored by oral administration of the flavonoid.
2. The advantage of rutin vs. quercetin in this regard is not related so much to prevention of absorption in the small intestine as to lower metabolism coupled to luminal secretion by the intestinal epithelium, thus extending quercetin presence in the lumen.
3. Rutin is active in a T cell colitis model, giving an additional validation of its therapeutic efficiency.
4. Quercetin exerts antiproliferative effects on rat T lymphocytes at concentrations higher than 30  $\mu\text{M}$  and immunomodulatory effects at lower levels, potentiated by a paracrine action on IEC18 cells and, arguably, on the intestinal epithelium in general. Conversely, rutin has no major direct effects on IEC18 cells or rat T lymphocytes. *In vivo* data support the biological relevance of this mechanism in the antiinflammatory effect of rutin.
5. Flavonoids have modulatory actions on IEC18 cells function, which result in distinct changes in COX2, MCP-1 and GRO- $\alpha$  expression, signaling pathways and barrier function protein levels. These effects depend on the structural features of the flavonoids assayed.

# REFERENCIAS

1. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(1):6-15. Epub 2011/08/23.
2. McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(2):454-64. Epub 2012/01/06.
3. Gonzalez R, Ballester I, Lopez-Posadas R, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(4):331-62. Epub 2011/03/25.
4. Park MY, Ji GE, Sung MK. Dietary kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci.* 2012;57(2):355-63. Epub 2011/09/09.
5. Ganjare AB, Nirmal SA, Rub RA, Patil AN, Pattan SR. Use of *Cordia dichotoma* bark in the treatment of ulcerative colitis. *Pharm Biol.* 2011;49(8):850-5. Epub 2011/06/24.
6. Dou W, Zhang J, Zhang E, Sun A, Ding L, Chou G, et al. Chrysin ameliorates chemically induced colitis in the mouse through modulation of a PXR/NF-kappaB signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;345(3):473-82. Epub 2013/03/29.
7. Morimoto M, Watanabe T, Yamori M, Takebe M, Wakatsuki Y. Isoflavones regulate innate immunity and inhibit experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(6):1123-9. Epub 2009/02/18.
8. Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudenbach-Leschowski U, Diel P. Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *Eur J Nutr.* 2009;48(4):213-20. Epub 2009/02/24.
9. Dou W, Zhang J, Sun A, Zhang E, Ding L, Mukherjee S, et al. Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF-kappaB signalling. *Br J Nutr.* 2013;110(4):599-608. Epub 2013/03/20.
10. Azuma T, Shigeshiro M, Kodama M, Tanabe S, Suzuki T. Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. *J Nutr.* 2013;143(6):827-34. Epub 2013/04/19.
11. Al-Rejaie SS, Abuohashish HM, Al-Enazi MM, Al-Assaf AH, Parmar MY, Ahmed MM. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol.* 2013;19(34):5633-44. Epub 2013/09/17.
12. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Galvez J, et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol.* 2005;35(2):584-92. Epub 2005/01/26.
13. 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.
14. 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):771-9. Epub 1996/08/01.
15. Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y, Lim MJ, et al. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharm Res.* 2005;22(9):1499-509.
16. Lopez-Posadas R, Ballester I, Abadia-Molina AC, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. *Biochem Pharmacol.* 2008;76(4):495-506. Epub 2008/07/02.
17. Ohtsuka Y, Lee J, Stamm DS, Sanderson IR. MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. *Gut.* 2001;49(4):526-33. Epub 2001/09/18.
18. Longo WE, Panesar N, Mazuski J, Kaminski DL. Contribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 to prostanoid formation by human enterocytes stimulated by calcium

ionophore and inflammatory agents. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1998;56(5-6):325-39. Epub 1999/02/17.

19. Wallace JL. COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal.* 2006;6:577-88. Epub 2006/06/06.

20. Newberry RD, Stenson WF, Lorenz RG. Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nat Med.* 1999;5(8):900-6. Epub 1999/07/30.

21. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(5):880-6.

22. Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med.* 1996;156(6):637-42.

23. Hertog MG. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc Nutr Soc.* 1996;55(1B):385-97.

24. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993;342(8878):1007-11.

25. 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):21-9.

26. 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):143-9.

27. Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem J.* 1987;248(3):953-6.

28. Griffiths LA, Barrow A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J.* 1972;130(4):1161-2.

29. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1995;62(6):1276-82. Epub 1995/12/01.

30. Wolfram S, Block M, Ader P. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr.* 2002;132(4):630-5. Epub 2002/04/02.

31. Walgren RA, Lin JT, Kinne RK, Walle T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(3):837-43. Epub 2000/08/17.

32. Walgren RA, Karnaky KJ, Jr., Lindenmayer GE, Walle T. Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(3):830-6. Epub 2000/08/17.

33. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 1998;436(1):71-5.

34. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 2000;468(2-3):166-70.

35. Hanske L, Loh G, Sczesny S, Blaut M, Braune A. The bioavailability of apigenin-7-glucoside is influenced by human intestinal microbiota in rats. *J Nutr.* 2009;139(6):1095-102. Epub 2009/05/01.

36. Walle T, Otake Y, Walle UK, Wilson FA. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J Nutr.* 2000;130(11):2658-61.

37. Paganga G, Rice-Evans CA. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.* 1997;401(1):78-82. Epub 1997/01/13.

38. Aziz AA, Edwards CA, Lean ME, Crozier A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by

human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res.* 1998;29(3):257-69. Epub 1998/11/05.

39. Kottra G, Daniel H. Flavonoid glycosides are not transported by the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;322(2):829-35.

40. Murota K, Shimizu S, Chujo H, Moon JH, Terao J. Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. *Arch Biochem Biophys.* 2000;384(2):391-7. Epub 2001/05/23.

41. Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol.* 1999;277(1 Pt 1):G120-6.

42. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.

43. Mullen W, Edwards CA, Crozier A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr.* 2006;96(1):107-16.

44. Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME. Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos.* 2008;29(4):205-17.

45. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res.* 2001;35(6):941-52.

46. Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56(8):545-53.

47. Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimia R, et al. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem.* 2002;50(6):1725-30.

48. Ueno I, Nakano N, Hirono I. Metabolic fate of [<sup>14</sup>C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med.* 1983;53(1):41-50.

49. Mullen W, Graf BA, Caldwell ST, Hartley RC, Duthie GG, Edwards CA, et al. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(<sup>14</sup>C)]quercetin-4'-glucoside. *J Agric Food Chem.* 2002;50(23):6902-9.

50. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(1):51-60.

51. Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, et al. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem.* 2008;283(14):9424-34.

52. Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, et al. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr.* 2008;138(8):1417-20.

53. Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, Depypere HT, Serreyn RF, Mareel MM, et al. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;784(1):137-44.

54. Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol.* 2001;41(5):492-9.

55. Walle T, Walle UK, Halushka PV. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr.* 2001;131(10):2648-52.

56. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):230S-42S.
57. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation.* 2007;30(1-2):1-6.
58. Wang J, Zhang Q, Jin S, He D, Zhao S, Liu S. Genistein modulate immune responses in collagen-induced rheumatoid arthritis model. *Maturitas.* 2008;59(4):405-12.
59. Morinobu A, Biao W, Tanaka S, Horiuchi M, Jun L, Tsuji G, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses osteoclast differentiation and ameliorates experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 2008;58(7):2012-8.
60. Li R, Li J, Cai L, Hu CM, Zhang L. Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(2):221-8.
61. Kometani T, Fukuda T, Kakuma T, Kawaguchi K, Tamura W, Kumazawa Y, et al. Effects of alpha-glucosylhesperidin, a bioactive food material, on collagen-induced arthritis in mice and rheumatoid arthritis in humans. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008;30(1):117-34.
62. Kauss T, Moynet D, Rambert J, Al-Kharrat A, Brajot S, Thiolat D, et al. Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):R19.
63. Imada K, Lin N, Liu C, Lu A, Chen W, Yano M, et al. Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and -2 in collagen-induced arthritic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373(2):181-5.
64. Tang LQ, Wei W, Wang XY. Effects and mechanisms of catechin for adjuvant arthritis in rats. *Adv Ther.* 2007;24(3):679-90.
65. Murakami A, Song M, Katsumata S, Uehara M, Suzuki K, Ohigashi H. Citrus nobiletin suppresses bone loss in ovariectomized ddY mice and collagen-induced arthritis in DBA/1J mice: possible involvement of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis regulation. *Biofactors.* 2007;30(3):179-92.
66. Kawaguchi K, Maruyama H, Kometani T, Kumazawa Y. Suppression of collagen-induced arthritis by oral administration of the citrus flavonoid hesperidin. *Planta Med.* 2006;72(5):477-9.
67. De Leon EJ, Alcaraz MJ, Dominguez JN, Charris J, Terencio MC. A new chloroquinoliny chalcone derivative as inhibitor of inflammatory and immune response in mice and rats. *J Pharm Pharmacol.* 2003;55(9):1313-21.
68. De Paula ML, Rodrigues DH, Teixeira HC, Barsante MM, Souza MA, Ferreira AP. Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(9):1291-7.
69. Zeng Y, Song C, Ding X, Ji X, Yi L, Zhu K. Baicalin reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(7):1003-10.
70. Singh NP, Hegde VL, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis, primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor. *Mol Pharmacol.* 2007;72(6):1508-21.
71. Min K, Yoon WK, Kim SK, Kim BH. Immunosuppressive effect of silibinin in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Pharm Res.* 2007;30(10):1265-72.
72. Kawai M, Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Maruta M, Kuwahara Y, et al. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol Int.* 2007;56(2):113-23.
73. Das M, Ram A, Ghosh B. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice. *Inflamm Res.* 2003;52(3):101-6.
74. Yano S, Umeda D, Yamashita T, Ninomiya Y, Sumida M, Fujimura Y, et al. Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur J Nutr.* 2007;46(5):257-63.



75. Jung CH, Lee JY, Cho CH, Kim CJ. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. *Arch Pharm Res.* 2007;30(12):1599-607.
76. Rogerio AP, Kanashiro A, Fontanari C, da Silva EV, Lucisano-Valim YM, Soares EG, et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflamm Res.* 2007;56(10):402-8.
77. Jiang JS, Chien HC, Chen CM, Lin CN, Ko WC. Potent suppressive effects of 3-O-methylquercetin 5,7,3',4'-O-tetraacetate on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. *Planta Med.* 2007;73(11):1156-62.
78. Do GM, Kwon EY, Kim HJ, Jeon SM, Ha TY, Park T, et al. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(1):55-9.
79. Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(6):1053-63.
80. Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS, Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci.* 1996;59(1):PL15-21.
81. Lian TW, Wang L, Lo YH, Huang IJ, Wu MJ. Fisetin, morin and myricetin attenuate CD36 expression and oxLDL uptake in U937-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1781(10):601-9.
82. Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(9):2081-7.
83. Kennedy A, Overman A, Lapoint K, Hopkins R, West T, Chuang CC, et al. Conjugated linoleic acid-mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes are attenuated by resveratrol. *J Lipid Res.* 2009;50(2):225-32.
84. Hirai S, Kim YI, Goto T, Kang MS, Yoshimura M, Obata A, et al. Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Life Sci.* 2007;81(16):1272-9.
85. Guo TL, Chi RP, Hernandez DM, Auttachoat W, Zheng JF. Decreased 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis coincides with the induction of antitumor immunities in adult female B6C3F1 mice pretreated with genistein. *Carcinogenesis.* 2007;28(12):2560-6.
86. Guruvayoorappan C, Kuttan G. Amentoflavone, a biflavonoid from *Biophytum sensitivum* augments lymphocyte proliferation, natural killer cell and antibody dependent cellular cytotoxicity through enhanced production of IL-2 and IFN-gamma and restrains serum sialic acid and gamma glutamyl transpeptidase production in tumor - bearing animals. *J Exp Ther Oncol.* 2007;6(4):285-95.
87. Jo HY, Kim Y, Nam SY, Lee BJ, Kim YB, Yun YW, et al. The inhibitory effect of quercitrin gallate on iNOS expression induced by lipopolysaccharide in Balb/c mice. *J Vet Sci.* 2008;9(3):267-72.
88. Li W, Ashok M, Li J, Yang H, Sama AE, Wang H. A major ingredient of green tea rescues mice from lethal sepsis partly by inhibiting HMGB1. *PLoS One.* 2007;2(11):e1153.
89. Liu LL, Gong LK, Wang H, Xiao Y, Wu XF, Zhang YH, et al. Baicalin inhibits macrophage activation by lipopolysaccharide and protects mice from endotoxin shock. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4):914-22.
90. Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrillin MA, Wewers MD, et al. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J Immunol.* 2007;179(10):7121-7.
91. Sebai H, Ben-Attia M, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N. Protective effect of resveratrol in endotoxemia-induced acute phase response in rats. *Arch Toxicol.* 2009;83(4):335-40.

92. Wheeler DS, Lahni PM, Hake PW, Denenberg AG, Wong HR, Snead C, et al. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate improves systemic hemodynamics and survival in rodent models of polymicrobial sepsis. *Shock*. 2007;28(3):353-9.
93. Yeh CC, Kao SJ, Lin CC, Wang SD, Liu CJ, Kao ST. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sci*. 2007;80(20):1821-31.
94. Cruz EA, Da-Silva SA, Muzitano MF, Silva PM, Costa SS, Rossi-Bergmann B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(12):1616-21.
95. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem*. 2006;54(26):9798-804.
96. Kim YA, Kim GY, Park KY, Choi YH. Resveratrol inhibits nitric oxide and prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-activated C6 microglia. *J Med Food*. 2007;10(2):218-24.
97. Huang Z, Wang C, Wei L, Wang J, Fan Y, Wang L, et al. Resveratrol inhibits EMMPRIN expression via P38 and ERK1/2 pathways in PMA-induced THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(3):517-21.
98. Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, et al. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull*. 2007;73(1-3):55-63.
99. Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(8):1010-21.
100. Kaneko M, Takimoto H, Sugiyama T, Seki Y, Kawaguchi K, Kumazawa Y. Suppressive effects of the flavonoids quercetin and luteolin on the accumulation of lipid rafts after signal transduction via receptors. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008;30(4):867-82.
101. Lee S, Park HS, Notsu Y, Ban HS, Kim YP, Ishihara K, et al. Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. *Phytother Res*. 2008;22(11):1552-6.
102. Nakamura M, Omura S. Quercetin regulates the inhibitory effect of monoclonal non-specific suppressor factor beta on tumor necrosis factor-alpha production in LPS-stimulated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72(7):1915-20.
103. Harris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC, Shi X. Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. *J Nutr*. 2006;136(6):1517-21.
104. Chen CY, Peng WH, Tsai KD, Hsu SL. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci*. 2007;81(23-24):1602-14.
105. Ha SK, Lee P, Park JA, Oh HR, Lee SY, Park JH, et al. Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochem Int*. 2008;52(4-5):878-86.
106. Jun M, Hong J, Jeong WS, Ho CT. Suppression of arachidonic acid metabolism and nitric oxide formation by kudzu isoflavones in murine macrophages. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49(12):1154-9.
107. Nakaya M, Tachibana H, Yamada K. Isoflavone genistein and daidzein up-regulate LPS-induced inducible nitric oxide synthase activity through estrogen receptor pathway in RAW264.7 cells. *Biochem Pharmacol*. 2005;71(1-2):108-14.
108. Asmis R, Stevens J, Begley JG, Grimes B, Van Zant G, Fanti P. The isoflavone genistein inhibits LPS-stimulated TNFalpha, but not IL-6 expression in monocytes from hemodialysis patients and healthy subjects. *Clin Nephrol*. 2006;65(4):267-75.
109. Bodet C, La VD, Epifano F, Grenier D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *J Periodontal Res*. 2008;43(4):400-7.

110. Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res.* 2005;25(5):3367-74.
111. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytother Res.* 2008;22(7):957-62.
112. Fang SH, Rao YK, Tzeng YM. Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. *J Ethnopharmacol.* 2008;116(2):333-40.
113. Ahn SC, Kim GY, Kim JH, Baik SW, Han MK, Lee HJ, et al. Epigallocatechin-3-gallate, constituent of green tea, suppresses the LPS-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(1):148-55. Epub 2003/12/16.
114. Kim GY, Oh WK, Shin BC, Shin YI, Park YC, Ahn SC, et al. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c+CD8+ DC and type I helper T cell-dominant immune state. *FEBS Lett.* 2004;576(3):391-400. Epub 2004/10/23.
115. Kim GY, Lee MY, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Jin CY, et al. Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(10):1523-32. Epub 2005/07/19.
116. Yoon MS, Lee JS, Choi BM, Jeong YI, Lee CM, Park JH, et al. Apigenin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: Implication of immunotherapeutic adjuvant. *Mol Pharmacol.* 2006;70(3):1033-44.
117. Rogers J, Perkins I, van Olphen A, Burdash N, Klein TW, Friedman H. Epigallocatechin gallate modulates cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells stimulated with lipopolysaccharide or muramyl dipeptide, or infected with *Legionella pneumophila*. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005;230(9):645-51.
118. Yoneyama S, Kawai K, Tsuno NH, Okaji Y, Asakage M, Tsuchiya T, et al. Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(1):209-14.
119. Li CY, Suen JL, Chiang BL, Lee Chao PD, Fang SH. Morin promotes the production of Th2 cytokine by modulating bone marrow-derived dendritic cells. *Am J Chin Med.* 2006;34(4):667-84.
120. Dijsselbloem N, Goriely S, Albarani V, Gerlo S, Francoz S, Marine JC, et al. A critical role for p53 in the control of NF-kappaB-dependent gene expression in TLR4-stimulated dendritic cells exposed to Genistein. *J Immunol.* 2007;178(8):5048-57.
121. Yin Y, Gong FY, Wu XX, Sun Y, Li YH, Chen T, et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol.* 2008;120(1):1-6.
122. Cortes JR, Perez GM, Rivas MD, Zamorano J. Kaempferol inhibits IL-4-induced STAT6 activation by specifically targeting JAK3. *J Immunol.* 2007;179(6):3881-7.
123. Park J, Kim SH, Kim TS. Inhibition of interleukin-4 production in activated T cells via down-regulation of NF-AT DNA binding activity by apigenin, a flavonoid present in dietary plants. *Immunol Lett.* 2006;103(2):108-14.
124. Liang ZD, Zeng YY, Huang XY, He F. [Effect of Apigenin on proliferation, cell cycle and apoptosis of mouse T cells in vitro]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2008;24(4):337-40.
125. Zang N, Zeng YY, Huang XY, Wang T, Ye XY, Zhou JG, et al. [The effect of morin on activation, proliferation and cell-cycle of murine T lymphocytes in vitro]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2007;23(3):197-200.
126. Roseghini R, Rocha DS, Clarencio J, Costa SL, Costa MF, Tardy M, et al. Flavonoid rutin alters the viability and function of mitogen-stimulated splenocytes and thymocytes compared with non stimulated cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2007;29(2):271-85. Epub 2007/09/13.

127. Park J, Chung SW, Kim SH, Kim TS. Up-regulation of interleukin-4 production via NF-AT/AP-1 activation in T cells by biochanin A, a phytoestrogen and its metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(3):188-99.
128. Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, et al. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res.* 2007;56(5):210-5.
129. Kandere-Grzybowska K, Kempuraj D, Cao J, Cetrulo CL, Theoharides TC. Regulation of IL-1-induced selective IL-6 release from human mast cells and inhibition by quercetin. *Br J Pharmacol.* 2006;148(2):208-15.
130. Choi IY, Kim SJ, Jeong HJ, Park SH, Song YS, Lee JH, et al. Hesperidin inhibits expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and inflammatory cytokine production from mast cells. *Mol Cell Biochem.* 2007;305(1-2):153-61.
131. Theoharides TC, Kempuraj D, Iliopoulou BP. Mast cells, T cells, and inhibition by luteolin: implications for the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:423-30.
132. Moreira MR, Kanashiro A, Kabeya LM, Polizello AC, Azzolini AE, Curti C, et al. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. *Life Sci.* 2007;81(4):317-26.
133. Liu J, Li X, Yue Y, Li J, He T, He Y. The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell Mol Immunol.* 2005;2(6):455-60.
134. Itoh T, Ohguchi K, Iinuma M, Nozawa Y, Akao Y. Inhibitory effects of polymethoxy flavones isolated from *Citrus reticulata* on degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3: enhanced inhibition by their combination. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(16):7592-8.
135. Middleton E, Jr., Drzewiecki G. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem Pharmacol.* 1984;33(21):3333-8.
136. Yokomizo A, Moriwaki M. Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(6):1317-24.
137. Chen Z, Ma T, Huang C, Zhang L, Zhong J, Han J, et al. Efficiency of transcellular transport and efflux of flavonoids with different glycosidic units from flavonoids of *Litsea coreana* L. in a MDCK epithelial cell monolayer model. *Eur J Pharm Sci.* 2013;53C:69-76. Epub 2013/12/25.
138. Ruiz PA, Braune A, Holzwimmer G, Quintanilla-Fend L, Haller D. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr.* 2007;137(5):1208-15. Epub 2007/04/24.
139. Ruiz PA, Haller D. Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr.* 2006;136(3):664-71.
140. Romier B, Van De Walle J, During A, Larondelle Y, Schneider YJ. Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. *Br J Nutr.* 2008;100(3):542-51.
141. Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking I kappa B kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology.* 2005;115(3):375-87.
142. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-32. Epub 2003/09/18.
143. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999;59(16):3915-8. Epub 1999/08/27.
144. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003;63(5):1138-43. Epub 2003/03/05.

145. Jeon H, Kim H, Choi D, Kim D, Park SY, Kim YJ, et al. Quercetin activates an angiogenic pathway, hypoxia inducible factor (HIF)-1-vascular endothelial growth factor, by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: a structural analysis of quercetin for inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. *Mol Pharmacol*. 2007;71(6):1676-84.
146. Triantafyllou A, Mylonis I, Simos G, Bonanou S, Tsakalof A. Flavonoids induce HIF-1alpha but impair its nuclear accumulation and activity. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(4):657-70.
147. Amasheh M, Schlichter S, Amasheh S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, et al. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J Nutr*. 2008;138(6):1067-73.
148. Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microbiol*. 2008;124(3):295-8.
149. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(4):L774-83.
150. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1439-52.
151. Ju W, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky SA, Lin Y. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2007;71(5):1381-8.
152. Mirzoeva S, Kim ND, Chiu K, Franzen CA, Bergan RC, Pelling JC. Inhibition of HIF-1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. *Mol Carcinog*. 2008;47(9):686-700.
153. Crespo I, Garcia-Mediavilla MV, Almar M, Gonzalez P, Tunon MJ, Sanchez-Campos S, et al. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(5):1555-69.
154. Kim YS, Kim NH, Jung DH, Jang DS, Lee YM, Kim JM, et al. Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose-induced TGF-beta2 expression in human lens epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2008;594(1-3):18-25.
155. Jung SK, Lee KW, Byun S, Kang NJ, Lim SH, Heo YS, et al. Myricetin suppresses UVB-induced skin cancer by targeting Fyn. *Cancer Res*. 2008;68(14):6021-9.
156. Crespo I, Garcia-Mediavilla MV, Gutierrez B, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. *Br J Nutr*. 2008;100(5):968-76.
157. Wung BS, Hsu MC, Wu CC, Hsieh CW. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life Sci*. 2005;78(4):389-97.
158. Tribolo S, Lodi F, Connor C, Suri S, Wilson VG, Taylor MA, et al. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):50-6.
159. Jeong YJ, Choi YJ, Choi JS, Kwon HM, Kang SW, Bae JY, et al. Attenuation of monocyte adhesion and oxidised LDL uptake in luteolin-treated human endothelial cells exposed to oxidised LDL. *Br J Nutr*. 2007;97(3):447-57.
160. Lee JH, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Arch Pharm Res*. 2007;30(10):1318-27.
161. Kwon HM, Choi YJ, Jeong YJ, Kang SW, Kang IJ, Lim SS, et al. Anti-inflammatory inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by flavone derivatives. *J Agric Food Chem*. 2005;53(13):5150-7.

162. Lotito SB, Frei B. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J Biol Chem*. 2006;281(48):37102-10.
163. Bao M, Lou Y. Isorhamnetin prevent endothelial cell injuries from oxidized LDL via activation of p38MAPK. *Eur J Pharmacol*. 2006;547(1-3):22-30.
164. Hermenegildo C, Oviedo PJ, Garcia-Perez MA, Tarin JJ, Cano A. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;315(2):722-8.
165. Hernandez-Montes E, Pollard SE, Vauzour D, Jofre-Montseny L, Rota C, Rimbach G, et al. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;346(3):851-9.
166. Lee YW, Lee WH. Protective effects of genistein on proinflammatory pathways in human brain microvascular endothelial cells. *J Nutr Biochem*. 2008;19(12):819-25.
167. Simoncini T, Garibaldi S, Fu XD, Pisaneschi S, Begliuomini S, Baldacci C, et al. Effects of phytoestrogens derived from red clover on atherogenic adhesion molecules in human endothelial cells. *Menopause*. 2008;15(3):542-50.
168. Si H, Liu D. Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 2008;138(2):297-304.
169. Liu L, Xu DM, Cheng YY. Distinct effects of naringenin and hesperetin on nitric oxide production from endothelial cells. *J Agric Food Chem*. 2008;56(3):824-9.
170. Chiou CS, Lin JW, Kao PF, Liu JC, Cheng TH, Chan P. Effects of hesperidin on cyclic strain-induced endothelin-1 release in human umbilical vein endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(8):938-43.
171. Kang BY, Kim S, Lee KH, Lee YS, Hong I, Lee MO, et al. Transcriptional profiling in human HaCaT keratinocytes in response to kaempferol and identification of potential transcription factors for regulating differential gene expression. *Exp Mol Med*. 2008;40(2):208-19.
172. Gutierrez-Venegas G, Jimenez-Estrada M, Maldonado S. The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(9):1199-210.
173. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):673-751. Epub 2000/12/21.
174. Kim YS, Son M, Ko JI, Cho H, Yoo M, Kim WB, et al. Effect of DA-6034, a derivative of flavonoid, on experimental animal models of inflammatory bowel disease. *Arch Pharm Res*. 1999;22(4):354-60.
175. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. 1995;235(2):207-19.
176. Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, et al. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci*. 1996;41(6):1204-11.
177. 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*. 2000;130(8):1949-59.
178. Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY, et al. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem*. 2003;243(1-2):153-60.
179. 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):G315-21.

180. 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>-(.). *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):1-8.
181. 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):1281-6.
182. Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina LHF, Zarzuelo A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci.* 1998;62(7):687-95.
183. Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236(3):591-3.
184. Bertran X, Mane J, Fernandez-Banares F, Castella E, Bartoli R, Ojanguren I, et al. Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut.* 1996;38(6):899-904.
185. Fretland DJ, Widomski D, Tsai BS, Zemaitis JM, Levin S, Djuric SW, et al. Effect of the leukotriene B<sub>4</sub> receptor antagonist SC-41930 on colonic inflammation in rat, guinea pig and rabbit. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;255(2):572-6.
186. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272(1):417-22.
187. 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):G635-44.
188. Sanchez de Medina F, Perez R, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Lorente MD, Galvez J, et al. Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. *Pflugers Arch.* 2002;444(3):378-88.
189. Rao VS, Santos FA, Sobreira TT, Souza MF, Melo CL, Silveira ER. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med.* 1997;63(2):146-9.
190. Di Carlo G, Autore G, Izzo AA, Maiolino P, Mascolo N, Viola P, et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol.* 1993;45(12):1054-9.
191. Price AB. Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *J Clin Pathol.* 1978;31(6):567-77.
192. Martland GT, Shepherd NA. Indeterminate colitis: definition, diagnosis, implications and a plea for nosological sanity. *Histopathology.* 2007;50(1):83-96.
193. Carvalho RS, Abadom V, Dilworth HP, Thompson R, Oliva-Hemker M, Cuffari C. Indeterminate colitis: a significant subgroup of pediatric IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(4):258-62.
194. Guindi M, Riddell RH. Indeterminate colitis. *J Clin Pathol.* 2004;57(12):1233-44.
195. Geboes K, Colombel JF, Greenstein A, Jewell DP, Sandborn WJ, Vatn MH, et al. Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name? *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(6):850-7.
196. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet.* 2007;369(9573):1627-40.
197. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut.* 2004;53(7):987-92.
198. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet.* 2007;369(9573):1641-57. Epub 2007/05/15.
199. Cheung O, Regueiro MD. Inflammatory bowel disease emergencies. *Gastroenterol Clin North Am.* 2003;32(4):1269-88.

200. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*. 2008;14(25):3937-47.
201. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526-35.
202. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, David G, Pandur T, Balogh M, et al. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(3):205-11.
203. Delaunoit T, Limburg PJ, Goldberg RM, Lymp JF, Loftus EV, Jr. Colorectal cancer prognosis among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(3):335-42.
204. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001;91(4):854-62.
205. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Kamm MA, et al. Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1030-8.
206. Eaden J. Review article: colorectal carcinoma and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20 Suppl 4:24-30.
207. Brahme F, Lindstrom C. A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis. *Gut*. 1970;11(11):928-40.
208. Bolondi L, Gaiani S, Brignola C, Campieri M, Rigamonti A, Zironi G, et al. Changes in splanchnic hemodynamics in inflammatory bowel disease. Non-invasive assessment by Doppler ultrasound flowmetry. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27(6):501-7.
209. Lott MF, Davies JD. Lymph node hypervascularity: haemangiomatoid lesions and pan-nodal vasodilatation. *J Pathol*. 1983;140(3):209-19.
210. Wong CK, Yacyshyn BR. Fulminant Ulcerative Colitis. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2000;3(3):217-26.
211. Dumot JA, Adal K, Petras RE, Lashner BA. Sarcoidosis presenting as granulomatous colitis. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(10):1949-51.
212. Freeman HJ. Granuloma-positive Crohn's disease. *Can J Gastroenterol*. 2007;21(9):583-7.
213. Molnar T, Tiszlavicz L, Gyulai C, Nagy F, Lonovics J. Clinical significance of granuloma in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2005;11(20):3118-21.
214. Kelly JK, Siu TO. The strictures, sinuses, and fissures of Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*. 1986;8(5):594-8.
215. Lohsiriwat V, Clark SK. Persistent perineal sinus after ileoanal pouch excision in inflammatory bowel diseases: incidence, risk factors, and clinical course. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(12):1795-9.
216. Andersson P, Olaison G, Hallbook O, Boeryd B, Sjobahl R. Increased anal resting pressure and rectal sensitivity in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(12):1685-9.
217. Shepherd NA. Pathological mimics of chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol*. 1991;44(9):726-33.
218. Higuero T, Merle C, Thieffin G, Coussinet S, Jolly D, Diebold MD, et al. Jejunoileal Crohn's disease: a case-control study. *Gastroenterol Clin Biol*. 2004;28(2):160-6.
219. Wright CL, Riddell RH. Histology of the stomach and duodenum in Crohn's disease. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(4):383-90.
220. Maamouri N, Cheikh I, Belkahla N, Bouaziz S, Ouerghi H, Rahal K, et al. [Case report of isolated Crohn's disease of the stomach presenting as plastica linitis]. *Tunis Med*. 2006;84(8):513-6. *Maladie de Crohn gastrique isolee simulant une linite plastique. A propos d'un cas.*
221. Gyde SN, Prior P, Macartney JC, Thompson H, Waterhouse JA, Allan RN. Malignancy in Crohn's disease. *Gut*. 1980;21(12):1024-9.
222. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet*. 1990;336(8711):357-9.



223. Patel M, Banerjee B, Block JG, Marshall JB. Gastric Crohn's disease complicated by adenocarcinoma of the stomach: case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol.* 1997;92(8):1368-71.
224. Ribeiro MB, Greenstein AJ, Sachar DB, Barth J, Balasubramanian S, Harpaz N, et al. Colorectal adenocarcinoma in Crohn's disease. *Ann Surg.* 1996;223(2):186-93.
225. Sigel JE, Petras RE, Lashner BA, Fazio VW, Goldblum JR. Intestinal adenocarcinoma in Crohn's disease: a report of 30 cases with a focus on coexisting dysplasia. *Am J Surg Pathol.* 1999;23(6):651-5.
226. Jess T, Gamborg M, Matzen P, Munkholm P, Sorensen TI. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(12):2724-9.
227. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(8):1097-104.
228. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Cancer risks in Crohn disease patients. *Ann Oncol.* 2009;20(3):574-80.
229. Fornaro R, Frascio M, Denegri A, Stabilini C, Impenatore M, Mandolino F, et al. [Crohn's disease and cancer]. *Ann Ital Chir.* 2009;80(2):119-25. Malattia di Crohn e cancro.
230. De la Fuente Perucho A, Garcia-Calvo M, Fernandez Lobato R, Blanco J, Zuloaga J, Navarro M, et al. [Correlation between dysplasia and malignization risk of Crohn disease]. *Rev Esp Enferm Dig.* 1992;81(4):241-5. Correlacion entre displasia y riesgo de malignizacion de la enfermedad de Crohn.
231. Maykel JA, Hagerman G, Mellgren AF, Li SY, Alavi K, Baxter NN, et al. Crohn's colitis: the incidence of dysplasia and adenocarcinoma in surgical patients. *Dis Colon Rectum.* 2006;49(7):950-7.
232. Svrcek M, Cosnes J, Beaugerie L, Parc R, Bennis M, Tiret E, et al. Colorectal neoplasia in Crohn's colitis: a retrospective comparative study with ulcerative colitis. *Histopathology.* 2007;50(5):574-83.
233. Rose JD, Roberts GM, Williams G, Mayberry JF, Rhodes J. Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years. *Gut.* 1988;29(3):346-51.
234. Moum B, Vatn MH, Ekbo A, Aadland E, Fausa O, Lygren I, et al. Incidence of ulcerative colitis and indeterminate colitis in four counties of southeastern Norway, 1990-93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31(4):362-6.
235. Farrokhyar F, Swarbrick ET, Grace RH, Hellier MD, Gent AE, Irvine EJ. Low mortality in ulcerative colitis and Crohn's disease in three regional centers in England. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(2):501-7.
236. Jess T, Winther KV, Munkholm P, Langholz E, Binder V. Mortality and causes of death in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Gastroenterology.* 2002;122(7):1808-14.
237. Mayberry JF, Newcombe RG, Rhodes J. Mortality in Crohn's disease. *Q J Med.* 1980;49(193):63-8.
238. Cucino C, Sonnenberg A. Occupational mortality from inflammatory bowel disease in the United States 1991-1996. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(4):1101-5.
239. Sonnenberg A. Occupational mortality of inflammatory bowel disease. *Digestion.* 1990;46(1):10-8.
240. Garland CF, Lilienfeld AM, Mendeloff AI, Markowitz JA, Terrell KB, Garland FC. Incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease in fifteen areas of the United States. *Gastroenterology.* 1981;81(6):1115-24.
241. Kyle J. Crohn's disease in the northeastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review. *Gastroenterology.* 1992;103(2):392-9.
242. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology.* 1991;100(1):143-9.

243. Loftus EV, Jr., Schoenfeld P, Sandborn WJ. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(1):51-60.
244. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut.* 1996;39(5):690-7.
245. Ekbom A. The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed? *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10 Suppl 1:S32-4.
246. Lakatos L, Lakatos PL. [Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases]. *Orv Hetil.* 2007;148(5):223-8. Valtozasok a gyulladasos belbetegsegek epidemiologiajaban.
247. Kull K, Salupere R, Uibo R, Ots M, Salupere V. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Estonian patients with inflammatory bowel disease. Prevalence and diagnostic role. *Hepatogastroenterology.* 1998;45(24):2132-7.
248. Ihasz M, Batorfi J, Balint A, Zaborszky A, Regoly-Merei J, Posfai G, et al. Surgical relations of Crohn's disease and the frequency of recurrence. *Acta Chir Hung.* 1995;35(1-2):63-75.
249. Vucelic B, Korac B, Sentic M, Milicic D, Hadzic N, Juresa V, et al. Ulcerative colitis in Zagreb, Yugoslavia: incidence and prevalence 1980-1989. *Int J Epidemiol.* 1991;20(4):1043-7.
250. Wang YF, Zhang H, Ouyang Q. Clinical manifestations of inflammatory bowel disease: East and West differences. *J Dig Dis.* 2007;8(3):121-7.
251. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol.* 2006;12(38):6102-8.
252. Acheson ED, Nefzger MD. Ulcerative colitis in the United States Army in 1944. Epidemiology: comparisons between patients and controls. *Gastroenterology.* 1963;44:7-19.
253. Bonnevie O. A socio-economic study of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 1967;2(2):129-36.
254. Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, Rawsthorne P. Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol.* 2001;154(4):328-35.
255. Sonnenberg A. Disability from inflammatory bowel disease among employees in West Germany. *Gut.* 1989;30(3):367-70.
256. Gilat T, Hacoheh D, Lilos P, Langman MJ. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol.* 1987;22(8):1009-24.
257. Ekbom A, Adami HO, Helmick CG, Jonzon A, Zack MM. Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Epidemiol.* 1990;132(6):1111-9.
258. Bernstein CN, Kraut A, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N, Walld R. The relationship between inflammatory bowel disease and socioeconomic variables. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(7):2117-25.
259. Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut.* 1993;34(4):517-24.
260. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet.* 1994;343(8900):766-7.
261. Klement E, Lysy J, Hoshen M, Avitan M, Goldin E, Israeli E. Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(7):1775-82.
262. 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):336-43.

263. Nordenvall B, Brostrom O, Berglund M, Monsen U, Nordenstrom J, Sorstad J, et al. Incidence of ulcerative colitis in Stockholm County 1955-1979. *Scand J Gastroenterol.* 1985;20(7):783-90.
264. Norlen BJ, Krause U, Bergman L. An epidemiological study of Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1970;5(5):385-90.
265. Loftus EV, Jr., Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology.* 1998;114(6):1161-8.
266. Sonnenberg A. Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(2):206-11.
267. Askling J, Grahnquist L, Ekblom A, Finkel Y. Incidence of paediatric Crohn's disease in Stockholm, Sweden. *Lancet.* 1999;354(9185):1179.
268. Lindberg E, Lindquist B, Holmquist L, Hildebrand H. Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden, 1984-1995. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30(3):259-64.
269. Grieci T, Butter A. The incidence of inflammatory bowel disease in the pediatric population of Southwestern Ontario. *J Pediatr Surg.* 2009;44(5):977-80.
270. Orel R, Kamhi T, Vidmar G, Mamula P. Epidemiology of pediatric chronic inflammatory bowel disease in central and western Slovenia, 1994-2005. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48(5):579-86.
271. White JM, O'Connor S, Winter HS, Heyman MB, Kirschner BS, Ferry GD, et al. Inflammatory bowel disease in African American children compared with other racial/ethnic groups in a multicenter registry. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(12):1361-9.
272. Castro M, Papadatou B, Baldassare M, Balli F, Barabino A, Barbera C, et al. Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Italy: data from the pediatric national IBD register (1996-2003). *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(9):1246-52.
273. Turunen P, Kolho KL, Auvinen A, Iltanen S, Huhtala H, Ashorn M. Incidence of inflammatory bowel disease in Finnish children, 1987-2003. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(8):677-83.
274. Kugathasan S, Judd RH, Hoffmann RG, Heikenen J, Telega G, Khan F, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study. *J Pediatr.* 2003;143(4):525-31.
275. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology.* 1991;100(2):350-8.
276. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol.* 2000;35(3):154-67.
277. Calkins BM, Lilienfeld AM, Garland CF, Mendeloff AI. Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1984;29(10):913-20.
278. Segal I, Tim LO, Hamilton DG, Walker AR. The rarity of ulcerative colitis in South African blacks. *Am J Gastroenterol.* 1980;74(4):332-6.
279. El-Tawil AM. Jews and inflammatory bowel disease. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2009;18(2):137-8.
280. 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):1073-9.
281. Van Kruiningen HJ. Lack of support for a common etiology in Johne's disease of animals and Crohn's disease in humans. *Inflamm Bowel Dis.* 1999;5(3):183-91.
282. Afdhal NH, Long A, Lennon J, Crowe J, O'Donoghue DP. Controlled trial of antimycobacterial therapy in Crohn's disease. Clofazimine versus placebo. *Dig Dis Sci.* 1991;36(4):449-53.
283. Morgan KL. Johne's and Crohn's. Chronic inflammatory bowel diseases of infectious aetiology? *Lancet.* 1987;1(8540):1017-9.

284. Burnham WR, Lennard-Jones JE, Stanford JL, Bird RG. Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1978;2(8092 Pt 1):693-6.
285. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995;108(5):1396-404.
286. Parent K, Mitchell P. Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (group Va) bacteria in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1978;75(3):368-72.
287. Kangro HO, Chong SK, Hardiman A, Heath RB, Walker-Smith JA. A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1990;98(3):549-53.
288. Dragstedt LR, Dack GM, Kirsner JB. Chronic Ulcerative Colitis: a Summary of Evidence Implicating *Bacterium Necrophorum* as an Etiologic Agent. *Ann Surg*. 1941;114(4):653-62.
289. Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, Ushijima T, Kajinami T, Bamba T. Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15(1):61-8.
290. Burke DA, Axon AT. Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *Bmj*. 1988;297(6641):102-4.
291. Ohkusa T, Sato N, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Okayasu I. *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(8):849-53.
292. Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Sato N. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2003;52(1):79-83.
293. Luther J, Dave M, Higgins PD, Kao JY. Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: A meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis*. 2009.
294. Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Infant mortality and the incidence of inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1997;349(9050):472-3.
295. Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE, Wakefield AJ. Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1999;116(4):796-803.
296. Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(3):525-39.
297. Kirsner JB, Spencer JA. Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis. *Ann Intern Med*. 1963;59:133-44.
298. Saro Gismera C, Lacort Fernandez M, Arguelles Fernandez G, Anton Magarzo J, Navascues CA, Garcia Lopez R, et al. [Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijon, Asturias]. *Gastroenterol Hepatol*. 2001;24(5):228-35. Epidemiologia de la enfermedad inflamatoria intestinal cronica en Gijon. Asturias.
299. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1989;97(4):900-4.
300. Zlotogora J, Zimmerman J, Rachmilewitz D. Crohn's disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*. 1990;99(1):286-7.
301. Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut*. 1994;35(5):696-700.
302. Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO, Thompson JR, Wicks AC, Mayberry JF. Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut*. 1993;34(11):1547-51.
303. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991;324(2):84-8.
304. Weterman IT, Pena AS. Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature. *Gastroenterology*. 1984;86(3):449-52.

305. McConnell RB. Ulcerative colitis--genetic features. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1983;88:14-6.
306. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut.* 1988;29(7):990-6.
307. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology.* 2003;124(7):1767-73.
308. 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):95-6. Epub 1996/01/13.
309. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35(10):1075-81.
310. Greenberg DA, Rotter JI. Two locus models for gluten sensitive enteropathy: population genetic considerations. *Am J Med Genet.* 1981;8(2):205-14.
311. Rotter JI, Landaw EM. Measuring the genetic contribution of a single locus to a multilocus disease. *Clin Genet.* 1984;26(6):529-42.
312. Lin HJ, Rotter JI, Conte WJ. Use of HLA marker associations and HLA haplotype linkage to estimate disease risks in families with gluten-sensitive enteropathy. *Clin Genet.* 1985;28(3):185-98.
313. Zhang H, Massey D, Tremelling M, Parkes M. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br Med Bull.* 2008;87:17-30.
314. Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, et al. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet.* 1996;5(10):1679-83.
315. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411(6837):599-603.
316. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411(6837):603-6.
317. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet.* 2002;70(4):845-57. Epub 2002/03/05.
318. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet.* 2001;357(9272):1925-8.
319. Hampe J, Frenzel H, Mirza MM, Croucher PJ, Cuthbert A, Mascheretti S, et al. Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):321-6.
320. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17(12):1465-70.
321. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet.* 2002;47(9):469-72.
322. Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol.* 2004;10(7):1069-71.
323. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(12):2393-404.

324. Fernandez L, Mendoza JL, Martinez A, Urcelay E, Fernandez-Arquero M, Garcia-Paredes J, et al. IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10(6):715-22.
325. McKay DM. Intestinal inflammation and the gut microflora. *Can J Gastroenterol.* 1999;13(6):509-16.
326. Kelsall B. Getting to the guts of NOD2. *Nat Med.* 2005;11(4):383-4.
327. Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *N Engl J Med.* 1996;334(17):1106-15.
328. Engel GL. Psychological factors in ulcerative colitis in man and gibbon. *Gastroenterology.* 1969;57(3):362-5.
329. Alexander T. An Objective Study of Psychological Factors in Ulcerative Colitis in Children. *J Lancet.* 1965;85:22-4.
330. Robertson DA, Ray J, Diamond I, Edwards JG. Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 1989;30(5):623-6.
331. Helzer JE, Stillings WA, Chammas S, Norland CC, Alpers DH. A controlled study of the association between ulcerative colitis and psychiatric diagnoses. *Dig Dis Sci.* 1982;27(6):513-8.
332. Helzer JE, Chammas S, Norland CC, Stillings WA, Alpers DH. A study of the association between Crohn's disease and psychiatric illness. *Gastroenterology.* 1984;86(2):324-30.
333. Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiu JA, Groot JA, et al. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 1):G1037-44.
334. Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, Yang PC, Yates D, Groot JA, et al. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol.* 1999;277(2 Pt 1):G391-9.
335. Soderholm JD, Yates DA, Gareau MG, Yang PC, MacQueen G, Perdue MH. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(6):G1257-63.
336. Rao SS, Hatfield RA, Suls JM, Chamberlain MJ. Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(6):985-90.
337. Enck P, Merlin V, Erckenbrecht JF, Wienbeck M. Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut.* 1989;30(4):455-9.
338. Barclay GR, Turnberg LA. Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum. *Gastroenterology.* 1987;93(1):91-7.
339. Barclay GR, Turnberg LA. Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum. *Gastroenterology.* 1988;94(4):994-8.
340. Saunders PR, Kosecka U, McKay DM, Perdue MH. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol.* 1994;267(5 Pt 1):G794-9.
341. Velin AK, Ericson AC, Braaf Y, Wallon C, Soderholm JD. Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut.* 2004;53(4):494-500.
342. Kawahito Y, Sano H, Mukai S, Asai K, Kimura S, Yamamura Y, et al. Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 1995;37(4):544-51.
343. Muramatsu Y, Fukushima K, Iino K, Totsune K, Takahashi K, Suzuki T, et al. Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides.* 2000;21(12):1799-809.
344. Schwarz SP, Blanchard EB. Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease. *Behav Res Ther.* 1991;29(2):167-77.
345. Jantschek G, Zeitz M, Pritsch M, Wirsching M, Klor HU, Studt HH, et al. Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33(12):1289-96.

346. Milne HA, McWilliam CL. Considering nursing resource as "caring time". *J Adv Nurs*. 1996;23(4):810-9.
347. Truelove SC. Ulcerative colitis provoked by milk. *Br Med J*. 1961;1(5220):154-60.
348. Guthy E. [Crohn's disease and nutritional lipids. Hypothesis on etiology of regional enteritis]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1982;107(2):71-3. Morbus Crohn und Nahrungsfette. Hypothese zur Atiologie der Enteritis regionalis.
349. James AH. Breakfast and Crohn's disease. *Br Med J*. 1977;1(6066):943-5.
350. Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology*. 1992;3(1):47-52.
351. Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, et al. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10(3):243-9.
352. 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):741-5.
353. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(4):1008-13.
354. Endres S, Meydani SN, Ghorbani R, Schindler R, Dinarello CA. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J Leukoc Biol*. 1993;54(6):599-603.
355. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, et al. Effect of oral n-3 fatty acid supplementation on the immune response of young and older women. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1991;21A:245-8.
356. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, et al. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr*. 1991;121(4):547-55.
357. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, et al. 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):265-71.
358. Chapman MA, Grahn MF, Boyle MA, Hutton M, Rogers J, Williams NS. Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut*. 1994;35(1):73-6.
359. Kim YI. Short-chain fatty acids in ulcerative colitis. *Nutr Rev*. 1998;56(1 Pt 1):17-24.
360. 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):1557-60.
361. Belluzzi A, Campieri M, Brignola C, Gionchetti P, Miglioli M, Barbara L. Polyunsaturated fatty acid pattern and fish oil treatment in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1993;34(9):1289-90.
362. Macdonald A. Omega-3 fatty acids as adjunctive therapy in Crohns disease. *Gastroenterol Nurs*. 2006;29(4):295-301; quiz 2-3.
363. Hawthorne AB, Daneshmend TK, Hawkey CJ, Belluzzi A, Everitt SJ, Holmes GK, et al. Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut*. 1992;33(7):922-8.
364. Meister D, Ghosh S. Effect of fish oil enriched enteral diet on inflammatory bowel disease tissues in organ culture: differential effects on ulcerative colitis and Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2005;11(47):7466-72.
365. Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodriguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition*. 2003;19(10):837-42.

366. 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):11-9.
367. Almallah YZ, Ewen SW, El-Tahir A, Mowat NA, Brunt PW, Sinclair TS, et al. Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ. *J Clin Immunol.* 2000;20(1):68-76.
368. Pacheco RG, Esposito CC, Muller LC, Castelo-Branco MT, Quintella LP, Chagas VL, et al. Use of butyrate or glutamine in enema solution reduces inflammation and fibrosis in experimental diversion colitis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(32):4278-87. Epub 2012/09/13.
369. Gunnarsdottir I, Schack-Nielsen L, Michaelsen KF, Sorensen TI, Thorsdottir I, NordNet Study G. Infant weight gain, duration of exclusive breast-feeding and childhood BMI - two similar follow-up cohorts. *Public Health Nutr.* 2010;13(2):201-7.
370. Schack-Nielsen L, Michaelsen KF. Breast feeding and future health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(3):289-96.
371. Acheson ED, True Love SC. Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls. *Br Med J.* 1961;2(5257):929-33.
372. Whorwell PJ, Holdstock G, Whorwell GM, Wright R. Bottle feeding, early gastroenteritis, and inflammatory bowel disease. *Br Med J.* 1979;1(6160):382.
373. Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, et al. 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.
374. Bergstrand O, Hellers G. Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1983;18(7):903-6.
375. Koletzko S, Sherman P, Corey M, Griffiths A, Smith C. Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *Bmj.* 1989;298(6688):1617-8.
376. Beaudry M, Dufour R, Marcoux S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. *J Pediatr.* 1995;126(2):191-7.
377. Duffy LC, Byers TE, Riepenhoff-Talty M, La Scolea LJ, Zielezny M, Ogra PL. The effects of infant feeding on rotavirus-induced gastroenteritis: a prospective study. *Am J Public Health.* 1986;76(3):259-63.
378. Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. Protective effect of breast feeding against infection. *Bmj.* 1990;300(6716):11-6.
379. Pittard WB, 3rd. Breast milk immunology. A frontier in infant nutrition. *Am J Dis Child.* 1979;133(1):83-7.
380. Pittard WB, 3rd, Bill K. Immunoregulation by breast milk cells. *Cell Immunol.* 1979;42(2):437-41.
381. Bernt KM, Walker WA. Human milk as a carrier of biochemical messages. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88(430):27-41.
382. Carver JD, Barness LA. Trophic factors for the gastrointestinal tract. *Clin Perinatol.* 1996;23(2):265-85.
383. Binder JH, Gryboski JD, Thayer WR, Jr., Spiro HM. Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report. *Am J Dig Dis.* 1966;11(11):858-64.
384. Lerner A, Rossi TM, Park B, Albin B, Lebenthal E. Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease: Crohn's disease vs. ulcerative colitis. *Acta Paediatr Scand.* 1989;78(1):81-6.
385. Knoflach P, Park BH, Cunningham R, Weiser MM, Albin B. Serum antibodies to cow's milk proteins in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1987;92(2):479-85.
386. Young E, Stoneham MD, Petruckevitch A, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance. *Lancet.* 1994;343(8906):1127-30.
387. Bischoff SC, Herrmann A, Manns MP. Prevalence of adverse reactions to food in patients with gastrointestinal disease. *Allergy.* 1996;51(11):811-8.



388. Harries AD, Baird A, Rhodes J. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;284(6317):706.
389. Logan RF, Edmond M, Somerville KW, Langman MJ. Smoking and ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;288(6419):751-3.
390. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1989;34(12):1841-54.
391. Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F, Cattan S, Gendre JP, Cosnes J. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(7):2113-6.
392. Srivasta ED, Newcombe RG, Rhodes J, Avramidis P, Mayberry JF. Smoking and ulcerative colitis: a community study. *Int J Colorectal Dis*. 1993;8(2):71-4.
393. Somerville KW, Logan RF, Edmond M, Langman MJ. Smoking and Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;289(6450):954-6.
394. Franceschi S, Panza E, La Vecchia C, Parazzini F, Decarli A, Bianchi Porro G. Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking. *Am J Epidemiol*. 1987;125(3):445-52.
395. Benoni C, Nilsson A. Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. A case-control study. *Scand J Gastroenterol*. 1987;22(9):1130-6.
396. Cottone M, Rosselli M, Orlando A, Oliva L, Puleo A, Cappello M, et al. Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1994;106(3):643-8.
397. Kane SV, Flicker M, Katz-Nelson F. Tobacco use is associated with accelerated clinical recurrence of Crohn's disease after surgically induced remission. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(1):32-5.
398. Mahid SS, Minor KS, Stromberg AJ, Galandiuk S. Active and passive smoking in childhood is related to the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(4):431-8.
399. van der Heide F, Dijkstra A, Weersma RK, Albersnagel FA, van der Logt EM, Faber KN, et al. Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(8):1199-207.
400. Seksik P, Nion-Larmurier I, Sokol H, Beaugerie L, Cosnes J. Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(5):734-41.
401. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Afchain P, Beaugerie L, Gendre JP. Gender differences in the response of colitis to smoking. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(1):41-8.
402. Sher ME, Bank S, Greenberg R, Sardinha TC, Weissman S, Bailey B, et al. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5(2):73-8.
403. Motley RJ, Rhodes J, Williams G, Tavares IA, Bennett A. Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis. *J Pharm Pharmacol*. 1990;42(4):288-9.
404. van Dijk AP, Meijssen MA, Brouwer AJ, Hop WC, van Bergeijk JD, Feyerabend C, et al. Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(8):664-71.
405. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421(6921):384-8.
406. King TE, Jr., Savici D, Campbell PA. Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. *J Infect Dis*. 1988;158(6):1309-16.
407. Geng Y, Savage SM, Razani-Boroujerdi S, Sopori ML. Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy. *J Immunol*. 1996;156(7):2384-90.
408. Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, et al. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 1994;330(12):811-5.
409. Aldhous MC, Prescott RJ, Roberts S, Samuel K, Waterfall M, Satsangi J. Does nicotine influence cytokine profile and subsequent cell cycling/apoptotic responses in inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(11):1469-82.

410. Ingram JR, Rhodes J, Evans BK, Thomas GA. Nicotine enemas for active Crohn's colitis: an open pilot study. *Gastroenterol Res Pract*. 2008;2008:237185.
411. Rutgeerts P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1994;106(5):1251-3.
412. Duggan AE, Usmani I, Neal KR, Logan RF. Appendicectomy, childhood hygiene, *Helicobacter pylori* status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut*. 1998;43(4):494-8.
413. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Bhan AK. Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice. *J Exp Med*. 1996;184(2):707-15.
414. Ekblom A. Appendicectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin? *Gut*. 1998;43(4):451.
415. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2001;344(11):808-14.
416. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis*. 2002;8(4):277-86.
417. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, et al. Protective role of appendicectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2002;51(6):808-13.
418. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Blain A, Reijasse D, Gendre JP. Effects of appendicectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut*. 2002;51(6):803-7.
419. de Saussure P, Clerson P, Prost PL, Truong Tan N, Bouhnik Y, Gil R. Appendectomy, smoking habits and the risk of developing ulcerative colitis: a case control study in private practice setting. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007;31(5):493-7.
420. Naganuma M, Iizuka B, Torii A, Ogihara T, Kawamura Y, Ichinose M, et al. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis and reduces its recurrence: results of a multicenter case-controlled study in Japan. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(4):1123-6.
421. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
422. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJ. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(10):4399-406.
423. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 1996;4(11):430-5.
424. Cosnes J, Seksik P, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Gendre JP. Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(8):1235-42.
425. Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(6):685-94.
426. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(1):44-54.
427. Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, et al. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol*. 2003;170(3):1406-15.
428. Abreu MT, Thomas LS, Arnold ET, Lukasek K, Michelsen KS, Arditi M. TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res*. 2003;9(5):322-30.
429. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2001;167(3):1609-16.
430. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):131-44.

431. Hershberg RM. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283(4):G833-9.
432. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
433. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987-95.
434. Bocker U, Yezersky O, Feick P, Manigold T, Panja A, Kalina U, et al. Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int J Colorectal Dis*. 2003;18(1):25-32.
435. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun*. 2003;71(6):3503-11.
436. Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, et al. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(23):20431-7.
437. Bambou JC, Giraud A, Menard S, Begue B, Rakotobe S, Heyman M, et al. In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J Biol Chem*. 2004;279(41):42984-92.
438. Nandakumar NS, Pugazhendhi S, Madhu Mohan K, Jayakanthan K, Ramakrishna BS. Effect of *Vibrio cholerae* on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by *Lactobacillus GG*. *Scand J Immunol*. 2009;69(3):181-7.
439. Tallant T, Deb A, Kar N, Lupica J, de Veer MJ, DiDonato JA. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2004;4:33.
440. Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill TA, Obermeier F, Krause DO, Madsen KL. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun*. 2007;75(5):2572-9.
441. Akhtar M, Watson JL, Nazli A, McKay DM. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *FASEB J*. 2003;17(10):1319-21.
442. Steenholdt C, Andresen L, Pedersen G, Hansen A, Brynskov J. Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(2):195-204.
443. Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(2):298-306.
444. Rumio C, Besusso D, Palazzo M, Selleri S, Sfondrini L, Dubini F, et al. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol*. 2004;165(2):373-81.
445. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1518(1-2):157-61.
446. Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL, Parsons HG. MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(1):C31-41.
447. Haller D, Russo MP, Sartor RB, Jobin C. IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines. *J Biol Chem*. 2002;277(41):38168-78.
448. Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, et al. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 2004;173(9):5398-405.

449. Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2006;8(12):1327-36.
450. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2004;126(4):1054-70.
451. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 2005;26(8):447-54.
452. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):371-82.
453. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003;278(11):8869-72.
454. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 2003;300(5625):1584-7.
455. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(1):9-20.
456. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2003;124(4):1001-9.
457. Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, et al. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut.* 2003;52(6):840-6.
458. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut.* 2003;52(11):1591-7.
459. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology.* 2003;125(1):47-57.
460. Stockinger S, Reutterer B, Schaljo B, Schellack C, Brunner S, Materna T, et al. IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J Immunol.* 2004;173(12):7416-25.
461. 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):4812-8.
462. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol.* 2004;5(8):800-8.
463. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005;307(5710):731-4.
464. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science.* 1999;286(5437):113-7.
465. Garabedian EM, Roberts LJ, McNevin MS, Gordon JI. Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1997;272(38):23729-40.
466. Mach J, Hsieh T, Hsieh D, Grubbs N, Chervonsky A. Development of intestinal M cells. *Immunol Rev.* 2005;206:177-89.
467. Knoop KA, Miller MJ, Newberry RD. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29(2):112-8. Epub 2013/02/06.
468. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 2005;307(5707):254-8.

469. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
470. Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*. 2004;53(11):1602-9.
471. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):351-8.
472. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*. 2004;305(5687):1153-7.
473. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008;453(7198):1051-7.
474. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 2008;28(1):29-39.
475. Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, RORgamma and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2008;9(11):1297-306.
476. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*. 2008;9(6):641-9.
477. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. 1994;55(5):662-75.
478. Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 2002;50(3):307-13.
479. Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1740-4.
480. Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*. 2006;55(3):342-7.
481. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129(2):550-64.
482. Sun Y, Fihn BM, Sjoval H, Jodal M. Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo. *Gut*. 2004;53(3):362-7.
483. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, et al. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(3):G367-76.
484. Musch MW, Clarke LL, Mamah D, Gawenis LR, Zhang Z, Ellsworth W, et al. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Clin Invest*. 2002;110(11):1739-47.
485. 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):7010-7.
486. Rhee SH, Im E, Riegler M, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13610-5.
487. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005;129(1):50-65.
488. Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, et al. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut*. 2005;54(2):228-36.

489. Papadakis KA, Zhu D, Prehn JL, Landers C, Avanesyan A, Lafkas G, et al. Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2005;174(8):4985-90.
490. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut*. 2004;53(5):678-84.
491. van de Wal Y, Corazza N, Allez M, Mayer LF, Iijima H, Ryan M, et al. Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1420-31.
492. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1774-85.
493. Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol*. 1999;163(2):1081-90.
494. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, et al. Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol*. 2004;172(6):3391-8.
495. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1490-7.
496. Goebel S, Huang M, Davis WC, Jennings M, Siahaan TJ, Alexander JS, et al. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(4):G648-54.
497. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354(6):610-21.
498. Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut*. 2004;53(5):701-9.
499. Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem*. 2005;280(43):36099-109.
500. Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Goke M, et al. Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology*. 2003;125(5):1341-54.
501. Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y, et al. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(5):720-8.
502. Sparberg M, Fennessy J, Kirsner JB. Ulcerative proctitis and mild ulcerative colitis: A study of 220 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1966;45(5):391-412.
503. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340(6):448-54.
504. Kotler DP. Cachexia. *Ann Intern Med*. 2000;133(8):622-34.
505. Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*. 1999;179 Suppl 2:S294-304.
506. Gasche C, Reinisch W, Lochs H, Parsaei B, Bakos S, Wyatt J, et al. Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency. *Dig Dis Sci*. 1994;39(9):1930-4.
507. Dyer NH, Dawson AM. Malnutrition and malabsorption in Crohn's disease with reference to the effect of surgery. *Br J Surg*. 1973;60(2):134-40.
508. Dyer NH, Child JA, Mollin DL, Dawson AM. Anaemia in Crohn's disease. *Q J Med*. 1972;41(164):419-36.
509. Means RT, Jr. Erythropoietin in the treatment of anemia in chronic infectious, inflammatory, and malignant diseases. *Curr Opin Hematol*. 1995;2(3):210-3.

510. Schreiber S, Howaldt S, Schnoor M, Nikolaus S, Bauditz J, Gasche C, et al. Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 1996;334(10):619-23.
511. Koury MJ, Bondurant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem.* 1992;210(3):649-63.
512. Gumaste V, Greenstein AJ, Meyers R, Sachar DB. Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 1989;34(9):1457-61.
513. Bell DW, Urban E, Sears DA, Walder AI, Ostrower VS. Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia. *South Med J.* 1981;74(3):359-61.
514. Altman AR, Maltz C, Janowitz HD. Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis: report of three cases, review of the literature, and evaluation of modes of therapy. *Dig Dis Sci.* 1979;24(4):282-5.
515. Heits F, Stahl M, Ludwig D, Stange EF, Jelkmann W. Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19(7):757-60.
516. Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Habermann TM, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(9):2308-12.
517. Connell WR, Kamm MA, Dickson M, Balkwill AM, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 1994;343(8908):1249-52.
518. Caspi O, Polliack A, Klar R, Ben-Yehuda D. The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not? *Leuk Lymphoma.* 1995;17(3-4):255-62.
519. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology.* 2007;133(4):1099-105; quiz 340-1.
520. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2004;126(6):1634-48.
521. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2004;126(2):451-9.
522. Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol.* 2005;26(6):318-25.
523. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007;13(11):460-9.
524. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE.* 2003;2003(171):re3.
525. Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, et al. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity.* 1996;4(4):407-14. Epub 1996/04/01.
526. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002;3(7):667-72. Epub 2002/06/11.
527. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem.* 1995;270(23):13757-65.
528. Huang J, Gao X, Li S, Cao Z. Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):12829-32.
529. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 1997;7(6):837-47.

530. Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, et al. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol.* 2000;2(6):346-51.
531. Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem.* 2002;277(9):7059-65.
532. Cao Z, Henzel WJ, Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science.* 1996;271(5252):1128-31.
533. Qin J, Jiang Z, Qian Y, Casanova JL, Li X. IRAK4 kinase activity is redundant for interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase phosphorylation and IL-1 responsiveness. *J Biol Chem.* 2004;279(25):26748-53.
534. Lye E, Mirtsos C, Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC. The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(39):40653-8.
535. Cheng H, Addona T, Keshishian H, Dahlstrand E, Lu C, Dorsch M, et al. Regulation of IRAK-4 kinase activity via autophosphorylation within its activation loop. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352(3):609-16.
536. Li X, Commane M, Burns C, Vithalani K, Cao Z, Stark GR. Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol Cell Biol.* 1999;19(7):4643-52.
537. Kollewe C, Mackensen AC, Neumann D, Knop J, Cao P, Li S, et al. Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5227-36.
538. Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K, Li X. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol.* 2002;22(20):7158-67.
539. Yamin TT, Miller DK. The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997;272(34):21540-7.
540. Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Li X. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J Biol Chem.* 2001;276(45):41661-7.
541. Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is critical for I kappa B kinase-mediated activation of the NF-kappa B pathway. *J Mol Biol.* 2003;326(1):105-15.
542. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1087-95.
543. Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, et al. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* 2005;19(22):2668-81.
544. Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem.* 1996;271(34):20235-7.
545. Yao J, Kim TW, Qin J, Jiang Z, Qian Y, Xiao H, et al. Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent Versus MEKK3-dependent NFkappaB activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6075-89.
546. Solt LA, Madge LA, Orange JS, May MJ. Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *J Biol Chem.* 2007;282(12):8724-33.
547. Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J.* 2000;19(7):1576-86.
548. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* 2002;420(6913):329-33.



549. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*. 2002;420(6913):324-9.
550. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999;11(1):115-22.
551. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*. 2001;167(10):5887-94.
552. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):816-25.
553. Gohda J, Matsumura T, Inoue J. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol*. 2004;173(5):2913-7.
554. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*. 2008;9(4):361-8.
555. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745-56.
556. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, et al. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity*. 2004;21(3):415-28.
557. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003;114(2):181-90.
558. Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25534-41.
559. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 1996;4(4):387-96.
560. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996;84(2):299-308.
561. Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, et al. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity*. 1997;7(5):715-25.
562. Tada K, Okazaki T, Sakon S, Kobarai T, Kurosawa K, Yamaoka S, et al. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem*. 2001;276(39):36530-4.
563. Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, et al. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*. 2004;15(4):535-48.
564. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell*. 2006;22(2):245-57.
565. Blonska M, Shambharkar PB, Kobayashi M, Zhang D, Sakurai H, Su B, et al. TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 2005;280(52):43056-63.
566. Di Y, Li S, Wang L, Zhang Y, Dorf ME. Homeostatic interactions between MEKK3 and TAK1 involved in NF-kappaB signaling. *Cell Signal*. 2008;20(4):705-13.
567. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.
568. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*. 1996;84(3):431-42.

569. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*. 1996;84(3):443-50.
570. Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr., et al. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med*. 1995;181(5):1755-62.
571. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 1996;380(6575):627-30.
572. Meskiene I, Hirt H. MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol*. 2000;42(6):791-806. Epub 2000/07/13.
573. Liu Y, Zhang S. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2004;16(12):3386-99. Epub 2004/11/13.
574. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(1):50-83. Epub 2011/03/05.
575. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*. 1978;17(2):135-50.
576. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E. Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase. *Gastroenterology*. 1995;109(1):98-106.
577. Satoh H, Sato F, Takami K, Szabo S. New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *Japanese journal of pharmacology*. 1997;73(4):299-309.
578. Barada KA, Mourad FH, Sawah SI, Khoury C, Safieh-Garabedian B, Nassar CF, et al. Localized colonic inflammation increases cytokine levels in distant small intestinal segments in the rat. *Life sciences*. 2006;79(21):2032-42.
579. 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.
580. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer science*. 2003;94(11):965-73.
581. Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infection and immunity*. 2001;69(4):2277-85.
582. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clinical and experimental immunology*. 1998;114(3):385-91.
583. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1993;69(2):238-49.
584. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis*. 2000;21(4):757-68.
585. 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.
586. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995;182(5):1281-90.
587. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Strober W, Kitani A. Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest*. 2005;115(11):3057-71.

588. Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, et al. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol.* 1996;157(5):2174-85.
589. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med.* 1996;183(6):2605-16.
590. Elson CO, Cong Y, Sundberg J. The C3H/HeJBir mouse model: a high susceptibility phenotype for colitis. *International reviews of immunology.* 2000;19(1):63-75.
591. Strober W, Nakamura K, Kitani A. The SAMP1/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation.* 2001;107(6):667-70.
592. Pizarro TT, Pastorelli L, Bamias G, Garg RR, Reuter BK, Mercado JR, et al. SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis. *Inflammatory bowel diseases.* 2011;17(12):2566-84.
593. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993;75(2):263-74.
594. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell.* 1993;75(2):253-61.
595. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell.* 1993;75(2):274-82.
596. Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M, Armaka M, Apostolaki M, Pizarro T, et al. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *The Journal of experimental medicine.* 2002;196(12):1563-74.
597. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell.* 1990;63(5):1099-112.
598. Wirtz S, Finotto S, Kanzler S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, et al. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *Journal of immunology.* 1999;162(4):1884-8.
599. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, et al. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *The Journal of experimental medicine.* 1998;187(3):389-402.
600. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *Journal of immunology.* 1998;161(10):5733-44.
601. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, et al. Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nature genetics.* 1995;10(2):143-50.
602. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science.* 1995;270(5239):1203-7.
603. Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine.* 1993;178(1):237-44.
604. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International immunology.* 1993;5(11):1461-71.
605. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity.* 1994;1(7):553-62.

606. Mudter J, Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L+ CD4+ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2002;70(3):170-6.
607. Gisbert JP, Gomollon F, Mate J, Pajares JM. Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review. *Dig Dis Sci*. 2002;47(3):471-88.
608. Sutherland L, Roth D, Beck P, May G, Makiyama K. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002(4):CD000544.
609. Azad Khan AK, Piris J, Truelove SC. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Lancet*. 1977;2(8044):892-5.
610. van Hees PA, Bakker JH, van Tongeren JH. Effect of sulphapyridine, 5-aminosalicylic acid, and placebo in patients with idiopathic proctitis: a study to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Gut*. 1980;21(7):632-5.
611. Forbes A, Cartwright A, Marchant S, McIntyre P, Newton M. Review article: Oral, modified-release mesalazine formulations--proprietary versus generic. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17(10):1207-14.
612. Christensen LA, Slot O, Sanchez G, Boserup J, Rasmussen SN, Bondesen S, et al. Release of 5-aminosalicylic acid from Pentasa during normal and accelerated intestinal transit time. *Br J Clin Pharmacol*. 1987;23(3):365-9.
613. Yu DK, Elvin AT, Morrill B, Eichmeier LS, Lanman RC, Lanman MB, et al. Effect of food coadministration on 5-aminosalicylic acid oral suspension bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*. 1990;48(1):26-33.
614. Nikolaus S, Folsch U, Schreiber S. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology*. 2000;47(31):71-82.
615. Greenfield SM, Punchard NA, Teare JP, Thompson RP. Review article: the mode of action of the aminosaliculates in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1993;7(4):369-83.
616. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest*. 1998;101(5):1163-74.
617. Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology*. 2000;119(5):1209-18.
618. Martínez-Augustin O, López-Posadas R, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F. Genomic analysis of sulfasalazine effect in experimental colitis is consistent primarily with modulation of NF-kB but not PPAR-g signaling. *Pharmacogenetics and genomics*. 2009;19:363-72.
619. Egan LJ, Mays DC, Huntoon CJ, Bell MP, Pike MG, Sandborn WJ, et al. Inhibition of interleukin-1-stimulated NF-kappaB RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity. *J Biol Chem*. 1999;274(37):26448-53.
620. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987;317(26):1625-9.
621. Sninsky CA, Cort DH, Shanahan F, Powers BJ, Sessions JT, Pruitt RE, et al. Oral mesalamine (Asacol) for mildly to moderately active ulcerative colitis. A multicenter study. *Ann Intern Med*. 1991;115(5):350-5.
622. O'Morain C, Smethurst P, Dore CJ, Levi AJ. Reversible male infertility due to sulphasalazine: studies in man and rat. *Gut*. 1984;25(10):1078-84.
623. Franklin JL, Rosenberg HH. Impaired folic acid absorption in inflammatory bowel disease: effects of salicylazosulfapyridine (Azulfidine). *Gastroenterology*. 1973;64(4):517-25.
624. Novis BH, Korzets Z, Chen P, Bernheim J. Nephrotic syndrome after treatment with 5-aminosalicylic acid. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;296(6634):1442.

625. Barbour VM, Williams PF. Nephrotic syndrome associated with sulphasalazine. *Bmj*. 1990;301(6755):818.
626. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*. 2004;125(10-11):697-706.
627. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:125-63.
628. Singleton JW, Law DH, Kelley ML, Jr., Mekhjian HS, Sturdevant RA. National Cooperative Crohn's Disease Study: adverse reactions to study drugs. *Gastroenterology*. 1979;77(4 Pt 2):870-82.
629. Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C, Buxton-Thomas M, Forgacs I, Moniz C. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997;40(2):228-33.
630. Abitbol V, Roux C, Chaussade S, Guillemant S, Kolta S, Dougados M, et al. Metabolic bone assessment in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;108(2):417-22.
631. Rutgeerts P, Lofberg R, Malchow H, Lamers C, Olaison G, Jewell D, et al. A comparison of budesonide with prednisolone for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 1994;331(13):842-5.
632. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955;2(4947):1041-8.
633. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;43(4):329-39.
634. Morgan SL, Baggott JE, Vaughn WH, Austin JS, Veitch TA, Lee JY, et al. Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. 1994;121(11):833-41.
635. Gorlick R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1041-8.
636. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature*. 1991;352(6338):803-7.
637. Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology*. 1992;103(1):65-71.
638. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol*. 1993;30(16):1443-53.
639. Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol*. 1993;151(3):1548-61.
640. Siegel SA, Shealy DJ, Nakada MT, Le J, Woulfe DS, Probert L, et al. The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. *Cytokine*. 1995;7(1):15-25.
641. Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghayeb J. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine*. 1995;7(3):251-9.
642. Suitters AJ, Foulkes R, Opal SM, Palardy JE, Emtage JS, Rolfe M, et al. Differential effect of isotype on efficacy of anti-tumor necrosis factor alpha chimeric antibodies in experimental septic shock. *J Exp Med*. 1994;179(3):849-56.
643. Reimund JM, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Kedinger M, Baumann R, et al. In vitro effects of oxpentifylline on inflammatory cytokine release in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997;40(4):475-80.
644. Levi M, ten Cate H, Bauer KA, van der Poll T, Edgington TS, Buller HR, et al. Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifylline or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in chimpanzees. *J Clin Invest*. 1994;93(1):114-20.

645. Bauditz J, Haemling J, Ortner M, Lochs H, Raedler A, Schreiber S. Treatment with tumour necrosis factor inhibitor oxpentifylline does not improve corticosteroid dependent chronic active Crohn's disease. *Gut*. 1997;40(4):470-4.
646. Bielekova B, Lincoln A, McFarland H, Martin R. Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases. *J Immunol*. 2000;164(2):1117-24.
647. Zou LP, Deretzi G, Pelidou SH, Levi M, Wahren B, Quiding C, et al. Rolipram suppresses experimental autoimmune neuritis and prevents relapses in Lewis rats. *Neuropharmacology*. 2000;39(2):324-33.
648. Hartmann G, Bidlingmaier C, Siegmund B, Albrich S, Schulze J, Tschoep K, et al. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;292(1):22-30.
649. Vasiliauskas EA, Kam LY, Abreu-Martin MT, Hassard PV, Papadakis KA, Yang H, et al. An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999;117(6):1278-87.
650. 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):1271-7.
651. Haslett PA, Klausner JD, Makonkawkeyoon S, Moreira A, Metatratip P, Boyle B, et al. Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999;15(13):1169-79.
652. Juffermans NP, Verbon A, Olszyna DP, van Deventer SJ, Speelman P, van Der Poll T. Thalidomide suppresses Up-regulation of human immunodeficiency virus coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4+ T cells in humans. *J Infect Dis*. 2000;181(5):1813-6.
653. Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, et al. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13(11):1535-42.
654. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1461-72.
655. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1473-82.
656. Podolsky DK, Lobb R, King N, Benjamin CD, Pepinsky B, Sehgal P, et al. Attenuation of colitis in the cotton-top tamarin by anti-alpha 4 integrin monoclonal antibody. *J Clin Invest*. 1993;92(1):372-80.
657. Richards CD, Braciak T, Xing Z, Graham F, Gauldie J. Adenovirus vectors for cytokine gene expression. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;762:282-92; discussion 92-3.
658. Wilson JM. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med*. 1996;334(18):1185-7.
659. Chao H, Samulski R, Bellinger D, Monahan P, Nichols T, Walsh C. Persistent expression of canine factor IX in hemophilia B canines. *Gene Ther*. 1999;6(10):1695-704.
660. During MJ, Xu R, Young D, Kaplitt MG, Sherwin RS, Leone P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med*. 1998;4(10):1131-5.
661. Abe A, Chen ST, Miyanochara A, Friedmann T. In vitro cell-free conversion of noninfectious Moloney retrovirus particles to an infectious form by the addition of the vesicular stomatitis virus surrogate envelope G protein. *J Virol*. 1998;72(8):6356-61.
662. Schreiber S, Nikolaus S, Malchow H, Kruis W, Lochs H, Raedler A, et al. Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1339-46.

663. Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Rastija V, Lucic B, Trinajstic N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(7):827-45.
664. Hirano D, Kudo S. Usefulness of CD4+CD45RBhigh CD25- cell-transferred SCID mice for preclinical evaluation of drugs for inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Sci*. 2009;110(2):169-81.
665. Ding S, Dudley E, Plummer S, Tang J, Newton RP, Brenton AG. Quantitative determination of major active components in Ginkgo biloba dietary supplements by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2006;20(18):2753-60.
666. 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):1344-50.
667. Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Ballester I, Nieto A, Galvez J, et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochemical pharmacology*. 2004;68(12):2317-26.
668. Lu S, Gough AW, Bobrowski WF, Stewart BH. Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1996;85(3):270-3.
669. Dengler WA, Schulte J, Berger DP, Mertelsmann R, Fiebig HH. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-cancer drugs*. 1995;6(4):522-32.
670. 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):539-44.
671. Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska-Nikiel B, et al. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. *Mutat Res*. 2008;654(1):38-44. Epub 2008/06/17.
672. Galvez J, Cruz T, Crespo E, Ocete MA, Lorente MD, Sanchez de Medina F, et al. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Med*. 1997;63(5):409-14.
673. Koboziev I, Karlsson F, Zhang S, Grisham MB. Pharmacological intervention studies using mouse models of the inflammatory bowel diseases: translating preclinical data into new drug therapies. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(5):1229-45. Epub 2011/02/12.
674. Cario E, Golenbock DT, Visintin A, Runzi M, Gerken G, Podolsky DK. Trypsin-sensitive modulation of intestinal epithelial MD-2 as mechanism of lipopolysaccharide tolerance. *J Immunol*. 2006;176(7):4258-66. Epub 2006/03/21.
675. Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(3):C451-62. Epub 2000/03/11.
676. Inan MS, Tolmacheva V, Wang QS, Rosenberg DW, Giardina C. Transcription factor NF-kappaB participates in regulation of epithelial cell turnover in the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(6):G1282-91. Epub 2000/11/30.
677. Lopez-Posadas R, Ballester I, Mascaraque C, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF-kappaB in an intestinal epithelial cell line (IEC18). *Br J Pharmacol*. 2010;160(7):1714-26. Epub 2010/07/24.
678. Sotnikova R, Nosalova V, Navarova J. Efficacy of quercetin derivatives in prevention of ulcerative colitis in rats. *Interdiscip Toxicol*. 2013;6(1):9-12. Epub 2013/10/31.
679. González R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011;51(4):331-62.
680. de Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolffram S, Alink GM, et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr*. 2005;135(7):1718-25.

681. Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regeat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* 1997;409(1):12-6. Epub 1997/06/02.
682. Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* 1999;458(2):224-30. Epub 1999/09/11.
683. Galvez J, Crespo ME, Jimenez J, Suarez A, Zarzuelo A. Antidiarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats. *J Pharm Pharmacol.* 1993;45(2):157-9.
684. Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJ, Johnson IT. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(1):19-25.
685. Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol.* 1998;275(1 Pt 2):R212-9.
686. Choudhury R, Srai SK, Debnam E, Rice-Evans CA. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(3-4):278-86. Epub 1999/09/01.
687. de Medina FS, Daddaoua A, Requena P, Capitan-Canadas F, Zarzuelo A, Dolores Suarez M, et al. New insights into the immunological effects of food bioactive peptides in animal models of intestinal inflammation. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(3):454-62. Epub 2010/07/06.
688. Ortega-Gonzalez M, Capitan-Canadas F, Requena P, Ocon B, Romero-Calvo I, Aranda C, et al. Validation of bovine glycomacropeptide as an intestinal anti-inflammatory nutraceutical in the lymphocyte-transfer model of colitis. *Br J Nutr.* 2013;1-11. Epub 2013/11/16.
689. Nones K, Dommels YE, Martell S, Butts C, McNabb WC, Park ZA, et al. The effects of dietary curcumin and rutin on colonic inflammation and gene expression in multidrug resistance gene-deficient (*mdr1a*<sup>-/-</sup>) mice, a model of inflammatory bowel diseases. *Br J Nutr.* 2009;101(2):169-81.
690. Romero-Calvo I, Mascaraque C, Zarzuelo A, Suarez MD, Martinez-Augustin O, de Medina FS. Intestinal inflammation and the enterocyte transportome. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(4):1096-101.
691. Martinez-Augustin O, Romero-Calvo I, Suarez MD, Zarzuelo A, Sanchez de Medina F. Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2009;15:114-27.
692. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(6):C1213-28. Epub 2004/05/21.
693. Shen L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1258:9-18. Epub 2012/06/27.
694. Markov AG. [Claudins as tight junction proteins: the molecular element of paracellular transport]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2013;99(2):175-95. Epub 2013/05/09.
695. Byun EB, Yang MS, Choi HG, Sung NY, Song DS, Sin SJ, et al. Quercetin negatively regulates TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide through Tollip expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;431(4):698-705. Epub 2013/01/29.
696. Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(19):2964-78. Epub 2008/06/07.
697. Galijatovic A, Walle UK, Walle T. Induction of UDP-glucuronosyltransferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells. *Pharm Res.* 2000;17(1):21-6. Epub 2000/03/14.
698. Stenson WF. Prostaglandins and epithelial response to injury. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(2):107-10. Epub 2007/02/03.
699. Brown SL, Riehl TE, Walker MR, Geske MJ, Doherty JM, Stenson WF, et al. Myd88-dependent positioning of *Ptgs2*-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury. *J Clin Invest.* 2007;117(1):258-69. Epub 2007/01/04.
700. Zamuner SR, Warriar N, Buret AG, MacNaughton WK, Wallace JL. Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. *Gut.* 2003;52(12):1714-20. Epub 2003/11/25.



701. Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(1):G238-44. Epub 2000/07/18.
702. Weylandt KH, Kang JX, Wiedenmann B, Baumgart DC. Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(6):797-9. Epub 2007/01/31.
703. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*. 2000;164(2):966-72. Epub 2000/01/07.
704. Kim JS, Narula AS, Jobin C. Salvia miltiorrhiza water-soluble extract, but not its constituent salvianolic acid B, abrogates LPS-induced NF-kappaB signalling in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(2):288-97. Epub 2005/07/06.
705. Cheon JH, Kim JS, Kim JM, Kim N, Jung HC, Song IS. Plant sterol guggulsterone inhibits nuclear factor-kappaB signaling in intestinal epithelial cells by blocking IkappaB kinase and ameliorates acute murine colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(12):1152-61. Epub 2006/11/23.
706. Grishin AV, Wang J, Potoka DA, Hackam DJ, Upperman JS, Boyle P, et al. Lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 in intestinal epithelium via a noncanonical p38 MAPK pathway. *J Immunol*. 2006;176(1):580-8. Epub 2005/12/21.
707. Yan SR, Joseph RR, Wang J, Stadnyk AW. Differential pattern of inflammatory molecule regulation in intestinal epithelial cells stimulated with IL-1. *J Immunol*. 2006;177(8):5604-11. Epub 2006/10/04.
708. Gasparian AV, Guryanova OA, Chebotaev DV, Shishkin AA, Yemelyanov AY, Budunova IV. Targeting transcription factor NFkappaB: comparative analysis of proteasome and IKK inhibitors. *Cell Cycle*. 2009;8(10):1559-66. Epub 2009/04/18.
709. Gao M, Cao Q, Luo LH, Wu ML, Hu WL, Si JM. [NOD2/CARD15 gene polymorphisms and susceptibility to Crohn's disease in Chinese Han population]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2005;44(3):210-2. Epub 2005/04/21.
710. Yoshida H, Miura S, Kishikawa H, Hirokawa M, Nakamizo H, Nakatsumi RC, et al. Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells. *J Nutr*. 2001;131(11):2943-50. Epub 2001/11/06.
711. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(9):3652-6. Epub 1994/04/26.
712. Yamashiro S, Kamohara H, Yoshimura T. MCP-1 is selectively expressed in the late phase by cytokine-stimulated human neutrophils: TNF-alpha plays a role in maximal MCP-1 mRNA expression. *J Leukoc Biol*. 1999;65(5):671-9. Epub 1999/05/20.

ANEXO

## 1. Abreviaturas

APC: antigen presenting cell; célula presentadora de antígenos

BMDM: bone marrow derived macrophages; macrófagos derivados de médula ósea

CD: cluster of differentiation

COX: cyclooxygenase; ciclooxygenasa

CU: colitis ulcerosa

DAI: disease activity index

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: deoxyribonucleic acid; ácido desoxiribonucleico

DSS: dextran sodium sulphate; sulfato de dextrano sódico

EC: enfermedad de Crohn

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

ERK: extracellular-regulated kinase; quinasa regulada extracelularmente.

Foxp3: forkhead box P3

ICAM: intercelular adhesion molecule; molécula de adhesión intercelular

IFN $\gamma$ : interferon gamma

IL-1R: interleukin 1 receptor; receptor de interleucina 1

I $\kappa$ B: inhibitor of kappa B; inhibidor de NFkappaB

IKK: I $\kappa$ B kinase; quinasa de I $\kappa$ B

IL: interleucina

iNOS: inducible nitric oxid sintase; óxido nítrico sintasa inducible

IRAK: interleukin-1 receptor-associated kinase; quinasa asociada al receptor de IL1

JAK: janus kinase

JNK: c-jun N-terminal kinase

LOX: lipooxygenase; lipooxygenasa

LPS: lipopolisacárido; lipopolisacárido

LTB $_4$ : leucotrieno B $_4$

MAPK: mitogen activated protein kinase; proteína quinasa activada por mitógenos

MMP3: matrix metalloproteinase-3; metaloproteínasa de la matriz 3

MPO: myeloperoxidase; mieloperoxidasa

MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88; gen primario de respuesta a la diferenciación mielóide

NFAT: nuclear factor of activated T-cells; factor nuclear de células T activadas

NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: nitric oxid; óxido nítrico

NOD: nucleotide-binding oligomerization domain containing 2

REG3 $\gamma$ : regenerating islet-derived 3 $\gamma$

RNA: ribonucleic acid

ROS: reactive oxygen species; especies reactivas del oxígeno

S100A8: S100 calcium binding protein A8

STAT: signal transducer and activator of transcription; transductor de la señal y activador de la transcripción

TAK1: TGF $\beta$  activated kinase 1; quinasa 1 activada por TGF $\beta$

TCR: T cell receptor; receptor de linfocitos T

TRAF-6: TNF receptor associated factor-6; factor asociado al receptor de TNF-6

TGF $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; factor transformador de crecimiento  $\beta$

TLR: Toll-like receptor; receptores tipo Toll

TNBS: trinitrobenzenesulphonic acid, ácido trinitrobenzeno sulfónico

TNF: tumor necrosis factor; factor de necrosis tumoral

TNFR: tumor necrosis factor receptor; receptor del factor de necrosis tumoral

TRAF: TNF-receptor-activated factor; factor de activación del receptor de TNF

VCAM: vascular cell adhesion molecule 1; molécula de adhesión en el endotelio vascular

## 2. Índice de tablas

**Tabla 1:** Estructura y numeración de los flavonoides.

**Tabla 2:** Características clínicas de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

**Tabla 3:** Modelos transgénicos de EII.

**Tabla 4:** Criterios establecidos para el índice macroscópico en el modelo de colitis por TNBS

**Tabla 5:** Criterios establecidos para el índice macroscópico en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria

**Tabla 6:** Criterios establecidos para el índice macroscópico en el modelo de ileítis por TNBS

**Tabla 7:** Efecto de la rutina p.o. sobre evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de TNBS en rata. Datos expresados como media  $\pm$  SEM (n=4-8). +p<0.05 frente a grupo control; \*p<0.05 frente a grupo TNBS.

**Tabla 8:** Efecto de la quercetina i.p. en la evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de colitis por TNBS en rata. Datos expresados como  $\pm$  SEM (n=4-6). \*p<0.05 frente a grupo control.

**Tabla 9:** Efecto de la rutina p.o. sobre evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de TNBS en rata. Datos expresados como media  $\pm$  SEM (n=4-8). +p<0.05 frente a grupo control; \*p<0.05 frente a grupo TNBS.

**Tabla 10:** Efecto de la rutina i.p. en la evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de colitis por TNBS en rata. Datos expresados como media  $\pm$  SEM (n=4-8). +p<0.05 frente a grupo control; \*p<0.05 frente a grupo TNBS.

**Tabla 11:** Efecto de la rutina p.o. en la evolución de pesos y parámetros de daño macroscópico en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria en ratón. Datos expresados como  $\pm$  SEM (n=6-10). \*p<0.05 frente a grupo No transfer. \*p<0.05 frente a grupo Control.

## 3. Índice de Imágenes y esquemas

Imagen 1: Anatomía del sistema inmune intestinal.

Imagen 2: Reconocimiento de PAMPs por los diferentes TLR.

Imagen 3: Expresión polarizada de los TLR en IECs.

Imagen 4: Señalización por TNFR1 y IL-1R.

**Imagen 5:** Cambios macroscópicos de colon. Fotografías de colon diseccionado de ratones C57 transferidos con células T CD4+CD62L+ (izquierda del panel) y ratones C57 transferidos con células T CD4+CD62L+ tratados con rutina (derecha del panel).

**Esquema 1:** Diseño experimental en el modelo de colitis por TNBS

**Esquema 2:** Diseño experimental en el modelo de ileítis por TNBS

**Esquema 3:** Diseño experimental en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria

#### 4. Índice de Figuras

**Figura 1:** Evolución de los animales en el modelo de colitis por TNBS. (A) Peso corporal, % del peso inicial. (B) Consumo de comida, gramos de comida consumidos por animal al día. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 2:** Actividades enzimáticas en el tejido colónico e ileal (A) MPO (mU/mg prot), (B) AP (mU/mg prot), (C) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP), (D) AP (mU/mg prot), (E) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; + P<0,05, frente a Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 3:** Expresión de COX2 en el tejido colónico, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 4:** Expresión génica en el tejido colónico medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 5:** Producción *ex vivo* de citoquinas y expresión de marcadores en células de ganglios linfáticos mesentéricos. (A) a nivel basal, los datos se expresan como incremento frente al grupo control; Control=105.5pg/ml (TNF- $\alpha$ ) y 145.6pg/ml (IFN $\gamma$ ); (B) estimuladas con concanavalina A (5  $\mu$ g/ml), los datos se expresan como incremento frente al grupo control; Control=1766.8pg/ml (TNF- $\alpha$ ) y 54617.7pg/ml (IFN $\gamma$ ); (C) número total de células; (D) y (E) expresión de CD4 y CD8 $\alpha$ , detectada por FACs., media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 6:** Evolución de peso corporal, % del peso inicial. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 7:** Actividades enzimáticas en el tejido colónico (A) MPO (mU/mg prot), (B) AP (mU/mg prot) y (C) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; + P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 8:** Expresión génica en el tejido colónico medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 9:** Producción de citoquinas por parte de células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos. (A) a nivel basal, los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo Control; Control=11.8pg/ml (TNF- $\alpha$ ) y 5.6pg/ml (IFN $\gamma$ ); (B) estimuladas con concanavalina A (5  $\mu$ g/ml), los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo Control; Control=1214.3pg/ml (TNF- $\alpha$ ) y 22935.7pg/ml (IFN $\gamma$ ); media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a Control; \*<0,05, frente a TNBS. Bude=Budesonida; Rut=Rutina.

**Figura 10:** Evolución de peso corporal, % del peso inicial. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

**Figura 11:** Actividades enzimáticas en el tejido ileal (A) MPO (mU/mg prot), (B) AP (mU/mg prot) y (C) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; + P<0,05, frente a Control; \*<0,05, frente a TNBS. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

**Figura 12:** Expresión génica en el tejido ileal medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo TNBS, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

**Figura 13:** Producción de citoquinas por parte de células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos. (A) a nivel basal, los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo control; Control=27.3pg/ml (TNF- $\alpha$ ), 23.2pg/ml (IFN $\gamma$ ) y 30.8pg/ml (IL-2); (B) estimuladas con concanavalina A (5  $\mu$ g/ml), los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo control; Control=899.4pg/ml (TNF- $\alpha$ ), 41369.2pg/ml (IFN $\gamma$ ) y 21297.8pg/ml (IL-2); media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a TNBS. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

**Figura 14:** Niveles de rutina y quercetina en las mucosas colónica e ileal de ratas no colíticas tras la administración de los flavonoides. Concentraciones cuantificadas por HPLC-MS/MS 3, 5 o 7 horas tras administración, seguido de 2 días de pretratamiento, los datos se expresan como pmol/g tejido; media  $\pm$  SEM. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

**Figura 15:** Evolución de peso corporal, % del peso inicial. Rut=Rutina.

**Figura 16:** Imágenes histológicas (10X) de muestras colónicas procesadas y teñidas con Hematoxilina/Eosina (A) Grupo No transfer (no colítico) (B) Grupo Control (colítico no tratado) (C) Grupo Rutina

**Figura 17:** Actividades enzimáticas en el tejido colónico (A) MPO (mU/mg prot), (B) AP (mU/mg prot) y (C) sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; +P<0,05, frente a. No transfer; \*<0,05, frente a Control. Rut=Rutina; Quer=Quercetina.

**Figura 18:** Expresión de COX2 en el tejido colónico, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; Rut=Rutina.

**Figura 19:** Expresión génica en el tejido colónico medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo No transfer, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. No transfer; \*<0,05, frente a Control. Rut=Rutina.

**Figura 20:** Producción de citoquinas por parte de células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos. (A) a nivel basal, los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo No transfer; No transfer=98.8pg/ml (IFN $\gamma$ ), 92.9pg/ml (TNF- $\alpha$ ), 11.1pg/ml (IL-6), 8.2pg/ml (IL-17) y 15.2pg/ml (IL-10); (B) estimuladas con concanavalina A (5  $\mu$ g/ml), los datos se expresan como incremento (tanto por 100) frente al grupo No transfer; No transfer=5138.9pg/ml (IFN $\gamma$ ), 532.9pg/ml (TNF- $\alpha$ ), 498.1pg/ml (IL-6), 1288.2pg/ml (IL-17) y

1172.3pg/ml (IL-10) media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. No transfer; \*<0,05, frente a Control. Rut=Rutina.

**Figura 21:** Concentración de citoquinas en plasma. Los valores se expresan como incremento frente a dicho grupo. + P<0,05, frente a. No tranfer; \* P<0,05, frente a. Control. Rut=Rutina.

**Figura 22:** Expresión génica en células CD4+ de bazo medido por PCR a tiempo real. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; Rut=Rutina.

**Figura 23:** Expresión de (A) pStat4 y (B) p-IkBa en células CD4+ de bazo, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; Rut=Rutina.

**Figura 24:** Expresión basal de COX2 en IEC18, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como incremento respecto a células no tratadas (media  $\pm$  SEM). + P<0,05, frente a. Control. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaemferol; Quer=Quercetina.

**Figura 25:** Efecto de los flavonoides sobre NF-kB. (A) Efecto de LPS y quercetina sobre la fosforilación de IkBa y la translocación nuclear de p50/p65 en IEC18 medido por Western blot (B) Efecto quercetina en la translocación nuclear de Rel B, C-Rel y p52 en IEC18 medido por ELISA (C) Efecto del LPS (con y sin Bay 11-7805) y quercetina en la fosforilación de Akt en IEC18 medido por Western blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control. Quer=Quercetina; LPS=Lipopolisacárido.

**Figura 26:** Expresión de COX2 bajo estimulación de LPS en IEC18, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaemferol; Quer=Quercetina.

**Figura 27:** Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de IkBa medida por Western blot. Se usaron proteínas citoplasmáticas para medir p-IkBa. Tras 1h de pretratamiento con el flavonoide, se añadió LPS a 1 $\mu$ g/ml durante 30 minutos. (A) Efecto LPS  $\pm$  Bay 11-7805. (B) Efectos flavonoides. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaemferol; Quer=Quercetina.

**Figura 28:** Efecto de los flavonoides sobre la translocación al núcleo de p50 y p65 medida por Western blot. Se usaron proteínas nucleares para medir p50 y p65. Tras 1h de pretratamiento con el flavonoide, se añadió LPS a 1 $\mu$ g/ml durante 30 minutos. (A) Efecto LPS  $\pm$  Bay 11-7805. (B) Efectos flavonoides. Los valores han sido referidos a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaemferol; Quer=Quercetina.



**Figura 29:** Efecto de los flavonoides sobre MAPK quinasas medido por Western blot. Se usaron proteínas citoplasmáticas para medir pERK, p-p38 y p-JNK. Tras 1h de pretratamiento con el flavonoide, se añadió LPS a 1µg/ml durante 30 minutos. (A) Efecto LPS ± inhibidores. (B) Efectos flavonoides. Los valores han sido referidos a la expresión de β-actina. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Hesp=Hesperetina; Kaem=Kaemferol; Quer=Quercetina.

**Figura 30:** Efecto de los inhibidores de NF-κB y MAPK quinasas sobre la expresión de COX2 medido por Western blot. Los valores han sido referidos a la expresión de β-actina. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. LPS=Lipopolisacárido.

**Figura 31:** Secreción de MCP-1 medido por ELISA en IEC18 a nivel basal. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a Control; \* P<0,05, frente a Estímulo. Control=10050.6 pg/ml; LPS=458667.4 pg/ml; Flagelina=701218.3 pg/ml; PDG=88424.9pg/ml; CpG=80063 pg/ml; TNF=530860.3 pg/ml; IL-1β=62573.9 pg/ml; MDP=69828.6 pg/ml; LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido.

**Figura 32:** Efecto de las flavonas sobre IEC18 medido por ELISA. (A) A nivel basal (B) Bajo estimulación lipopolisacárido (C) Bajo estimulación Flagelina (D) Bajo estimulación Peptidoglicano (E) Bajo estimulación CpG (F) Bajo estimulación TNF-α (G) Bajo estimulación IL-1β (H) Bajo estimulación Muramildipéptido. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido; Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina.

**Figura 33:** Efecto de la crisina sobre IEC18 silenciadas medido por ELISA. (A) Control de silenciamiento específico para TLR4 (B) Control de silenciamiento específico para MyD88 (C) Efecto crisina sobre IEC18 silenciadas para TLR4 (D) Efecto crisina sobre IEC18 silenciadas para MyD88. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; Flagelin=Flagelina; Cris=Crisina;

**Figura 34:** Efecto de la luteolina sobre el daño epitelial inducido por DSS (2% y 4%) *in vitro* medido por permeabilidad a FITC-Dextrano. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. Lut=Luteolina.

**Figura 35:** Expresión génica en IEC18 medida por PCR a tiempo real. El “fold change” se calculó refiriendo el incremento de Ct al grupo Control. Los datos se expresan media ± SEM. +P<0,05, frente a. Control. Lut=Luteolina.

**Figura 36:** Efecto de los flavonoles sobre IEC18 medido por ELISA. (A) A nivel basal (B) Bajo estimulación lipopolisacárido (C) Bajo estimulación Flagelina (D) Bajo estimulación Peptidoglicano (E) Bajo estimulación CpG (F) Bajo estimulación TNF-α (G) Bajo estimulación IL-1β (H) Bajo estimulación Muramildipéptido. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo.

LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido; Kaem=Kaempferol; Quer=Quercetina.

**Figura 37:** Efecto de la quercetina sobre IEC18 silenciadas medido por ELISA. (A) Control de silenciamiento específico para TLR4 (B) Control de silenciamiento específico para MyD88 (C) Efecto quercetina sobre IEC18 silenciadas para TLR4 (D) Efecto quercetina sobre IEC18 silenciadas para MyD88. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; Flagelin=Flagelina; Quer=Quercetina;

**Figura 38:** Efecto de la quercetina sobre el daño epitelial inducido por DSS (2% y 4%) *in vitro* medido por permeabilidad a FITC-Dextrano. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Quer=Quercetina.

**Figura 39:** Expresión génica en IEC18 medida por PCR a tiempo real. El “fold change” se calculó refiriendo el incremento de Ct al grupo Control. Los datos se expresan media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control. Quer=Quercetina.

**Figura 40:** Efecto de las isoflavonas sobre IEC18 medido por ELISA. (A) A nivel basal (B) Bajo estimulación lipopolisacárido (C) Bajo estimulación Flagelina (D) Bajo estimulación Peptidoglicano (E) Bajo estimulación CpG (F) Bajo estimulación TNF- $\alpha$  (G) Bajo estimulación IL-1 $\beta$  (H) Bajo estimulación Muramildipéptido. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína.

**Figura 41:** Efecto de metabolitos de la quercetina sobre IEC18 medido por ELISA. (A) A nivel basal (B) Bajo estimulación lipopolisacárido (C) Bajo estimulación Flagelina (D) Bajo estimulación Peptidoglicano (E) Bajo estimulación CpG (F) Bajo estimulación TNF- $\alpha$  (G) Bajo estimulación IL-1 $\beta$  (H) Bajo estimulación Muramildipéptido. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. LPS=Lipopolisacárido; PDG=Peptidoglicano; MDP=Muramildipéptido; Iso=Isoramnetina; Taxi=Taxifolina.

**Figura 42:** Secreción de GRO- $\alpha$  medido por ELISA en IEC18 a nivel basal. (A) Flavonas (B) Flavonoles (C) Isoflavonas (D) Metabolitos. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. Estímulo. Cris=Crisina; Diosm=Diosmetina; Lut=Luteolina; Api=Apigenina; Kaem=Kaempferol; Quer=Quercetina; Daid=Daidzeína; Geni=Genisteína; Iso=Isoramnetina; Taxi=Taxifolina.

**Figura 43:** Efecto de la quercetina y rutina (0.01 $\mu$ M a 1 $\mu$ M) sobre la secreción de citoquinas por linfocitos T aislados medida por ELISA. (A) Secreción de IFN $\gamma$  (B) Secreción de TNF- $\alpha$  (C) Secreción de IL-2. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*P<0,05, frente a. ConA; ConA=Concanavalina A; Quer=Quercetina; Rut=Rutina.

**Figura 44:** Efecto de la quercetina (0.01 $\mu$ M a 1 $\mu$ M) sobre la secreción de citoquinas por linfocitos Th1 aislados y diferenciados con IL-12, medida por ELISA (A) Secreción de IFN $\gamma$  (B) Secreción de IL-2 Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +P<0,05, frente a. ConA; \*P<0,05, frente a. IL-12; ConA=Concanavalina A; Quer=Quercetina

**Figura 45:** Efecto de la quercetina y rutina (0.01µM a 50µM) sobre la proliferación linfocitaria, medida por captación de timidina-[H<sup>3</sup>] (A) En condiciones basales (B) Bajo estimulación con ConA. Los datos se expresan como media ± SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*P<0,05, frente a. ConA; ConA=Concanavalina A; Quer=Quercetina; Rut=Rutina.

**Figura 46:** Secreción de citoquinas en cocultivo (Transwell®) enterocito-linfocito T. Los datos muestran la secreción por parte de los linfocitos T dispuestos en el compartimento inferior y estimulados con Con A. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina.

**Figura 47:** Expresión génica en linfocitos T dispuestos en cocultivo (Transwell®) enterocito-linfocito T, medida por PCR a tiempo real. El “fold change” se calculó refiriendo el incremento de Ct al grupo LPS. Los datos se expresan media ± SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*<0,05, frente a LPS. Quer=Quercetina.

**Figura 48:** Expresión de pStat4 en células linfocitos T cultivados basolateralmente en sistema cocultivo, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de Stat4. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina

**Figura 49:** Efecto de la quercetina (0.01µM a 1µM) sobre la proliferación de linfocitos basolaterales dispuestos en sistema cocultivo, medida por captación de timidina-[<sup>3</sup>H] (A) En condiciones basales (B) Bajo estimulación con ConA. Los datos se expresan como media ± SEM. +P<0,05, frente a. Control; \*P<0,05, frente a. LPS; ConA=Concanavalina A; LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina

**Figura 50:** Efecto de la quercetina (1 y 10µM) sobre la apoptosis de linfocitos basolaterales dispuestos en sistema cocultivo, medida por el ensayo de yoduro de propidio por FACs; Q=Quercetina.

**Figura 51:** Secreción de citoquinas en cocultivo (Transwell®) IEC18 silenciadas para TLR4-linfocito T. Los datos muestran la secreción por parte de los linfocitos T dispuestos en el compartimento inferior y estimulados con Con A. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina.

**Figura 52:** Secreción apical y basolateral de MCP-1 (A) y GRO-α (B) por IEC18 expuestas a quercetina en la cara apical o basolateral, medida por ELISA. Los datos se expresan como media ± SEM. Quer=Quercetina; BL=Basolateral.

**Figura 53:** Secreción basolateral de IFNγ (A) y MCP-1 (B) por IEC18 expuestas a quercetina en la cara apical, medida por ELISA. Los datos se expresan como media ± SEM. Quer=Quercetina; LPS=Lipopolisacárido.

**Figura 54:** Secreción basolateral de IEC18 expuestas a quercetina (10µM) en la cara apical, medida por inmunoensayo. Valores referidos al grupo Control. Los datos se expresan como media ± SEM. Q=Quercetina; LPS=Lipopolisacárido.

**Figura 55:** Secreción de IFN $\gamma$  en esplenocitos extraídos de ratones WT y TLR4 KO. Los valores han sido referidos al Control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. + P<0,05, frente a. Control; \* P<0,05, frente a. LPS. LPS=Lipopolisacárido; Quer=Quercetina, WT=Wild type; KO=Knock out; TLR4=Toll like receptor 4.

