

Universidad de Granada

Facultad de Farmacia

Departamentos de Farmacología y de  
Nutrición y Bromatología



**Influencia del efecto prebiótico de dos fibras  
vegetales con diferentes propiedades  
fermentativas en un modelo de colitis  
experimental en ratas**

Tesis Doctoral para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia  
presentada por:

**Carlos Pérez Roca**

2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Carlos Pérez Roca  
D.L.: GR 794-2011  
ISBN: 978-84-694-0175-0



D. Julio Gálvez Peralta, Profesor Titular y Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada,

Certifica que:

El trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Influencia del efecto prebiótico de dos fibras vegetales con diferentes propiedades fermentativas en un modelo de colitis experimental en ratas” ha sido realizado por el Licenciado en Farmacia Carlos Pérez Roca en los laboratorios de este departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 27 de Septiembre de 2010.

Dr. Julio Gálvez Peralta

D. Antonio Zarzuelo Zurita, Profesor Catedrático  
Departamento de Farmacología de la Universidad de Gra

D. Julio Gálvez Peralta, Profesor Catedrático del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, y Dña. Belén García-Villanova Ruiz , Profesora Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada, como directores

Certifican que: La Tesis Doctoral titulada: “Influencia del efecto prebiótico de dos fibras vegetales con diferentes propiedades fermentativas en un modelo de colitis experimental en ratas” presentada por el Licenciado en Farmacia Carlos Pérez Roca, ha sido llevada a cabo bajo su dirección y reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para ser defendida y optar al grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a de 27 de Septiembre de 2010.

Dr. Antonio Zarzuelo Zurita

Dr. Julio Gálvez Peralta

Dra. Belén García-Villanova Ruiz



*A mi mujer y a mi hijo*

*A mis padres y hermanos*

*Tanta prisa tenemos por hacer, escribir y dejar oír nuestra voz en el silencio de la eternidad, que olvidamos lo único realmente importante: vivir.*

*Robert Louis Stevenson*

---

Tras casi cuatro años de esfuerzo, parece que el túnel de la Tesis que al principio era oscuro e incierto, ahora parece tornarse claro y permite intuir el final de una etapa en mi vida y el comienzo de otra. Aunque duros, afortunadamente han sido años más llenos de luces que de sombras, debido fundamentalmente a todas las personas que me han ayudado y gracias a las cuales ha sido posible la realización de esta Tesis. Por eso y por mucho más quiero daros las gracias.

En primer lugar a mis tres excelentes directores de Tesis:

A D. Antonio Zarzuelo Zurita, que desde el primer día me abrió de par en par las puertas del Departamento para realizar la Tesis bajo su tutela, aportando su gran experiencia, capacidad didáctica y clarividencia científica.

A D. Julio Gálvez Peralta, por ayudarme de principio a fin en todas las etapas de esta Tesis, por hacerme lo difícil, fácil, por la claridad en sus

explicaciones, por la paciencia en mis preguntas y sobre todo por ser un gran caballero y una bella persona.

A Belén García-Villanova Ruiz, por su gran honestidad y por prestarme en todo momento su atención, aportando múltiples ideas y soportando pacientemente los cambios de rumbo que ha ido tomando esta Tesis.

Aparte de los a magníficos directores, quiero dar las gracias a todos los miembros del Dpto. de Farmacología, que desde el primer día y llegando como un extraño, me acogieron como uno más, haciendo mi trabajo más fácil y ameno. Atesoro de ellos magníficos recuerdos que siempre recordaré con cariño:

A Belén, por sus divertidas enseñanzas en el laboratorio, armándose de paciencia al enseñarme y repetir distintas técnicas y cálculos. Gracias por permitirme robar parte de tu tiempo para enseñarme tantas cosas. Has sido un gran a apoyo.

A las veteranas M<sup>te</sup> Helena y Desi, por ser tan trabajadoras, serviciales y amables y por enseñarme gran parte de lo que he aprendido.

A la Dra. Mercedes González, por su enorme ayuda en todas las tareas cotidianas del laboratorio.

A Elvira, porque además de ser trabajadora y constante, con su simpatía me ha sabido dar excelentes consejos a la hora de realizar distintas determinaciones.

A Marga, Nati y Mónica, porque aún coincidiendo pocos meses en el Dpto. ya que tenía más avanzada la Tesis, no dudasteis en ningún momento en ayudarme los días de sacrificio de los animales. Muchas gracias por vuestra ayuda.

A Pilar Utrilla por haber pospuesto sus propias investigaciones para ayudarme los días de sacrificio y por mostrarme siempre su gran afectividad.

A Pedro, por brindarme en todo momento su ayuda y colaborar activamente en muchas de las determinaciones analíticas y en el cuidado de los animales.

A Eduardo Guerra, por recibirme siempre en su despacho con una amable sonrisa dispuesto a ayudarme en lo que fuera.

A Loli Ruiz, por estar siempre interesada por la marcha de la Tesis y resolver pequeños problemas para agilizar su finalización. Muchas gracias.

A todos mis compañeros de Verbiotech I+D+i: Lola, Patricia y Alicia, por haberme apoyado en los momentos duros durante la realización

de la Tesis o en las tareas cotidianas del trabajo, siendo comprensivas en mis ausencias del mismo aun suponiendo una pequeña carga más de trabajo para ellas.

A Javier Alcalá, por haber apostado desde el primer momento por la realización de la Tesis y haberme permitido su realización compaginándola con mi trabajo.

A mi padre, por ser la persona que más ayuda me ha brindado y más me ha apoyado tanto científica como animicamente, sin él esta Tesis no hubiera sido posible. Nunca tendré palabras para agradecerte toda tu ayuda.

A mi madre, porque aún estando "escondida en un segundo plano del mundo científico" sé que me apoyaba y preocupaba por mí. Seguro que parte de su energía me ha dado fuerzas para terminar ésta Tesis. Gracias por apoyarme y animarme cada día a seguir luchando.

A mi familia, que siempre ha estado a mi lado. A mis hermanos, gracias por vuestro afecto y por haberos interesado por el rumbo de mi Tesis.

A mi mujer, porque ha caminado conmigo de la mano desde que empecé la Tesis cuando éramos novios hasta que la he finalizado ya casado.

*Gracias por haberme apoyado en todos los momentos y por haberme regalado parte de tu tiempo para dedicárselo a la Tesis, Gracias por tu paciencia y comprensión.*

*A mi hijo Carlos, por ser mi inspiración y fuerza.*

*A todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis, muchas gracias.*



## ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	<b>13</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>7</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>19</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>26</b>
<b>Listado de abreviaturas</b> .....	<b>30</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>34</b>
1. La Enfermedad Inflamatoria intestinal .....	34
1.1 Etiopatogenia .....	36
1.2 Factores dietéticos de riesgo en la EII.....	37
1.3 Papel de los antioxidantes y la fibra en la EII .....	40
2. La fibra dietética. Concepto y propiedades generales.....	48
2.1 Efectos fisiológicos de la fibra dietética sobre el aparato digestivo.....	54
2.1.1 Efectos de la fibra dietética sobre el estómago ..	54
2.1.2 Efectos de la fibra dietética sobre el intestino delgado.....	55
2.1.3 Efectos de la fibra sobre el colon.....	55

3. Fibra y salud .....	59
4. La fibra y la EII .....	62
<b>Objetivos .....</b>	<b>70</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>76</b>
1. Evaluación del efecto prebiótico tras la administración de los productos objeto de ensayo .....	77
1.1 Productos objeto de ensayo .....	77
1.2 Reactivos .....	77
1.3. Animales de experimentación .....	77
1.4 Diseño experimental .....	78
2. Inducción de colitis experimental mediante ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) y administración de los productos objeto de ensayo .....	80
2.1. Productos objeto de ensayo.....	80
2.2 Reactivos .....	80
2.3. Animales de experimentación .....	80
2.4 Diseño experimental .....	81
3. Evaluación del efecto prebiótico de las fibras.....	84

3.1 Determinación del porcentaje de agua en heces .....	84
3.2 Determinación de los valores de pH en heces .....	84
3.3 Determinaciones bacterianas en heces .....	84
4. Evaluación de efecto antiinflamatorio intestinal en el modelo de TNBS de colitis en ratas .....	86
4.1. Valoración del proceso inflamatorio intestinal .....	86
4.2 Estudios histológicos.....	87
4.3 Determinaciones bioquímicas .....	89
4.3.1 Determinación de la actividad mieloperoxidasa ....	89
4.3.2. Determinación de la biosíntesis colónica de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	91
4.3.3 Determinación de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible .....	91
4.3.4 Extracción y cuantificación de ARN total.....	93
4.3.5 Determinación de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC) .....	95
4.3.6 Estudios microbiológicos.....	96
<b>Resultados .....</b>	<b>99</b>

1. Evaluación del efecto prebiótico de la combinación de oligosacáridos y almidón resistente en animales sanos .....	99
1.1 Parámetros Generales.....	99
1.2 Evaluación del peso de las heces y de su contenido en agua.....	101
1.3 Determinación del pH en los contenidos intestinales ..	103
1.4 Evaluación de la flora bacteriana .....	104
1.5 Evaluación de la expresión colónica de TFF-3 y MUC-2.....	105
2. Actividad antiinflamatoria intestinal de la combinación de fructooligosacáridos y almidón resistente en el modelo de colitis experimental inducida mediante TNBS en ratas .....	108
2.1 Caracterización del modelo de colitis experimental.....	108
2.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria intestinal de las fibras dietéticas y sus asociaciones.....	119
2.2.1 Parámetros Macroscópicos .....	119
2.2.2 Parámetros Histológicos .....	121
2.2.3 Parámetros Bioquímicos.....	126
2.2.4 Análisis Microbiológico.....	133

2.2.5 Determinación de Ácidos Grasos de Cadena Corta AGCC) .....	135
<b>Discusión .....</b>	<b>139</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>168</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>172</b>



**Índice de figuras**

**Fig. 1.1** Imagen anatomopatológica de la colitis ulcerosa.. **35**

**Fig. 1.2** Imagen anatomopatológica de la Enfermedad de Crohn..... **35**

**Fig. 2.1** Principales lugares de afectación en la Enfermedad de Crohn..... **36**

**Fig. 2.2** Principales lugares de afectación en la Colitis ulcerosa ..... **36**

**Fig. 3.** Esquema de los efectos de los AGCC producidos por la fermentación de la fibra dietética por la flora bacteriana colónica sobre el organismo..... **58**

**Fig. 4** Pirámide de la dieta mediterránea..... **62**

**Fig. 5** Diseño experimental del Estudio del efecto prebiótico (sombreado verde) y de la actividad antiinflamatoria (sombreado azul) de ambas fibras ..... **83**

**Fig. 6** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (BENEO®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, en el incremento de peso de ratas ..... **100**

**Fig. 7** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (BENEO®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-

2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, sobre la ingesta de alimentos ..... 101

**Fig. 8** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (BENEO®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, en el contenido en agua (%) de las heces ..... 102

**Fig. 9.1** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo ®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol ® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, sobre los marcadores con función de barrera del colon, MUC-2 y TFF-3 ..... 106

**Fig. 9.2** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo ®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol ® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, sobre los marcadores de función de barrera del colon MUC-2 ..... 106

**Fig. 9.3** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo ®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol ® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, sobre los marcadores de función de barrera del colon TFF-3 ..... 107

**Fig. 10** Expresión de la iNOS en el grupos sano y control instilado con TNBS ..... 115

**Fig. 11** Expresión de la citocina IL-10 en el grupo sano y el control instilado con TNBS analizada por RT-PCR ..... 115

**Fig. 12** Expresión de la citocina IL-17 en el grupo sano y el control instilado con TNBS analizada por RT-PCR ..... 116

**Fig. 13** Expresión de la ICAM-1 en el grupo sano y el control instilado con TNBS analizada por RT-PCR ..... 116

**Fig. 14** Expresión de CIC-1 en el grupo sano y el control instilado con TNBS analizada por RT-PCR ..... 116

**Fig. 15** Expresión de CIC-1 en el grupo sano y el control instilado con TNBS analizada por RT-PCR..... 117

**Fig. 16** Expresión de CNIC-1 en el grupo sano y el control instilado con TNBS analizada por RT-PCR ..... 117

**Fig. 17** Estudio histológico comparativo de los FOS vs los animales sanos y los controles instilados con TNBS..... 121

**Fig. 18** Estudio histológico comparativo del Almidón Resistente vs los animales sanos y los controles instilados con TNBS. .... 124

**Fig. 19** Estudio histológico comparativo de la mezcla de las fibras vs los animales sanos y los controles instilados con TNBS ..... 125

**Fig. 20** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS en ratas, sobre la producción de MPO ..... 127

**Fig. 21** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS en ratas, sobre la producción de TNF- $\alpha$  ..... 128

**Fig. 22** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS en ratas, sobre la producción de IL-1 $\beta$  ..... 128

**Fig. 23.** Expresión de la iNOS analizada por RT-PCR ..... 129

**Fig. 24** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS..... 130

**Fig. 25** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS en ratas, sobre la expresión de genes de CINC-1 ...  
..... 130

**Fig. 26** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS en ratas, sobre la expresión de genes de MCP-1..... 131

**Fig. 27** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS en ratas, sobre la expresión de genes de ICAM-1 ..... 131

**Fig. 28** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS en ratas, sobre la expresión de genes de IL-10..... 132

**Fig. 29** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), en la colitis inducida por TNBS en ratas, sobre la expresión de genes de TFF-3 ..... 132

**Fig. 30** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día), sobre la relación de

**bacterias beneficiosas / bacterias patógenas en los contenidos colónicos ..... 134**

**Fig. 31 Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día), sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta AGCC (acetato, propionato y butirato en los contenidos intestinales en el modelo de colitis experimental en ratas inducida por TNBS ..... 136**

**Fig. 32 Efectos beneficios\_/patógenos de algunas bacterias en el intestino grueso ..... 142**



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1. Prevalencia de deficiencias nutricionales en la EII</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 2. Componentes mayoritarios de la fibra dietética. ..</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 3. Solubilidad y fermentabilidad de las fibras .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabla 4. Escala de valoración del índice de daño macroscópico (IDM) descrito por Bell et al., (1995) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas</b>	<b>87</b>
<b>Tabla 5. Escala de valoración del daño histológico descrita por Stucchi et al., (2000) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas .....</b>	<b>88</b>
<b>Tabla 6. Secuencias Primarias utilizadas para la reacción en cadena de la polimerasa .....</b>	<b>93</b>
<b>Tabla 7. Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día), a las dos semanas, sobre el porcentaje de agua y valores de pH en los contenidos del ciego y colon en las ratas .....</b>	<b>103</b>
<b>Tabla 8. Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día), durante dos semanas, sobre las concentraciones de lactobacilos y bifidobacterias en los contenidos del ciego y el colon en ratas .....</b>	<b>104</b>

<b>Tabla 9. Valores de los parámetros macroscópicos de los animales sanos y de los controles colíticos.....</b>	<b>112</b>
<b>Tabla 10. Valores de los parámetros bioquímicos de los animales sanos y de los controles colíticos.....</b>	<b>114</b>
<b>Tabla 11. Valores de los parámetros microbiológicos de los animales sanos y de los controles colíticos.....</b>	<b>118</b>
<b>Tabla 12. Valores de los parámetros microbiológicos de los animales sanos y de los controles colíticos.....</b>	<b>119</b>
<b>Tabla 13. Efecto preventivo de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día) sobre el índice del daño macroscópico, relación peso/longitud, porcentaje de adhesiones y actividad mieloperoxidasa (MPO) en la colitis experimental inducida por TNBS en ratas .....</b>	<b>120</b>
<b>Tabla 14. Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g/día), o de su mezcla (2 g/día), sobre la concentración bacteriana en los contenidos colónicos en la colitis experimental inducida con TNBS en ratas .....</b>	<b>134</b>
<b>Tabla 15. Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día), sobre la</b>	

**producción de ácidos grasos de cadena corta AGCC  
(acetato, propionato y butirato en los contenidos  
intestinales en el modelo de colitis experimental en ratas  
inducida por TNBS ..... 135**



## **ABREVIATURAS**

AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
CU	Colitis Ulcerosa
EC	Enfermedad de Crohn
ADN	Ácido desoxiribonucleico
cNOS	Óxido nítrico sintasa constitutiva
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
FOS	Fructooligosacáridos
HTAB	Tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio
HTAB	Tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio
IDM	Índice de daño macroscópico
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$
IG	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LTB4	Leucotrieno B4
MDA	Malonildialdehído

MPO	Mieloperoxidasa
NF- $\kappa$ B	Factor de transcripción nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
PAF	Factor activador plaquetario
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Th	Célula T colaboradora (T Helper)
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (Tumor necrosis factor $\alpha$ )
UFC	Unidades formadoras de colonias



## **INTRODUCCIÓN**

## 1. La Enfermedad Inflamatoria intestinal

El término Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) engloba fundamentalmente a dos entidades patológicas: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Ambas se caracterizan por manifestar una inflamación crónica del intestino, con períodos de exacerbación seguidos de intervalos más o menos prolongados de remisión de los síntomas.

En la *colitis ulcerosa* el proceso inflamatorio afecta exclusivamente al colon. La inflamación está confinada en la mucosa y submucosa (*Fig.1.1 y 2.2*), se inicia en el recto y, de forma continua y simétrica, se extiende proximalmente a otros segmentos del colon. En la *enfermedad de Crohn*, cualquier parte del tubo digestivo puede estar afectada, desde la boca hasta el ano, de forma focal, segmentaria, y discontinua, si bien las localizaciones más habituales son el íleon terminal y diversos segmentos del colon. En esta enfermedad, el proceso inflamatorio puede abarcar todo el espesor de la pared del tubo digestivo (*Fig. 1.2 y 2*), desde la mucosa a la serosa, con la consiguiente aparición de fisuras, fístulas o abscesos.

El término de *colitis indeterminada* fue introducido para describir las piezas de colectomía que presentaban características histológicas que no son definitorias de colitis ulcerosa ni enfermedad de Crohn<sup>1</sup>. En un reciente estudio prospectivo de base poblacional se ha podido observar cómo a

los 2 años del diagnóstico de colitis indeterminada, un 33% de ellos eran diagnosticados de colitis ulcerosa y un 17% de enfermedad de Crohn<sup>2</sup>.

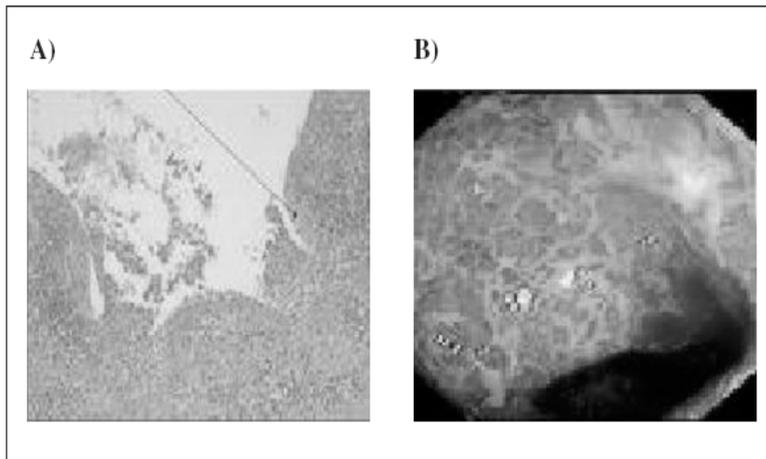


Fig. 1.—A) Imagen anatomopatológica de la colitis ulcerosa. Se observa inflamación de la mucosa, úlceras superficiales, distorsión de criptas y depleción de células caliciformes. B) Imagen endoscópica de la colitis ulcerosa. Afectación sigmoidea, donde se observan lesiones continuas, y una mucosa eritematosa, granular y edematosa.

Fig. 1.1 Imagen anatomopatológica de la colitis ulcerosa

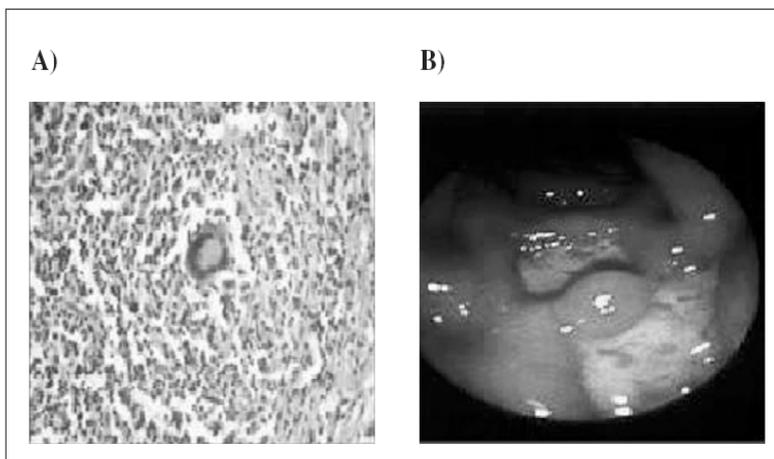
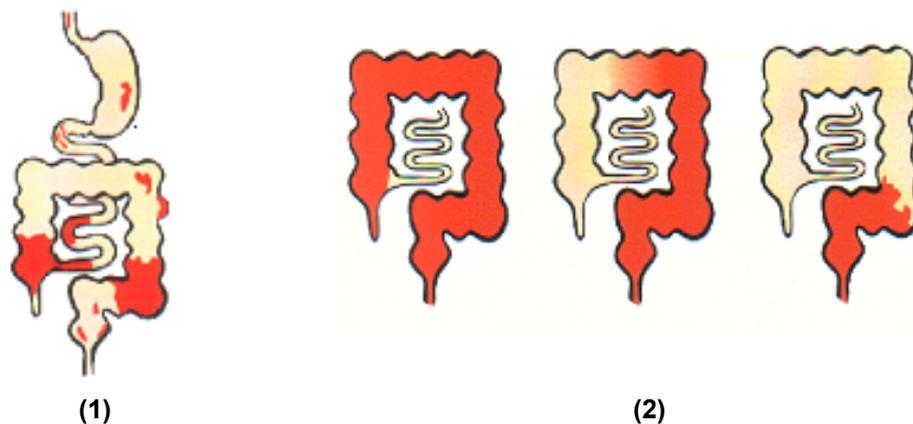


Fig. 2.—A) Imagen anatomopatológica de la enfermedad de Crohn. Se observan granulomas no caseificantes y agregados linfoides. B) Imagen endoscópica de la enfermedad de Crohn. Se observa mucosa de aspecto empedrado con aftas y pseudopólipos.

Fig. 1.2 Imagen anatomopatológica de la Enfermedad de Crohn

## 1.1 Etiopatogenia

La etiología de estas enfermedades sigue considerándose desconocida, aunque las evidencias actuales indican que la interacción de distintos factores ambientales, inmunológicos y dietéticos en un individuo genéticamente predispuesto, genera la aparición del proceso inflamatorio intestinal. Entre los factores de tipo ambiental destacan la flora bacteriana residente y otros antígenos luminales como son los procedentes de la dieta, que jugarían un papel clave en la patogenia del daño tisular en la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>3,4</sup>, que explicaría la mayor incidencia en las áreas urbanas de los países industrializados<sup>5</sup>.



**Fig. 2.1 y 2.2** Principales lugares de afectación en la Enfermedad de Crohn (a) y la colitis ulcerosa (b)

Independientemente de la causa que la genera, está establecido que antígenos presentes en el lumen originan una respuesta inmune exagerada y descontrolada<sup>6</sup> que se caracteriza

por una activación de la síntesis y liberación de numerosos mediadores proinflamatorios: eicosanoides como el leucotrieno B4 (LTB4), el factor activador plaquetario (PAF), radicales libres y citoquinas proinflamatorias tales como las interleuquinas (IL) 1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, el interferón-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF)<sup>7</sup>.

El daño generado en el epitelio intestinal, hace que pierda su papel de barrera y permite el paso de sustancias antigénicas hacia la lámina propia, activando aún más la respuesta inmune. Se produce una alteración en la funcionalidad intestinal, tanto en la motilidad como en la absorción de agua y electrolitos, responsable de algunos de los síntomas característicos de estas patologías<sup>8</sup>.

## **1.2 Factores dietéticos de riesgo en la EII**

Son muchos los estudios que han tratado de encontrar relaciones directas o indirectas entre alimentos y EII. En este sentido:

El azúcar refinado aumenta el riesgo de desarrollar EC y CU, pero más en el EC que en CU,<sup>9,10</sup> las frutas disminuyen el riesgo padecer de EC y CU<sup>11,12,13</sup>, las verduras disminuyen el riesgo padecer EC y CU<sup>14,15,16,17</sup>, la fibra disminuye el riesgo padecer EC<sup>18,19,20</sup>, la grasa aumenta el riesgo de padecer de EC

y CU<sup>21,22</sup> las comidas rápidas aumenta el riesgo de padecer EC y CU<sup>23</sup>.

Existe gran variedad de deficiencias observadas en pacientes con EII <sup>24</sup>. El 65-75 % de pacientes con EC muestran peso por debajo de lo normal. Además, la pérdida de peso puede ser muy acentuada en los enfermos hospitalizados que han tenido una exacerbación repentina de la EC.

En pacientes con la enfermedad crónica, con frecuencia se ha observado desgaste muscular, y afectación de la inmunidad celular, con una mayor sensibilidad a la infección y una cicatrización deficiente<sup>25</sup>.

Asimismo, se observan carencias de oligoelementos y vitaminas, (*Tabla 1*) sobre todo en aquellos pacientes que han tenido períodos prolongados de diarrea y vómitos. Incluso cuando los pacientes con EII parecen estar bien alimentados, pueden mostrar dichas deficiencias en minerales y vitaminas.<sup>26,27</sup>

**Tabla1.** Prevalencia de deficiencias nutricionales en la EII

	<b>Enfermedad de Crohn (%)</b>	<b>Colitis ulcerosa (%)</b>
Pérdida de peso	65-75	18-62
Hipoalbuminemia	25-80	25-50
Anemia	60-80	66
Hierro	39	81
Vitamina B <sub>12</sub>	48	5
Ácido fólico	54	36
Calcio	13	ND
Magnesio	14-33	ND
Potasio	6-20	ND
Vitamina A	11	ND
Vitamina C	12	ND
Vitamina D	75	35
Vitamina K	10-25	ND
Zinc	10-50	ND

*Adaptado de Driscoll y Rosenberg*

*ND, no disponible*

A menudo se observa anemia, siendo su incidencia superior al 80 %, <sup>28</sup> no por una deficiencia dietética, sino más probablemente debido a la deficiencia de hierro causada por la pérdida de sangre por las lesiones gastrointestinales. Otras causas que pueden justificar la anemia incluyen la deficiencia en ácido fólico relacionada con la toxicidad de la sulfasalazina, la

enfermedad del intestino delgado proximal. y la inflamación crónica sin cualquier deficiencia alimenticia identificable.<sup>29,30.</sup>

### **1.3 Papel de los antioxidantes y la fibra en la EII**

- **Antioxidantes:** Estudios epidemiológicos han puesto en evidencia el papel que tienen los alimentos de origen vegetal en la prevención de numerosas enfermedades. Los antioxidantes naturales presentes en estos alimentos, entre los que destacan los flavonoides, pueden ser responsables de esta actividad.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Pueden mejorar los estados de diarrea aguda y crónica a través de la inhibición de la secreción y motilidad intestinal y también ser muy útiles en la reducción del daño inflamatorio crónico en el intestino, protegiéndolo del estrés oxidativo y preservando la función de la mucosa.

Los flavonoides se proponen como agentes terapéuticos en el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, en la que factores diversos promueven una reacción inmunológica exacerbada y descontrolada que conduce a una inflamación crónica del intestino. La consecuencia es una alteración de la funcionalidad intestinal, tanto en la motilidad como en la

absorción de agua y electrolitos, responsable de algunos de los síntomas característicos de estas patologías<sup>31,32</sup> como diarrea, dolor abdominal, malnutrición, etc.

Además, los flavonoides son compuestos dotados de una baja toxicidad<sup>33</sup>, que presentan unas características idóneas para ser considerados como compuestos antiinflamatorios aplicables en la EII ya que:

- Inhiben distintas enzimas cuya expresión y/o actividad se encuentran incrementadas en los procesos inflamatorios<sup>34</sup>.
- Disminuyen la actividad de diversas células del sistema inmune, tal y como se ha podido comprobar en distintos ensayos in vitro<sup>35, 36</sup>
- Son compuestos que presentan propiedades antioxidantes y/o antirradicalarias in vitro<sup>37</sup>; habiéndose demostrado para algunos de ellos la capacidad de incrementar el contenido intestinal de glutatión cuando se administran a ratas normales por vía oral, protegiendo el intestino del daño de tipo lipoperoxidativo que puede generarse cuando existe una superproducción de radicales libres<sup>38, 39</sup>.

Son diversos los mecanismos propuestos de la actividad antiinflamatoria intestinal de los flavonoides:

*A) Propiedades antioxidantes y/o antirradicalarias.*

Los flavonoides mejoran el estado de estrés oxidativo asociado al proceso inflamatorio intestinal inducido experimentalmente<sup>40,41</sup> ya que reducen la depleción de glutatión o disminuyen el contenido colónico de malonildialdehído (MDA), dos de los marcadores bioquímicos indicativos del grado de peroxidación lipídica en el tejido intestinal. Este efecto puede considerarse de gran interés, dado que los radicales libres, incluyendo los derivados del oxígeno y los del nitrógeno, desempeñan un papel importante en la etiopatogénesis de la EII en humanos<sup>42</sup>.

*B) Actuación sobre el metabolismo del óxido nítrico (NO).*

En condiciones fisiológicas se generan pequeñas cantidades de NO por parte de la isoforma constitutiva de la óxido nítrico sintasa (cNOS), que ejerce un efecto protector directo en las fases iniciales del proceso inflamatorio intestinal, principalmente al inhibir la interacción entre el leucocito y el endotelio vascular así como al reducir la permeabilidad epitelial<sup>43,44</sup>. Por el contrario, la síntesis de NO se incrementa en situaciones de inflamación crónica, principalmente como consecuencia de la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS). La producción de NO da lugar a un efecto lesivo como consecuencia de su interacción con el anión

superóxido, generando especies reactivas como el peroxinitrito, que ocasiona una situación de estrés oxidativo y daño tisular<sup>45</sup>. Es posible que los efectos farmacológicos de los flavonoides estén relacionados con el metabolismo del NO ya que pueden preservar las funciones beneficiosas del NO, al captar directamente aniones superóxido<sup>46</sup> y por tanto impedir la interacción con el NO generado; también, los flavonoides son capaces de inhibir la expresión de la iNOS<sup>47</sup>; y, por último, actúan como potentes captadores de radicales peroxinitrito<sup>48</sup>. En consecuencia, los flavonoides pueden prevenir los efectos perjudiciales generados por el NO en situaciones de inflamación intestinal.

*C Inhibición de la actividad lipoxigenasa y reducción en la producción de leucotrieno B4 (LTB4).*

El LTB4 es un mediador inflamatorio con una importante función en la EII; de hecho, la inhibición de su síntesis<sup>49</sup> o el bloqueo de su receptor<sup>50</sup> se traduce en efectos beneficiosos en la colitis experimental. Los flavonoides reducen la producción de LTB4 colónico,

El LTB4 está implicado en la patología de la EII, dado que facilita la quimiotaxis de los neutrófilos, su adherencia y desgranulación en el colon inflamado<sup>51</sup>. Como consecuencia de la activación del sistema NADPH oxidasa y de la acción posterior de la mieloperoxidasa (MPO) se generan cantidades masivas de superóxido y ácido hipocloroso, responsables de

fenómenos de citotoxicidad directa en el tejido intestinal, lo que a su vez facilita la liberación adicional de distintos mediadores proinflamatorios<sup>52</sup>. En la mayoría de los estudios con flavonoides en modelos de colitis experimental se observa una reducción significativa en la actividad mieloperoxidasa colónica, enzima que se encuentra predominantemente en los gránulos azurofílicos de los neutrófilos y que es considerada como marcador sensible de la infiltración leucocitaria<sup>53</sup>.

*D) Inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias: TNF- $\alpha$  e IL-6*

Por su capacidad de inhibir la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas, la expresión génica mediada por el factor de transcripción NF $\kappa$ B y la subsiguiente producción de citocinas proinflamatorias. Existen numerosos compuestos fenólicos con actividad antiinflamatoria mediada por la inhibición de NF $\kappa$ B en varios tipos celulares<sup>54</sup>, efecto que se ha demostrado también en estudios in vivo<sup>55,56</sup>. Existen estudios que demuestran que la activación del NF $\kappa$ B es sensible al estrés oxidativo, como por ejemplo la exposición a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y que esta activación puede ser modulada por compuestos antioxidantes<sup>57</sup>. Esto resulta interesante desde el punto de vista de la inflamación intestinal puesto que está demostrado que los radicales libres juegan un papel muy importante en esta enfermedad tanto en humanos<sup>58, 59</sup> como en modelos experimentales de colitis<sup>60</sup>. Los flavonoides a menudo poseen

actividad antioxidante, reduciendo el número de especies reactivas del oxígeno, de forma que constituirían inhibidores inespecíficos de dicho factor de transcripción.

Por todo lo anteriormente mencionado, los flavonoides previenen el daño colónico agudo cuando se administran antes del agente lesivo (ácido acético o TNBS), y facilitan la recuperación del tejido colónico dañado en la fase semicrónica del proceso inflamatorio cuando se administran una vez inducido el daño.

Los radicales libres del oxígeno ejercen efectos deletéreos sobre las células epiteliales. Varios estudios han puesto de manifiesto la existencia de niveles menores de antioxidantes y vitaminas en la mucosa intestinal y plasma de pacientes con enfermedad de Crohn<sup>61</sup>. Esto se ve apoyado por varios estudios controlados en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal crónica suplementados con vitamina C y E en los que se objetivó un aumento de los niveles en sangre de estas vitaminas y un descenso del estrés oxidativo<sup>62</sup>.

En otro estudio en pacientes con Enfermedad de Crohn, se evaluó la suplementación de una dieta normal con una fórmula rica en compuestos antioxidantes o con ácidos grasos omega 3. Las concentraciones de vitamina C y E así como la actividad superóxido dismutasa aumentaron después de la inclusión de los suplementos antioxidantes. Los ácidos grasos omega 3 disminuyeron de forma significativa los niveles de ácido

araquidónico, lo que condujo a la atenuación de la producción de eicosanoides con actividad proinflamatoria.

Otros estudios han demostrado las ventajas de estos suplementos en la disminución de la necesidad de corticoides. El uso de suplementos orales enriquecidos con aceite de pescado, fructooligosacáridos, vitamina C, vitamina E y selenio en adultos con brote leve-moderado de colitis ulcerosa consigue una mejor respuesta clínica así como un descenso en las dosis de corticoides requeridas<sup>63</sup>.

No obstante se recomienda que los suplementos de antioxidantes se deberían utilizar combinando varios de ellos, ya que el uso de antioxidantes únicos a dosis altas no es seguro desde el punto de vista bioquímico ya que todos ellos interactúan en la cadena de defensa contra los radicales libres. No obstante, se necesitan más estudios en este campo.

- **Fibra y prebióticos:** El término fibra incluye un conjunto de compuestos muy variadas que se caracterizan por la imposibilidad de ser digeridas por las enzimas digestivas humanas. Incluyen fructooligosacáridos (FOS), inulina, oligosacáridos, polisacáridos no almidonados, polisacáridos no fermentables derivados del almidón como la peptina, celulosa, hemicelulosa, pectinas y almidón resistente...

Sus efectos beneficiosos se asocian principalmente con la formación de ácidos grasos de cadena corta en el colon aunque

algunos tienen efectos biológicos beneficiosos por sí mismos. Los prebióticos son carbohidratos no digeribles que estimulan el crecimiento y metabolismo de las bacterias protectoras entéricas endógenas. Muchos forman parte de la fibra dietética

Diversos estudios<sup>64</sup> con pacientes con EC que ingieren dietas ricas en fibra han mostrado una menor tasa de admisión en hospitales y cirugía en comparación con pacientes en los que la dieta no fue intervenida. El resultado sugiere que el tratamiento con una dieta rica en fibra tiene un efecto beneficioso sobre el curso clínico de la EC.

En base a dichas afirmaciones se ha realizado el presente Estudio que constituye esta Tesis con animales de experimentación, utilizando dos fibras dietéticas con diferentes tasas de fermentación: fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-95) y el almidón resistente (Fibersol®-2), que fueron administradas a ratas sanas y ratas con colitis inducida mediante el ácido trinitrobenzenesulfónico (TNBS).

## 2. La fibra dietética. Concepto y propiedades generales.

El término fibra dietética hace referencia a muy diversos compuestos de origen vegetal que son ingeridos en la dieta humana y que no pueden ser digeridos por las enzimas no microbianas del tracto gastrointestinal. Es un término químicamente difícil de definir, puesto que en su composición incluye una gran variedad de sustancias, siendo la mayoría carbohidratos complejos.

La fibra dietética fue inicialmente definida por Burkitt y Trowell (1975) como *“los carbohidratos complejos de la dieta de origen vegetal que no son digeridos en el intestino delgado y que llegan al colon”*. Un año más tarde, Trowell revisó esta definición afirmando que la fibra dietética *“son los polisacáridos y la lignina de las plantas que no pueden ser digeridos por las enzimas humanas”*<sup>65</sup>. El “U.S. Expert Panel on Dietary Fiber” definió en 1987 la fibra dietética como *“los componentes endógenos de las plantas que resisten la digestión por las enzimas digestivas humanas”*. Posiblemente, la definición que más se acerca a los conocimientos actuales fue dada por Cummings, uno de los grandes expertos en fibra, que estableció que *“el citoesqueleto de los vegetales es lo que podemos denominar fibra vegetal o dietética; una sustancia aparentemente inerte que puede ser fermentada por algunas bacterias, pero no desdoblada por las enzimas digestivas humanas, por lo que resulta inabsorbible. Tiene unas características muy dispares según la especie vegetal de*

*procedencia y, dentro de ella, según la variedad” (Redondo, 1999b).*

En relación con las propiedades de la fibra dietética, éstas se derivan de sus componentes, y en definitiva van a determinar los efectos atribuidos sobre el organismo tras su ingesta. Entre las propiedades principales podemos destacar:

*a) Es un conjunto muy heterogéneo de moléculas complejas de origen vegetal.*

La fibra es una mezcla compleja de diversos componentes procedentes, básicamente, de la pared de las células vegetales. La forman compuestos polisacáridos entre los que se incluyen celulosa, hemicelulosas y pectinas, así como compuestos no polisacáridos como la lignina. Algunos polisacáridos que no forman estrictamente parte de las paredes celulares son considerados también como componentes de la fibra; este es el caso de las gomas, que son secretadas por las plantas como respuesta a las agresiones o lesiones que sufre, y de los mucílagos, que están presentes en el tegumento de las semillas así como en determinadas algas. Otras sustancias también presentes en las plantas no son consideradas por todos los autores constituyentes de la fibra, este es el caso de: fitatos, cutinas, saponinas, lecitinas, proteínas, ceras, taninos y siliconas<sup>66</sup>. *(Tabla 2)*

**Tabla 2.** Componentes mayoritarios de la fibra dietética.

		Polisacáridos	No polisacáridos
Estructurales	Poco fermentables	Celulosa Hemicelulosas	Lignina
	Muy fermentables	Hemicelulosas Pectinas	
No estructurales	Muy fermentables	Gomas Mucílagos	

b) *Tiene capacidad para adsorber sustancias orgánicas e inorgánicas.*

Todas las fibras, en un medio acuoso, son capaces de captar agua hasta un límite, que va a depender en gran medida de sus distintos constituyentes. La adsorción de agua se produce por fijación a la superficie de la fibra o por atrapamiento en el interior de su estructura macromolecular. La diferente capacidad para fijar el agua nos permite diferenciar dos tipos de fibra: insoluble y soluble. Las fibras insolubles captan poca agua y forman mezclas de baja viscosidad. Se incluyen la celulosa, la lignina, que es el componente más hidrofóbico de todas las fibras, y algunas hemicelulosas. Por el contrario, las fibras solubles, cuando se ponen en contacto con el agua, forman geles o mezclas de consistencia viscosa ya que atrapan el agua

en el retículo de su estructura. Se incluyen las gomas, los mucílagos, hemicelulosas y pectinas.

Si bien en la mayoría de los vegetales predomina la fibra insoluble, las proporciones de ambos tipos de fibra dependen del vegetal en cuestión, así como de su grado de maduración.

(Tabla 3)

Tabla 3. Solubilidad y fermentabilidad de las fibras.			
	Principalmente solubles	Solubles+Insolubles	Principalmente insolubles
Fermentables (>70%)	Pectina Goma guar Goma arábica Tragacanto		
Parcialmente fermentables (10-70%)	Agar <i>Plántago ovata</i> (cutículas)	<i>Plantago ovata</i> (semillas)	Salvado de trigo Celulosa
No fermentables (<10%)	Carragenina Karaya		Lignina

Además del agua, la fibra también tiene capacidad para fijar otras sustancias, tanto orgánicas como inorgánicas, que pueden quedar atrapadas en el interior de su estructura o ligadas por enlaces químicos. Esto puede generar la menor absorción de los distintos principios inmediatos ingeridos en la

dieta conjuntamente con la fibra. Desde el punto de vista nutricional, el ligero incremento en la excreción de estos compuestos con las heces no es importante y, sin embargo, puede ser de gran utilidad para el control de algunas enfermedades, como la diabetes y la hipercolesterolemia. También se ha descrito la capacidad de secuestrar e incrementar la eliminación de sales biliares, con interesantes implicaciones terapéuticas. Por último, es capaz de retener y facilitar la eliminación de vitaminas y de determinados minerales: calcio, fósforo, cinc, hierro y magnesio. Estos últimos efectos no plantean problemas de consideración cuando la ingesta de fibra es moderada y en sujetos con una dieta equilibrada, aunque habría que tenerlo en cuenta en dietas con un alto contenido en fibra y bajo valor nutricional, así como cuando se administren suplementos de fibra<sup>67</sup>.

*c) Es inatacable por los fermentos y las enzimas digestivas, pero parcialmente fermentada por las bacterias del colon.*

De acuerdo con lo apuntado en las diferentes definiciones, el sistema enzimático humano no es capaz de atacar o digerir las distintas sustancias que componen la fibra, por lo que la mayor parte llega al intestino grueso de forma inalterada. Por el contrario, las bacterias del colon, y gracias a la asociación de numerosas enzimas de gran actividad metabólica, son capaces de fermentar en mayor o menor medida la fibra, dependiendo de su composición química y de su estructura. De

hecho, es el principal sustrato para la fermentación de la flora bacteriana colónica; sin embargo, no todos sus constituyentes son metabolizados en igual medida, permitiendo la diferenciación entre fibra poco fermentable y muy fermentable (Stephen *et al.*, 1983) (Tabla III).

Las fibras poco fermentables, como la celulosa y la lignina, son bastante resistentes a la degradación bacteriana en el colon y son excretadas casi intactas por las heces. Por el contrario, las fibras muy fermentables, como las hemicelulosas y el almidón resistente, son fermentadas rápida y completamente por la flora del colon.

Este proceso fermentativo se inicia en el ciego, donde se almacenan los contenidos intestinales durante cierto tiempo. Las moléculas complejas son desdobladas a hexosas, pentosas y alcoholes, que ya no pueden ser absorbidos a estas alturas del intestino. Estos compuestos generados sirven de sustrato a otras colonias bacterianas que, a su vez, las degradan a ácido láctico, agua, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, metano y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato<sup>68</sup>. La producción de estos AGCC reviste gran interés y es uno de los puntos donde se centra la investigación actual de muchos de los efectos beneficiosos de la fibra dietética<sup>69</sup>.

Es importante tener en cuenta que la degradación total o parcial de la fibra en el colon no sólo depende del tipo de ésta, sino también de la velocidad con que se realiza el tránsito a lo largo del mismo; en el caso de un tránsito rápido, la cuota de

degradación es más pequeña que si acontece de forma lenta<sup>70</sup>. También encontramos diferentes grados de fermentación en el caso de que la fibra se encuentre en los alimentos o bien se administre aisladamente.

## **2.1 Efectos fisiológicos de la fibra dietética sobre el aparato digestivo.**

Al contrario de lo que podría pensarse, la fibra dietética no es un componente inerte de la dieta, ya que desarrolla una serie de acciones a lo largo del aparato digestivo que son muy importantes para su funcionamiento normal.

Sus efectos fisiológicos más notables se observan en el estómago, el intestino delgado y el colon.

### **2.1.1 Efectos de la fibra dietética sobre el estómago.**

La fibra, por regla general, retarda el vaciamiento gástrico debido a su poder de captación de agua que provoca un aumento de la viscosidad de su contenido. Esto permite que los ácidos del estómago se mezclen bien y se tamponen con los alimentos y la propia fibra, lo que hace que el pH en el duodeno no sea tan bajo. Este efecto se ve potenciado por el hecho de que una comida rica en fibra es más voluminosa y requiere una mayor masticación, lo que conlleva una mayor salivación y por tanto, un aumento del pH del bolo alimenticio<sup>71</sup>.

Por otra parte, el consumo de fibra proporciona una mayor sensación de saciedad por el mayor volumen de los alimentos así como por el retraso del vaciamiento gástrico, lo que puede ser útil para el control de la ingesta calórica y el mantenimiento del peso corporal <sup>72</sup>.

### **2.1.2 Efectos de la fibra dietética sobre el intestino delgado.**

En esta porción del tubo digestivo se llevan a cabo la mayor parte de los procesos de absorción de los alimentos. La fibra, por su capacidad de captación de sustancias tanto orgánicas como inorgánicas, puede evitar, disminuir o retrasar la absorción de nutrientes por las vellosidades intestinales. Esta propiedad es particularmente interesante para el tratamiento de la diabetes y de la hipercolesterolemia<sup>73</sup>.

Además, se ha descrito que la fibra dietética ejerce un efecto determinante en la morfología de los enterocitos. Así, una dieta exenta de fibra mantiene un patrón inmaduro de las vellosidades,<sup>74</sup> mientras que la suplementación con pectina (fibra soluble) conduce a incrementar la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas<sup>75</sup>.

### **2.1.3 Efectos de la fibra sobre el colon. (Fig.3)**

Se ha postulado que la ingesta de fibra es indispensable para el correcto funcionamiento del intestino grueso.

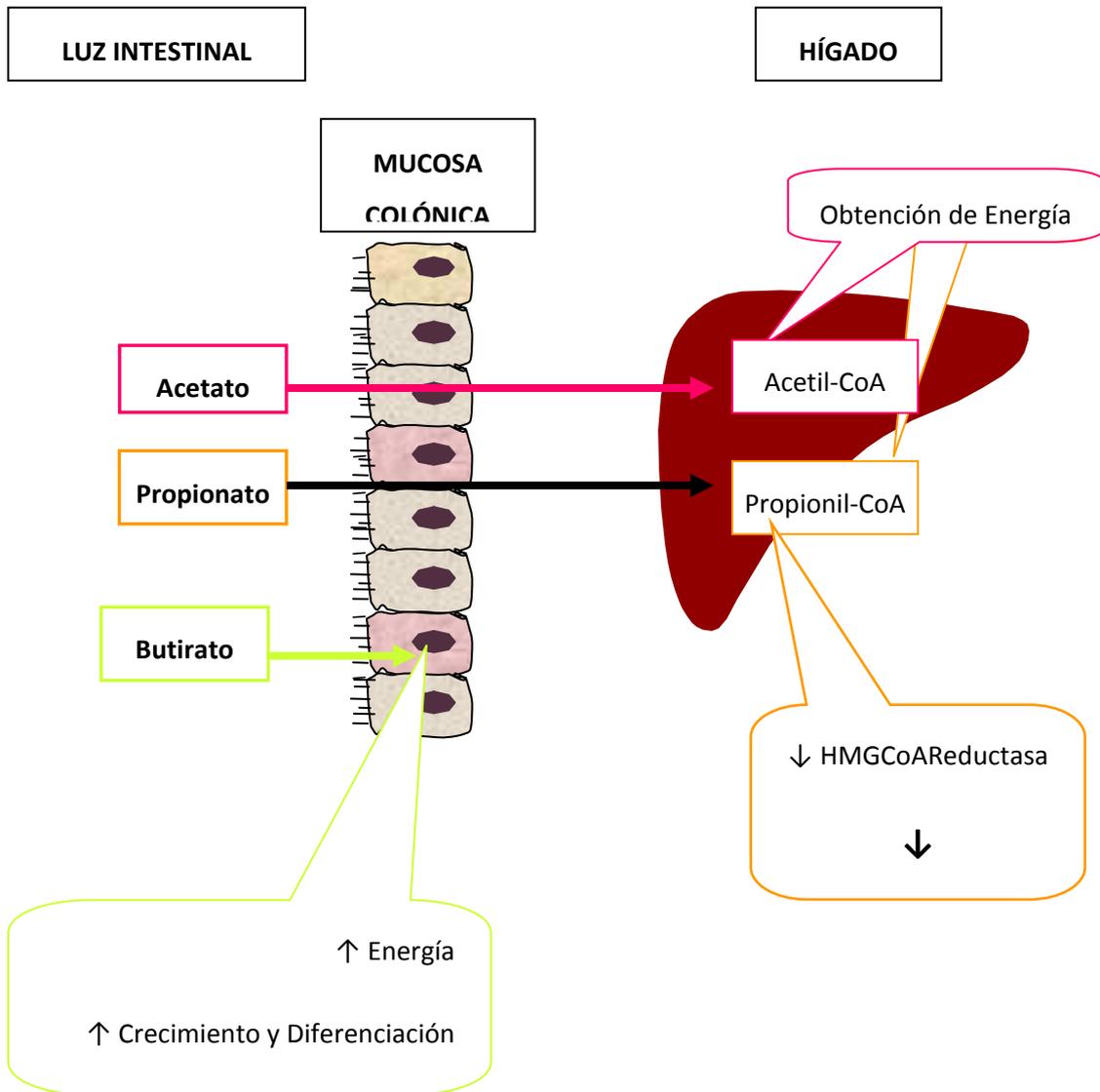
- a) La fibra desempeña un papel determinante en el proceso normal de evacuación de los contenidos fecales<sup>76 77</sup>
- Incrementa el volumen de las heces y les da consistencia pastosa, debido a su capacidad para captar agua y favorecer el crecimiento bacteriano.
  - Acelera el tránsito por incrementar el volumen de heces, lo que disminuye las contracciones colónicas segmentarias y estimula los movimientos de propulsión.
- b) La producción de AGCC, en especial de butirato, desempeña un papel importante en la funcionalidad de los colonocitos.

Los AGCC que se forman con la fermentación son ácidos grasos volátiles. El 90-95 % de los AGCC son: acetato (C<sub>2</sub>), propionato (C<sub>3</sub>) y butirato (C<sub>4</sub>), en una proporción de 60:25:15, respectivamente, si bien ésta se puede alterar por cambios en la dieta<sup>78</sup>. En menor proporción (5-10 % del total de AGCC) se producen valerato (C<sub>5</sub>), hexanoato (C<sub>6</sub>) y los ácidos grasos ramificados isobutirato (iC<sub>4</sub>) e isovalerato (iC<sub>5</sub>)<sup>79</sup>

Dado que la fermentación ocurre principalmente en el ciego y en el colon ascendente, donde el sustrato fermentable es más abundante, las concentraciones de AGCC son mayores en las primeras porciones del colon y van disminuyendo hacia la parte distal del recto<sup>80</sup>

Estos AGCC son, en su mayor parte, absorbidos rápidamente en el colon aunque el mecanismo exacto de absorción no se conoce. En la actualidad se piensa que la absorción de los AGCC por la mucosa colónica se produce por difusión pasiva a través de la membrana plasmática y/o mediante el concurso de un transportador (SCFA/H<sup>+</sup>) localizado en la membrana apical de los colonocitos<sup>81</sup>.

Los AGCC son la principal fuente de energía para los colonocitos (Roediger, 1980a), siendo el butirato el preferido<sup>82</sup>. Éste es oxidado hasta acetil CoA que se incorpora al ciclo el ácido cítrico y proporciona de este modo la energía<sup>83</sup>. El metabolismo de los AGCC por parte del colonocito produce, entre otras cosas, cuerpos cetónicos, CO<sub>2</sub> y agua, que son muy importantes para una buena función de la mucosa del colon, ya que intervienen en mecanismos como la producción de moco, la absorción de iones, la formación de bicarbonato y, como ya se ha indicado, la producción de energía. También es importante el efecto que ejercen sobre la motilidad del colon al estimular la contractilidad<sup>84</sup>.



**Fig. 3.** Esquema de los efectos de los AGCC producidos por la fermentación de la fibra dietética por la flora bacteriana colónica sobre el organismo

Mientras que el butirato se oxida casi en su totalidad en el colonocito, el acetato y el propionato pasan a circulación portal y en el hígado se incorporan a distintas vías metabólicas: el acetato participa en la lipogénesis<sup>85</sup> y el propionato en la gluconeogénesis<sup>86</sup>

### 3. Fibra y salud.

Clásicamente, la fibra se ha considerado conveniente para prevenir el estreñimiento, sin reparar en su utilidad para cualquier otro propósito. En la actualidad, además del importante papel que ejerce en la fisiología normal gastrointestinal, se ha descrito que el consumo de alimentos ricos en fibra puede prevenir determinadas situaciones patológicas y desempeñar un papel fundamental en su tratamiento, bien como medida coadyuvante, bien como terapia principal.

Esta idea surgió en los años 70, cuando diversos estudios epidemiológicos encabezados por los doctores Burkitt y Trowell sugirieron que la fibra podía presentar beneficios adicionales para muchas enfermedades propias del mundo occidental, que acuñaron bajo el concepto de "*enfermedades de la opulencia*": enfermedades cardíacas, diabetes, piedras en la vesícula, diverticulitis, apendicitis, hernia de hiato, hemorroides, varices, estreñimiento crónico y cáncer de colon<sup>87</sup>.

Como la fibra está constituida por una mezcla compleja de sustancias, es difícil establecer una relación directa entre sus efectos y una patología concreta. De hecho, se ha descrito que los distintos tipos de fibra (soluble e insoluble, fermentable y no fermentable) pueden tener distintas acciones sobre el organismo. Por otra parte, hay que tener en cuenta que en los alimentos ricos en fibra también existen otras sustancias como vitaminas, minerales o antioxidantes que podrían contribuir a algunos de los efectos beneficiosos relacionados con su consumo. En este sentido, cuando se ingieren alimentos ricos en fibra se sustituyen aquellos ricos en grasa y proteínas por otros más saludables. Igualmente se ha establecido una correlación entre la ingesta de una dieta rica en fibra con hábitos de vida más sanos (ejercicio físico, dieta baja en calorías, menor consumo de alcohol y de tabaco...).

Teniendo en cuenta estos hechos, los expertos proponen un mayor consumo de alimentos ricos en fibra como cereales, legumbres, verduras y frutas, mejor que administrar únicamente suplementos.

La recomendación del consumo de fibra diaria en EEUU debe oscilar entre 25 y 38g/día<sup>88</sup>, dependiendo del contenido calórico de la dieta<sup>89</sup>. Así, se considera que las personas que consumen 2000 Kcal deben ingerir unos 25 g/día. La fibra consumida debe ser equilibrada entre soluble e insoluble (25 % y 75 %, respectivamente), por lo que se recomienda que provenga de todos los tipos de alimentos que la contienen.

La cantidad de fibra que se ingiere en los países desarrollados es muy inferior a la recomendada, sobre todo en el norte de Europa y América. En Estados Unidos el consumo medio en la población adulta es de 15 g/día<sup>90</sup>. En España, aunque es mayor, está un 15-20 % por debajo del recomendado<sup>91</sup>.

Los países del sur de Europa han presentado, tradicionalmente, una ingesta de fibra mayor que el resto de países occidentales, debido a la Dieta Mediterránea propia de la zona<sup>92</sup>. Sin embargo, hábitos erróneos importados, junto a las comidas rápidas o precocinadas, están desplazando al menú más sano del mundo.

Sería necesario recuperar los hábitos alimenticios de la Dieta Mediterránea, que se caracteriza por la abundancia de elementos vegetales como pan, pasta, verduras, legumbres, frutas y frutos secos; aceite de oliva como principal fuente de grasa; consumo de pescado, aves de corral, productos lácteos y huevos; pequeñas cantidades de carnes rojas y moderadas cantidades de vino, durante las comidas (*Fig. 4*).



**Fig. 4.** Pirámide de la dieta mediterránea

#### 4. La fibra y la EII

Dado que los AGCC, en general, y el butirato, en particular, participan en el funcionamiento intestinal normal y constituyen la principal fuente de energía para el colonocito, se ha intentado establecer una correlación entre la EII y la alteración en la producción de AGCC. Algunos estudios han encontrado que en los pacientes con CU las concentraciones de AGCC en el lumen colónico son inferiores a las normales<sup>93</sup>, lo que se puede deber a la ingesta de una dieta pobre en fibra que alteraría la flora bacteriana colónica y la homeostasis entre las bacterias y los colonocitos que conduciría a la inflamación<sup>94</sup>. Por

el contrario, otros ensayos no han encontrado ninguna diferencia en este sentido<sup>95</sup>.

Por otra parte, los estudios encaminados a determinar si el metabolismo de los AGCC está alterado en estas enfermedades también son contradictorios.

En 1980, se vio que los colonocitos obtenidos de pacientes con colitis ulcerosa fulminante tenían reducida la capacidad para oxidar el butirato<sup>96</sup>, y de esta observación surgió la hipótesis de que la colitis se caracteriza por un déficit energético que conduce a la muerte celular y la inflamación crónica. Esta hipótesis se vio reforzada con los estudios desarrollados por Roediger y Nance<sup>97</sup> que establecieron un modelo experimental de inflamación intestinal basado en el bloqueo de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial del butirato que asemeja a la colitis ulcerosa, lo que indica que un fallo en el metabolismo del butirato conduciría al desarrollo de la patología. Aunque estudios posteriores confirmaron los resultados<sup>98</sup>, otros no han descrito la existencia de defecto alguno en el metabolismo del butirato en colonocitos procedentes de pacientes con EII<sup>99, 100</sup>

Teniendo en cuenta todos estos estudios se pensó que una opción terapéutica en la EII podía ser elevar los niveles lumbales de butirato a la normalidad o incluso proporcionar una concentración superior a la fisiológica que superara el bloqueo parcial del metabolismo del butirato. Con esta idea se empezaron a probar los enemas de AGCC y de butirato, que además del efecto sobre el funcionamiento normal del

colonocito, podría tener, según distintos estudios *in vitro*, actividad antiinflamatoria al inhibir la activación del factor de transcripción NF-κB, un factor regulador de la producción de citoquinas proinflamatorias<sup>101</sup>, lo cual podría contribuir al efecto beneficioso en estas patologías. De hecho, distintos ensayos clínicos han valorado la efectividad de la administración de enemas de AGCC, o de butirato solo, a sus pacientes con colitis.<sup>102</sup> Aunque los resultados iniciales fueron prometedores, los ensayos clínicos posteriores no han permitido ratificar el efecto antiinflamatorio intestinal<sup>103, 104</sup> probablemente derivado del bajo cumplimiento del tratamiento al tratarse de enemas.

Para obviar estas dificultades, otra forma de incrementar los niveles intracolónicos de AGCC es la administración vía oral de fibra dietética fermentable ya que constituye una fuente de AGCC.<sup>105,106</sup> En 1978 hubo un primer estudio del efecto de la fibra dietética (salvado de avena) en el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa<sup>107</sup>. La conclusión de este estudio fue que el salvado de avena no prolongaba el tiempo de remisión de la enfermedad. La ausencia de efecto terapéutico podía atribuirse a que se trata de una fibra insoluble, poco fermentable y, por tanto, que no aumenta en gran medida la producción de butirato, siendo su principal efecto el aumento de la masa fecal.

Posteriormente, en 1991, se llevó a cabo un ensayo clínico en el que se estudió el efecto de las cutículas de *Plántago ovata* en pacientes con colitis ulcerosa en remisión<sup>108</sup>.

Se demostró que éstas eran eficaces a la hora de aliviar los síntomas de los pacientes, muy similares a los del Síndrome del Intestino Irritable. La mejora más significativa fue la normalización del tránsito intestinal, por lo que la respuesta favorable se podría explicar, principalmente, por su impacto en la motilidad gastrointestinal. En este caso, dado que las cutículas de *Plántago ovata* son fibra principalmente soluble y fermentable, su administración incrementa la producción de AGCC, sobre todo en el colon ascendente, los cuales serían los responsables del efecto beneficioso.

En 1998, se realizó un estudio en pacientes con colitis ulcerosa activa en el que se investigó la seguridad y eficacia de la administración de 30 g/día de fibra procedente de cebada germinada (GBF)<sup>109</sup>. Los pacientes experimentaron una mejoría en los parámetros clínicos estudiados y se observó un incremento en la concentración fecal de butirato.

Más recientemente, en 1999, se ha realizado un estudio controlado multicéntrico, comparando la eficacia de las semillas de *Plántago ovata* con la mesalazina o con la combinación de *Plántago ovata* y mesalazina para mantener la remisión clínica en la colitis ulcerosa<sup>110</sup>. Los resultados de este estudio sugirieron que las semillas de *Plántago ovata* son bien toleradas por los pacientes con colitis ulcerosa inactiva y que pueden tener una eficacia equivalente a la mesalazina en el mantenimiento de dicha remisión. En este estudio se midieron las concentraciones fecales de AGCC y se vio que en los

pacientes tratados con semillas de *Plántago ovata* estaba incrementada la concentración de butirato, lo que sugiere que este tipo de fibra se fermenta lentamente a lo largo de todo el colon, manteniendo niveles elevados de butirato incluso en el colon distal, lo que sería beneficioso para el tratamiento de la colitis ulcerosa localizada en los segmentos finales del intestino grueso.

Otro tipo de fibras solubles muy fermentables, como la pectina o la goma guar, originan gases y cantidades importantes de AGCC en el colon ascendente, que son absorbidos de forma completa a este nivel, por lo que sólo cantidades pequeñas de los mismos alcanzan el colon distal y no se aprecian cambios en la concentración fecal de AGCC<sup>111</sup>.

Los ensayos encaminados al estudio del mecanismo de acción de la fibra dietética en el tratamiento de estas patologías se han llevado a cabo en modelos experimentales de inflamación intestinal. El GBF ha mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento de la colitis experimental inducida por sulfato de dextrano en ratas<sup>112</sup> y en el modelo de colitis espontánea en ratas transgénicas HLA-B27<sup>113</sup>. La administración de este tipo de fibra incrementó la concentración del contenido cecal de butirato y acetato, disminuyó el daño en el epitelio colónico y tuvo además efectos antiinflamatorios, al inhibir la unión del NF-kB al ADN y la producción de IL-8. En el modelo experimental de colitis inducida por ácido acético en ratas se ha estudiado el efecto de la administración intracolónica de *Lactobacillus reuteri*

y avena<sup>114</sup>. Se obtuvo un efecto terapéutico óptimo con la combinación, mientras que la avena sola no obtuvo efecto. Estos resultados se pueden explicar por la capacidad de estas bacterias de modular la flora intestinal, que puede estar alterada cuando existen trastornos funcionales o inflamación en este órgano, y por el incremento en los niveles de AGCC en el lumen colónico, debido a la mayor fermentación inducida por los probióticos.



## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Un prebiótico es definido como un ingrediente alimentario que es selectivamente fermentado por las bacterias presentes en el lumen intestinal, principalmente compuesto por carbohidratos, que tras su ingesta origina cambios específicos tanto en la composición como en la actividad de la microbiota intestinal y que confiere beneficios sobre la salud del hospedador<sup>115</sup>. Sin embargo, estos efectos beneficiosos que los prebióticos ejercen sobre la salud deben ser demostrados para cada uno de ellos, y dependerán en gran medida de sus propiedades químicas y de las dosis administradas.

La fibra dietética, al presentar como una de sus principales características la de no ser digerida por las enzimas digestivas humanas, pero sí fermentada por la microbiota intestinal, es considerada como un compuesto que puede presentar efectos de tipo prebiótico, lo que contribuye de forma definitiva en sus efectos beneficiosos. Por ejemplo, su fermentación por parte de la microbiota intestinal se puede traducir en un aumento de la biomasa del lumen intestinal, y el consiguiente incremento del peso de las heces y de su frecuencia de excreción, que justificaría el efecto positivo sobre el estreñimiento que clásicamente se le ha atribuido a la fibra dietética.<sup>116,117</sup>

Además, la fermentación de la fibra dietética por la microbiota intestinal produce ácidos grasos de cadena corta

(AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, que claramente contribuyen a sus propiedades beneficiosas, y en las que destacan las propiedades inmunomoduladoras del butirato a través de interacciones con los mediadores y las células involucradas en la respuesta inmune intestinal.<sup>118</sup>

Se pueden distinguir varios tipos de fibras dietéticas en función de su capacidad de ser fermentadas, dependiendo en gran medida de la longitud de las cadenas de carbohidratos que los componen, tal y como ha sido demostrado en sistemas de fermentación *in vitro*<sup>119</sup>. En este sentido se ha demostrado que los fructooligosacáridos de cadena corta (FOS) son fermentados rápidamente, mientras que los prebióticos de cadena larga como inulina o el almidón resistente son fermentados más lentamente, observaciones que han sido confirmadas *in vivo* para ambos tipos de fibras.<sup>120, 121</sup>

En consecuencia, esta velocidad de fermentación determinaría la región específica del intestino grueso donde los efectos serán más claros. Así, los FOS serían más activos en las primeras porciones del intestino grueso mientras que el almidón resistente alcanzaría la parte más distal del colon. De hecho, Le Blay y *col*, propusieron que la administración de FOS o almidón o fécula de patata cruda, provocan diferentes cambios en el peso de los contenidos húmedos, las poblaciones de bacterias y los metabolitos en el ciego, el colon proximal y distal, así como en las heces: en comparación con el almidón

resistente, los FOS duplican el grupo de productos de la fermentación en el ciego, como es el lactato, mientras que la situación es la contraria en la parte distal del colon<sup>122</sup>.

En consecuencia, cada prebiótico muestra propiedades particulares que deben ser consideradas antes de su potencial uso en el tratamiento de enfermedades intestinales. Así, los prebióticos rápidamente fermentables serían en teoría particularmente útiles en aquellas patologías que afectan a la parte proximal del intestino grueso, mientras que los prebióticos de lenta fermentación deberían ser utilizados para aquellas patologías intestinales que afectaran a las zonas más distales del intestino<sup>123</sup>.

No obstante, una asociación de diferentes prebióticos con propiedades fermentativas complementarias podría resultar muy útil cuando se desee un efecto en todas las regiones del intestino grueso. De acuerdo con todo esto, el presente estudio pretende evaluar el efecto potencial y sinérgico de la combinación de dos prebióticos con diferentes cinéticas de fermentación: fructooligosacáridos (FOS) (Beneo<sup>®</sup>-95) y almidón resistente (Fibersol<sup>®</sup>-2). Con este objetivo se evaluaron los efectos que la administración conjunta de estas dos fibras tienen sobre ratas sanas, analizando los efectos que pudieran ejercer sobre las características de los contenidos intestinales, en ciego y colon, así como sobre la composición de la microbiota intestinal.

Además, y con el objetivo de evaluar el impacto de esta combinación prebiótica en una enfermedad intestinal con una respuesta inmune alterada, los diferentes prebióticos han sido también ensayados en el modelo de colitis experimental inducida con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en ratas. Este modelo se caracteriza por una inflamación intestinal en el segmento colónico asociada con una respuesta inmune exacerbada, en los que diferentes prebióticos como la fibra dietética y la lactulosa, han mostrado efectos beneficiosos.<sup>124,125</sup>



## MATERIAL Y MÉTODOS

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ENSAYOS *IN VIVO*

Estos estudios se realizaron de acuerdo con las directivas de la *Convención para la protección de los animales vertebrados usados en experimentación y con otros fines científicos* establecidas por la Unión Europea (85/ETS123; 86/609/EEC), así como con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio promulgado por los Institutos Nacionales de Salud. Los protocolos de cuidado y tratamiento fueron aprobados por el Comité Institucional de cuidados y usos de animales de la Universidad de Granada (España).

## **1. EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBJETO DE ENSAYO:**

### **1.1. Productos objeto de ensayo**

Los Fructooligosacáridos (FOS) (Beneo<sup>®</sup>-95) utilizados en la investigación fueron suministrados por Orafti (Tienen, Bélgica) mientras que el almidón resistente (Fibersol<sup>®</sup>-2) fue adquirido a ADM, Matsutani Chemical Industry Co., Ltd (Decatur, Illinois, USA).

### **1.2 Reactivos**

Los reactivos utilizados en los ensayos fueron suministrados por Sigma Chemical (Madrid, España).

### **1.3. Animales de experimentación**

Los animales utilizados en estos estudios fueron ratas albinas hembra de la cepa Wistar de 180-200 gramos de peso, suministradas por el Servicio de Animales Experimentación de la Universidad de Granada. Se mantuvieron en el estabulario del laboratorio al menos 7 días antes de iniciar los experimentos, a una temperatura de  $22\pm 2$  °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas fueron alojadas individualmente en cubetas de makrolon con lecho de viruta, dispuestas en estantes de

acero inoxidable. Durante las dos semanas previas a ser sometidas al proceso colítico, fueron alimentadas con la correspondiente dieta para roedores (dieta Panlab A04) suministrada por Panlab S.A. (Barcelona, España) y agua corriente *ad libitum*.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos

#### **1.4 Diseño experimental (Fig. 5)**

Las ratas fueron asignadas al azar en cuatro grupos:

- Grupo control sano (n=30). Recibió una dieta normal de pienso en pellets e ingesta *ad libitum* durante 14 días. Se sacrificaron en este momento 10 animales con una sobredosis de halotano.

- Grupo tratado con FOS (2 g/rata/día), (n=20): recibió una dieta *ad libitum* de pienso durante 14 días. Se sacrificaron en este momento 10 animales con una sobredosis de halotano. Los FOS se incorporaron al agua de bebida.

- Grupo tratado con almidón resistente (2 g/rata/día), (n=20): recibió una dieta *ad libitum* de pienso durante 14 días. Se sacrificaron en este momento 10 animales con una sobredosis de halotano. El almidón resistente se le incorporó al agua de bebida.

- Grupo tratado con la mezcla de FOS y Almidón resistente (37.5% FOS y 62.5% almidón resistente) (2 g/rata/día) (n=20): recibió una dieta *ad libitum* de pienso durante 14 días. Se sacrificaron en este momento 10 animales con una sobredosis de halotano. La mezcla se incorporó al agua de bebida.

El peso de los animales, el agua bebida y la ingesta de alimentos se registraron diariamente durante todo el experimento, y cada 4-6 días se evaluó la producción de heces, su contenido en agua y la consistencia de las mismas, a fin de evaluar el potencial efecto laxante de los prebióticos.

## **2. INDUCCIÓN DE COLITIS EXPERIMENTAL MEDIANTE ÁCIDO TRINITROBENCENOSULFÓNICO (TNBS) Y ADMINISTRACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBJETO DE ENSAYO**

### **2.1. Productos objeto de ensayo**

Los Fructooligosacáridos (FOS) (Beneo<sup>®</sup>-95) utilizados en la investigación fueron suministrados por Orafiti (Tienen, Bélgica) mientras que el almidón resistente (Fibersol<sup>®</sup>-2) fue adquirido a ADM, Matsutani Chemical Industry Co., Ltd (Decatur, Illinois, USA).

### **2.2 Reactivos**

Los reactivos utilizados en los ensayos fueron suministrados por Sigma Chemical (Madrid, España).

### **2.3. Animales de experimentación**

Los animales utilizados en estos estudios fueron el resto de ratas que se utilizaron para el estudio del efecto prebiótico de ambas fibras descrito anteriormente

#### 2.4 Diseño experimental (Fig. 5)

El resto de las ratas utilizadas para el estudio del Efecto prebiótico continuaron asignadas en sus mismos grupos, subdividiéndose el grupo control sano en dos grupos de 10 animales tal y como aparece a continuación:

- Grupo control sano (n=10). Estuvieron en ayunas la noche del día 14 tras lo cual se les administró 0.25 mL de solución salina el día 15 y se continuó con su alimentación normal durante 7 días más hasta su sacrificio.

- Grupo control colítico (n=10). Estuvieron en ayunas la noche del día 14, tras lo cual se les administró 0,25 mL de TNBS el día 15 continuó durante 7 días más con su alimentación normal hasta su sacrificio.

- Grupo tratado con FOS (2 g/rata/día), (n=10): Estuvieron en ayunas la noche del día 14, tras lo cual se les administró 0,25 mL de TNBS el día 15 TNBS y se continuó con su alimentación normal 7 días más hasta su sacrificio. Los FOS se incorporaron al agua de bebida.

- Grupo tratado con almidón resistente (2 g/rata/día), (n=10): Estuvieron en ayunas la noche del día 14, tras lo cual se les administró 0,25 mL de TNBS el día 15 TNBS y se continuó con su alimentación normal 7 días más hasta su sacrificio. El almidón resistente se le incorporó al agua de bebida.

- Grupo tratado con la mezcla de FOS y Almidón resistente (37.5% FOS y 62.5% almidón resistente) (2 g/rata/día) (n=20): Estuvieron en ayunas la noche del día 14, tras lo cual se les administró 0,25 mL de TNBS el día 15 TNBS y se continuó con su alimentación normal 7 días más hasta su sacrificio. La mezcla se incorporó al agua de bebida.

El peso de los animales, el agua bebida y la ingesta de alimentos se registraron diariamente durante todo el experimento, y cada 4-6 días se evaluó la producción de heces, su contenido en agua y la consistencia de las mismas, a fin de evaluar el potencial efecto laxante de los prebióticos.

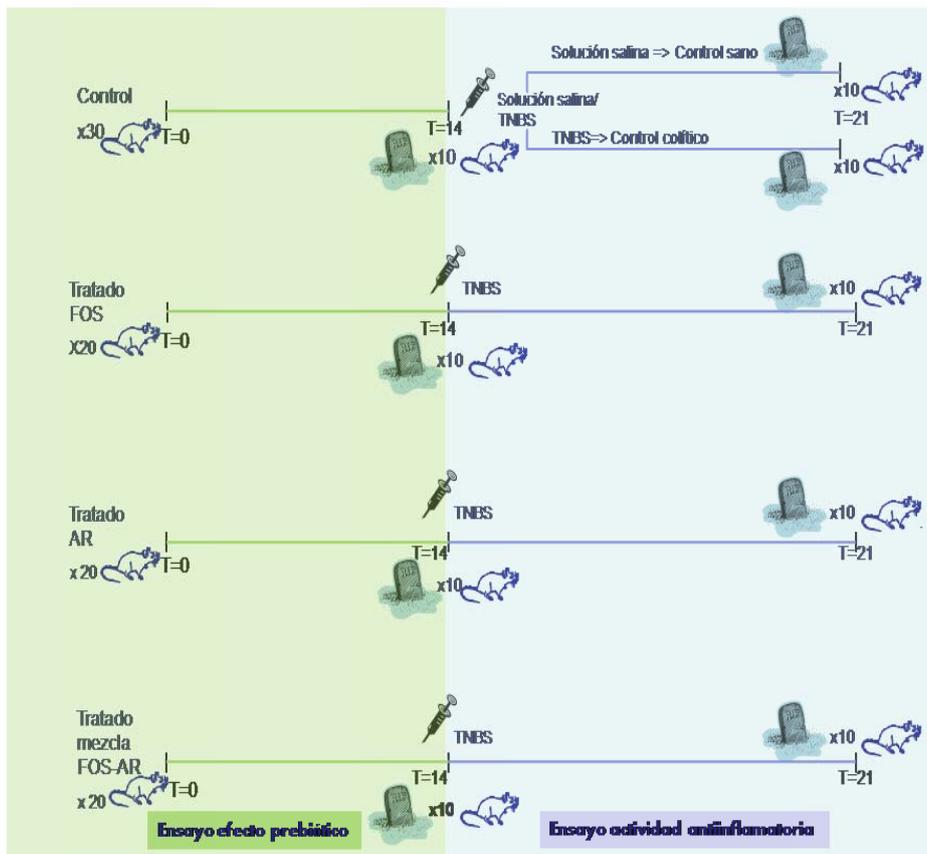
A los grupos de animales que se les administró el TNBS para inducirles la colitis, se utilizó el método descrito inicialmente en el año 1989<sup>126</sup> con algunas modificaciones incorporadas por nuestro grupo de investigación.

Para ello, los animales fueron sometidos a un período de ayuno de 24 horas, después del cual fueron anestesiados ligeramente con halotano y se procedió a la administración rectal de 0,25 ml de una solución de 10 mg de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) en etanol al 50 % (v/v). La instilación se realizó introduciendo un catéter de teflón (2 mm de grosor) 8 cm desde el ano, manteniendo a los animales en posición supina hasta la recuperación de la anestesia. La solución de TNBS se preparó a partir de un liofilizado de la

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

Dado que se han descrito variaciones en la respuesta en función del lote comercial de TNBS<sup>127</sup>, todos los experimentos se realizaron con TNBS de un mismo lote.

Al grupo de ratas del control sano, en lugar de TNBS, se les administró 0,25 ml de solución salina.



**Fig. 5** Diseño experimental del Estudio del efecto prebiótico (sombreado verde) y de la actividad antiinflamatoria (sombreado azul) de ambas fibras.

### **3. EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO DE LAS FIBRAS**

Los contenidos del ciego y colon fueron recogidos en condiciones asépticas después del sacrificar los animales y divididos en partes alícuotas para estudiar la humedad fecal, el pH y las concentraciones bacterianas (Bifidobacterias, Lactobacilos, Aerobios mesófilos y Enterobacterias).

#### **3.1 Determinación del porcentaje de agua en heces**

El porcentaje de agua de los contenidos lumbales, se calculó por diferencias de peso entre las heces frescas (inmediatamente después de la colección) y tras su secado (manteniéndolas en estufa durante 24 h en 65 ° C).

#### **3.2 Determinación de los valores de pH en heces**

Para la medida del pH, los contenidos fecales de colon y ciego, fueron suspendidos en el agua, procediéndose a continuación a la medida del pH mediante la utilización del pH-metro GLP21-21.

#### **3.3 Determinaciones bacterianas en heces**

Los estudios microbiológicos se realizaron sobre las muestras del contenido de luminal, que fueron pesadas, homogeneizados y diluidos en serie en el agua de peptona estéril. Las diluciones homogéneas de la serie 10 fueron

plateadas sobre medios de cultivo específicos para *Lactobacillus* (medio MRS., Oxoid) o *Bifidobacterium* (medio MRS. suplementado con 0.5 mg/L dicloxacilina, 1 g/L LiCl y 0.5 g/L el hidrocloreuro de L-Cisteina) e incubadas en condiciones anaerobias en una estufa anaerobia durante 24-48 h a 37 ° C. Después de la incubación, el recuento final de colonias fue expresado como  $\log_{10}$  de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces.

Finalmente, una muestra del contenido colónico se utilizó para el aislamiento de ARN, como se describe más adelante.

## **4. EVALUACIÓN DE EFECTO ANTIINFLAMATORIO INTESTINAL EN EL MODELO DE TNBS DE COLITIS DE RATA**

### **4.1. Valoración del proceso inflamatorio intestinal**

Una vez que las ratas fueron sacrificadas, mediante sobredosis de halotano, el colon fue extraído asépticamente, observándose la existencia o no de adhesiones entre el intestino grueso y los órganos adyacentes. A continuación fue colocado sobre una placa enfriada con hielo y se procedió a su limpieza retirando los restos de grasa y las adhesiones mesentéricas.

El colon se abrió longitudinalmente, se extrajeron los contenidos colónicos, para las medidas de concentraciones microbiológicas y de la producción de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Luego se lavó con solución salina isotónica y se determinó su peso y su longitud bajo una tensión constante de 2 gramos. Posteriormente, un observador ajeno al desarrollo del experimento valoró el daño macroscópico de acuerdo con el criterio descrito en el año 1995<sup>128</sup>, poniéndose de manifiesto la presencia o no de las distintas características del proceso inflamatorio (*Tabla 4*).

<b>IDM</b>	<b>Daño colónico</b>
0 Puntos	Colon normal
1 Punto	Hiperemia localizada, sin úlceras
2 Puntos	Ulceración sin hiperemia ni engrosamiento en la pared intestinal
3 Puntos	Ulceración con un punto de inflamación
4 Puntos	Dos o más puntos de ulceración e inflamación
5 Puntos	Grandes zonas de daño, inflamación y ulceración con una extensión mayor de 1 cm
6-10 Puntos	Grandes zonas de daño tisular con una extensión mayor de 2 cm, añadiéndose 1 punto (hasta 10) por cada cm adicional de daño

**Tabla 4.** Escala de valoración del índice de daño macroscópico (IDM) descrito por Bell *et al.*, (1995) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas.

#### 4.2 Estudios histológicos

En todos los casos se tomaron muestras transversales del tejido colónico (0,5 cm de longitud) para la realización de los correspondientes estudios histológicos. Para ello, las muestras obtenidas se fijaron durante tres días en una solución tamponada de formaldehído (al 4% en tampón fosfato, pH 7,2). Posteriormente se deshidrataron con etanol en concentraciones

crecientes hasta alcohol absoluto, se incluyeron en parafina, y con ayuda de un microtomo se obtuvieron cortes de 3-5  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, para su evaluación histológica mediante microscopía óptica<sup>129</sup>. (Tabla 5)

**Tabla 5.** Escala de valoración del daño histológico descrita por Stucchi *et al.*, (2000) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas.

<b>Epitelio de la mucosa</b>	<i>Ulceración: ninguna (0), leve (1), moderada (2), intensa transmural (3)</i>
<b>Criptas</b>	Actividad mitótica en: tercio inferior (0), tercio medio leve (1), tercio medio moderada (2), tercio superior (3) Infiltrado leucocitario Depleción de moco
<b>Lámina propia</b>	Infiltrado plasmocítico Infiltrado leucocitario Vascularización
<b>Deposición de fibrina</b>	Ninguna (0), mucosa (1), submucosa (2), transmural (3)
<b>Submucosa</b>	Infiltrado leucocitario Edema

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

### **4.3 Determinaciones bioquímicas**

El colon posteriormente fue dividido en diferentes segmentos para determinaciones bioquímicas: actividad mieloperoxidasa (MPO), factor de necrosis tumoral (TNF) y concentraciones de interleukina 1 (IL-1), así como la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Otra segmento se usó para el aislamiento de ARN.

Todas las medidas bioquímicas fueron realizadas dentro de la primera semana a partir del tiempo de colección de la muestra y fueron realizadas por duplicado

#### **4.3.1 Determinación de la actividad mieloperoxidasa**

La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en colon se realizó por el método descrito en el año 1984<sup>130</sup>. Esta enzima se utiliza como marcador de la infiltración de neutrófilos, aunque no es una enzima estrictamente específica de estos fagocitos.

Los fragmentos de colon fueron dispuestos sobre una placa Petri enfriada con hielo y picados con tijeras durante aproximadamente 15 segundos. A continuación, se homogeneizaron en tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 0,5% (p/v) en tampón fosfato salino (50 mM, pH=6,0), con una dilución final de 1:20 (p/v) en

un homogeneizador Heidolph hasta obtener un aspecto uniforme. El HTAB actúa como detergente, lo que facilita la liberación de la enzima MPO de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, donde se encuentra almacenada. Seguidamente, el homogenado se sonicó durante 10 segundos y se sometió a un triple proceso de congelación-descongelación que facilitó la ruptura de estructuras celulares, favoreciendo también la liberación de la enzima. Tras la última descongelación se centrifugó el homogenado a 7000 G durante 10 minutos a 4°C y se procedió a la determinación de la actividad MPO siguiendo la cinética de la reacción frente al agua oxigenada. Para ello, en una placa de 96 pocillos se añadieron 50 µl del sobrenadante a 150 µl del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por clorhidrato de o-dianisidina (0,167 mg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0,066% en tampón fosfato (50 mM, pH=6,0). El incremento de absorbancia se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro Microplate Reader (Bio-Rad). La actividad MPO se calculó por interpolación en una curva patrón, realizada con mieloperoxidasa procedente de neutrófilos humanos. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1mmol/minuto de peróxido de hidrógeno a 25°C. Los resultados se expresan como U/g tejido fresco.

#### **4.3.2. Determinación de la biosíntesis colónica de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

Para la determinación de estos parámetros bioquímicos se realizó un procedimiento simple de extracción de forma inmediata (<1 h) a la obtención del órgano<sup>131</sup>. Los fragmentos de colon se picaron con unas tijeras sobre una placa Petri con hielo durante 15 segundos y fueron incubados en tampón fosfato sódico (10 mM, pH 7,4) en proporción 1:5 (p/v) a 37°C durante 20 minutos con agitación constante. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 9000 G durante 5 minutos a 4°C y se congeló el sobrenadante obtenido a -80°C. Para la determinación de la concentración de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se utilizaron kits comerciales de ELISA suministrados por Amersham Biosciences, Reino Unido (LTB<sub>4</sub>) y R&D Systems, Reino Unido (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Los resultados se expresan como pg/g de tejido fresco.

#### **4.3.3 Determinación de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible**

La determinación de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se realizó en colon mediante Western blot. Para ello, se utilizaron los fragmentos de colon que previamente habían sido congelados a -80 °C, éstos fueron descongelados, picados y homogeneizados en proporción 1:5 (p/v) durante 1 minuto en PBS con dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) al 0,1%, desoxicolato sódico al 0,1% y Tritón X-100 al 1%, conteniendo inhibidores de proteasas (aprotinina, 1,10-fenantrolina, iodoacetamida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo).

Seguidamente, los homogenados fueron centrifugados a 10000 G durante 10 minutos. Tras determinar el contenido en proteínas por el método del BCA, los sobrenadantes (100 µg) fueron hervidos durante 4 minutos en tampón de carga Laemli 5x (Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, SDS 5%, 2-mercaptoetanol 8,8% (v/v), glicerol 37,5%, azul de bromofenol 60 µg/ml) y sometidos a electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6%. Como indicadores del peso molecular, se utilizó una mezcla de proteínas previamente marcadas con un colorante (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (PROTAN®, Schlecher & Schuell, Alemania), que posteriormente fue bloqueada durante al menos una hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% (p/v) en tampón Tris salino (*tris buffer saline*, TBS) conteniendo Tween-20 al 0,1% (v/v) (TBS-T). Transcurrido el bloqueo, las membranas se sometieron a tres lavados con TBS-T durante 5 minutos, y fueron expuestas a las correspondientes diluciones de anticuerpo incorporado en albúmina de suero bovino al 5% (p/v) en TBS-T. La incubación con un anticuerpo primario (1:2000) frente a iNOS (Transduction Laboratories, Becton Dickinson Biosciences, Madrid, España), se realizó durante toda una noche a 4°C. Un anticuerpo primario frente a β-actina se empleó como control de carga. Tras tres lavados de 5 minutos con TBS-T, las membranas fueron incubadas con anticuerpo conjugado con peroxidasa IgG anti-conejo (1:3000) durante 1 hora. Las bandas resultantes fueron detectadas por quimioluminiscencia (NEM Life Science Products, Zaventem, Bélgica) y cuantificadas por densitometría mediante el programa informático Scion Image (Scion Corporation, U.S.A.).

#### 4.3.4 Extracción y cuantificación de ARN total

El ARN total de las muestras de colon se extrajo utilizando como reactivo el TRIzol® (Invitrogen Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante, y fue transcrito inversamente utilizando cebadores oligo(dT) (Promega, Southampton, Reino Unido). La PCR Semicuantitativa se realizó con cebadores específicos (*Tabla 6*). El análisis por RT-PCR se realizó en ciclos menores de 35 usando los cebadores de limpieza para el gen  $\beta$ -actina como referencia comparativa. La reacción de PCR se realizó usando Go Taq® DNA polimerasa (Promega) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las mezclas de PCR se desnaturalizaron a 95 ° C durante 3 min, seguido de 22 a 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 1 min, alineamiento a 55-60 ° C durante 45 s, y extensión a 72 ° C durante 1 min y una extensión final a 72 ° C durante 10 min. Los productos PCR fueron analizados por electroforesis en agarosa al 1% que contenga gel de bromuro de etidio.

**Tabla 6.** Secuencias Primarias utilizadas para la reacción en cadena de la polimerasa

Gen	Sentido	Antisentido	Bp
TNF $\alpha$	5'- CGAGTGACAAGCCCGTAGCC-3'	5'-GGATGAACACGCCAGTCGCC- 3'	468
IL-1 $\beta$	5'-CATCTTTGAAGAAGAGCCCG-	5'-AACTATGTCCCGACCATTGC-3'	497

	3'			
IL-17	5'-TGGACTCTGAGCCGCATTGA- 3'	5'-GACGCATGGCGGACAATAGA- 3'		245
MCP- 1	5'- CACTATGCAGGTCTCTGTCACG- 3'	5'- CTGGTCACTTCTACAGAAGTGC-3'		434
IL-10	5' -CCTGCTCTTACTGGCTGGAG- 3'	5' -GGCAACCCAAGTAACCCTTA.3'		214
CINC- 1	5'-GGCAGGGATTCACTTCAAGA- 3'	5'-GCCATCGGTGCAATCTATCT-3'		205
ICAM- 1	5'-AGGTATCCATCCATCCCACA- 3'	5'-AGTGTCTCATTGCCACGGAG-3'		386
MUC- 2	5'- GCTCAATCTCAGAAGGCGACAC- 3'	5'- CCAGATAACAATGATGCCAGAGC- 3'		875
TFF-3	5'-ATGGAGACCAGAGCCTTCTG- 3'	5'-ACAGCCTTGTGCTGACTGTA-3'		403

β- 5'-AATCGTGCGTGACATCAAAG- 5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3' 200  
actin 3'

---

#### 4.3.5 Determinación de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC)

Para cuantificar las concentraciones de AGCC en el contenido luminal del colon, las muestras fueron homogeneizadas con 150 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7,8) (1:5, p / v) en una atmósfera de argón. Las muestras fueron incubadas durante 24 horas a 37 ° C y almacenadas a -80 ° C hasta la extracción.

Para extraer los AGCC, 50µL del patrón interno de ácido 2-methylvaleric (100 mM), 10 µL de ácido sulfúrico y 0,3 mL de cloroformo se agregaron a 1 mL del homogenizado y, a continuación, se centrifugó a 10.000 g durante 5 min a 4 ° C. Los sobrenadantes se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro y se centrifugaron 10.000 × g por 5 min a 4 ° C. Más tarde, 1 µL del sobrenadante se diluyó (1:33) e inculó en un cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer Autosystem GC-FID) equipado con una columna capilar (60 CPWAX 52CB m × 0,25 mm, 0,25 micras, Varian). El nitrógeno se utilizó como el transportador y gas, con un caudal de 1 mL / min. La temperatura de inyección fue de 250 ° C. Las concentraciones de acetato, butirato y propionato se calcularon automáticamente a partir de las áreas de los picos

usando el programa Star Chromatography WorkStation program (version 6, Varian) que estaba conectado on-line al cromatógrafo GC-FID.

#### **4.3.6 Estudios microbiológicos**

Los estudios microbiológicos se realizaron en el contenido del colon como se describe anteriormente. Además, las enterobacterias y bacterias aerobias totales se determinaron mediante el uso de placas de contaje Petrifilm(3M, St. Paul, MN) específicas para cada grupo de bacterias.



## RESULTADOS

## **RESULTADOS**

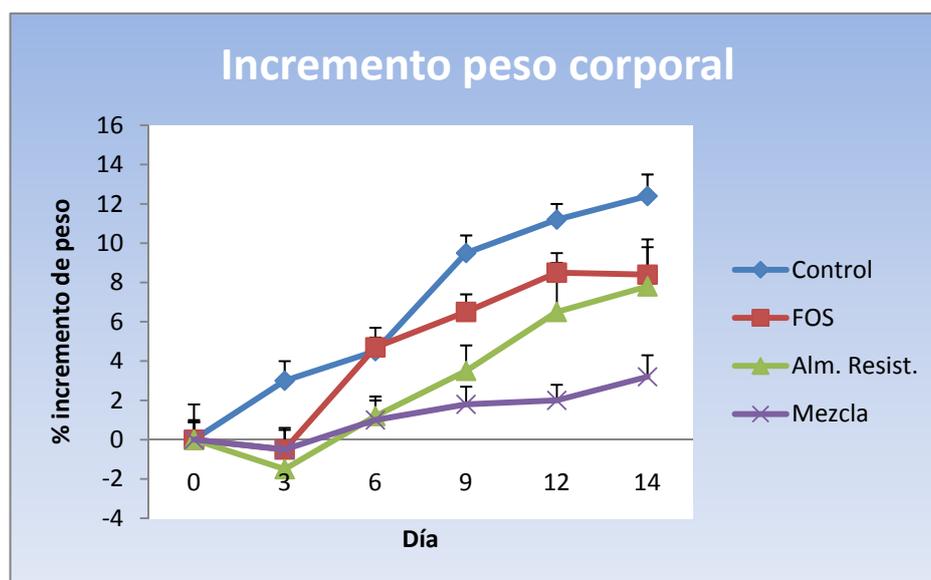
### **1. EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO DE LA COMBINACIÓN DE OLIGOSACARIDOS Y ALMIDÓN RESISTENTE EN ANIMALES SANOS.**

#### **1.1 Parámetros Generales**

La inspección ocular diaria de los animales reveló que la administración durante dos semanas a ratas sanas de los dos tipos de fibras, almidón resistente o FOS, bien de forma aislada o en asociación, no se tradujo en ningún signo de toxicidad. Igualmente, tampoco se puso de manifiesto la presencia de diarrea en estos animales.

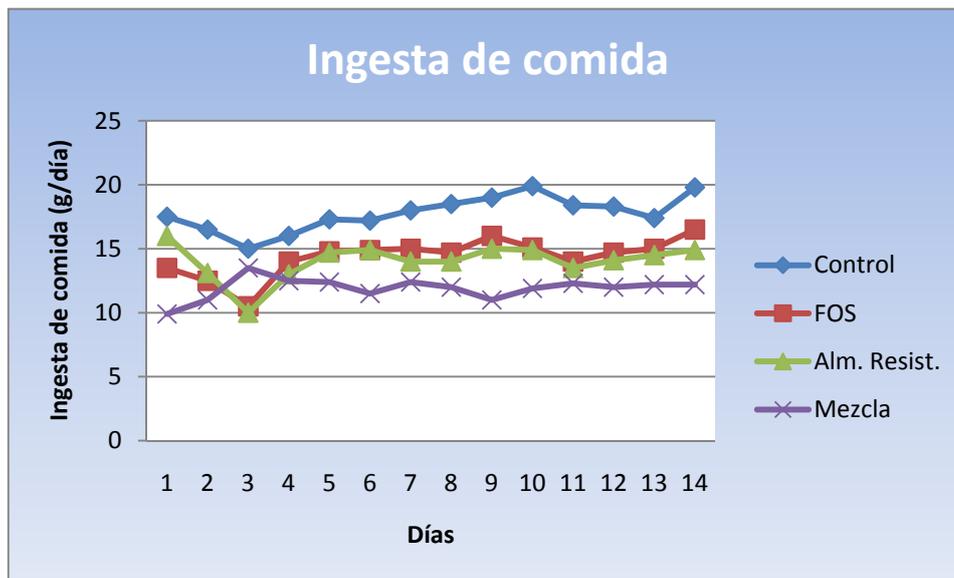
Sin embargo, todos los grupos tratados experimentaron una disminución de su peso corporal en comparación con el grupo control sin tratamiento prebiótico. Esta reducción fue evidente a partir del siguiente día del inicio del ensayo en todos los grupos, si bien sólo se mantuvo durante todo el tiempo que duró esta experiencia en aquellos animales que recibieron el almidón resistente o la mezcla de ambas fibras. Sin embargo, en el grupo de ratas que recibieron FOS hubo una recuperación del peso corporal, siendo nuevamente evidente esta disminución a partir del noveno día de administración. Es importante destacar

que la administración conjunta de las dos fibras se tradujo en una ganancia de peso significativamente inferior a la mostrada por cada uno de los grupos que recibieron cada una de las fibras por separado ( $P < 0.05$  vs. grupo control. (Fig. 6).



**Fig. 6** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (BENEO®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, en el incremento de peso de ratas. (No se incluyen los símbolos relativos a la estadística para una mejor visualización de la gráfica).

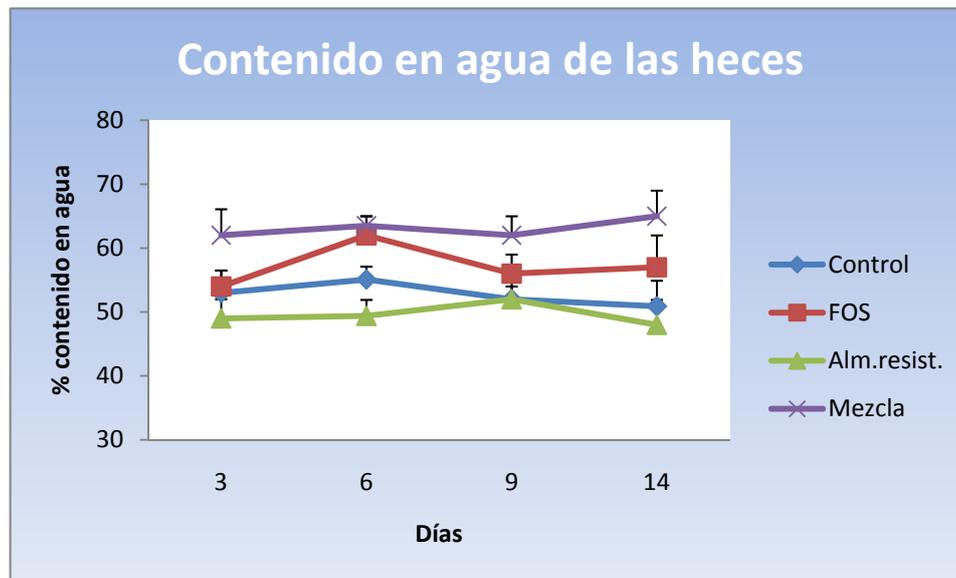
La menor ganancia de peso observada en los diferentes grupos de animales tratados con las fibras, solas o en combinación, está probablemente relacionada con la menor ingesta de alimento observada en todos los grupos tratados con las fibras en comparación con el grupo control (Fig. 7).



**Fig. 7** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (BENEO®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, sobre la ingesta de alimentos. (No se incluyen los símbolos relativos a la estadística para una mejor visualización de la gráfica).

## 1.2 Evaluación del peso de las heces y de su contenido en agua

Ninguna de las fibras administradas, de forma separada o conjunta, modificó de forma significativa el peso de las heces durante las dos primeras semanas de su administración. Sin embargo, la administración de la mezcla de las dos fibras incrementó de forma significativa el contenido de agua en heces, en comparación con aquellas excretadas por las ratas del grupo control o que recibieron el almidón resistente (*Fig. 8*).



**Fig. 8** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (BENEO®-P95) (2 / día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día) durante dos semanas. en el contenido en agua (%) de las heces.

Tras el sacrificio de los animales a las dos semanas de tratamiento con las diferentes fibras, se evaluó la proporción de agua en los contenidos intestinales del ciego y del colon. Los resultados revelaron que, en el ciego, la administración conjunta de FOS y almidón promovió un mayor contenido de agua en estos contenidos lumbales en comparación con cualquier otro grupo experimental. En el caso de los contenidos del intestino grueso, aunque la administración de FOS o de almidón resistente por separado indujo un aumento significativo en el porcentaje de agua en comparación con el grupo control, en el grupo de animales que recibió la combinación de ambas fibras

se observó un porcentaje significativamente mayor de agua. (Tabla 7).

### 1.3 Determinación del pH en los contenidos intestinales

Los valores del pH de los contenidos intestinales se modificaron por la administración de la mezcla de las dos fibras, reduciéndolos de forma significativa tanto en el ciego como en el colon en comparación con el grupo control no tratado o con las ratas que recibieron almidón resistente. La administración de FOS provocó una disminución significativa de los valores del pH sólo en el colon en comparación con el grupo control no tratado, sin mostrar diferencias estadísticas con el grupo tratado con la mezcla en ambos segmentos del intestino estudiados (Tabla 7).

**Tabla 7.** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día), a las dos semanas, sobre el porcentaje de agua y valores de pH en los contenidos del ciego y colon en las ratas.

Grupo (n=10)	CIEGO		COLON	
	% agua	pH	% agua	pH
<b>Control</b>	74,1 ± 1,9a	6,23 ± 0,10 a	66,3 ± 2,5a	6,39 ± 0,11 <sup>a</sup>
<b>FOS</b>	75,3 ± 1,2a	6,04 ± 0,16a,b	74,9 ± 1,5b	5,98 ± 0,14 <sup>b</sup>
<b>Alm. Resist.</b>	76,4 ± 0,6a	6,42 ± 0,10 a	73,3 ± 2,0b	6,53 ± 0,13 <sup>a</sup>
<b>Mezcla</b>	81,2 ± ,3b	5,86 ± 0,12 b	80,9 ± 1,8c	6,09 ± 0,17 <sup>b</sup>

Los datos se expresan como media ± error estándar. Los superíndices con letras distintas muestran diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ).

#### 1.4 Evaluación de la flora bacteriana

El análisis microbiológico mostró que el tratamiento con las diferentes fibras, bien de forma aislada o en asociación, originó una modificación en la composición de la microbiota intestinal, al cuantificar el contenido de lactobacilos y de bifidobacterias. Así, tanto el grupo tratado con FOS como el de la mezcla, promovieron un significativo incremento en el número de bifidobacterias y lactobacilos en los contenidos colónicos y en el ciego. La administración de almidón resistente únicamente aumentó de forma significativa la población de bifidobacterias en el colon. (*Tabla 8*).

**Tabla 8.** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día), durante dos semanas, sobre las concentraciones de lactobacilos y bifidobacterias en los contenidos del ciego y el colon en ratas.

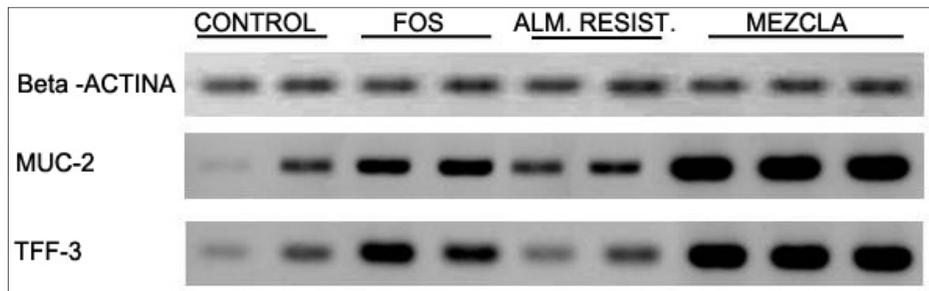
Grupo (n=10)	CIEGO		COLON	
	Lactobacilos (log CFU)	Bifidobacterias (log CFU)	Lactobacilos (log CFU)	Bifidobacterias (log CFU)
<b>Control</b>	9,07 ± 0,13 <sup>a</sup>	8,84 ± 0.13 <sup>a</sup>	9,41 ± 0,09 <sup>a</sup>	8,99 ± 0,12 <sup>a</sup>
<b>FOS</b>	9,57 ± 0,06 <sup>b</sup>	9,43 ± 0.13 <sup>b</sup>	9,62 ± 0,07 <sup>b</sup>	9,51 ± 0,19 <sup>b</sup>
<b>RS</b>	9,26 ± 0,10 <sup>a,c</sup>	9,06 ± 0.5 <sup>a</sup>	9,37 ± 0,05 <sup>a</sup>	9,40 ± 0,11 <sup>b</sup>
<b>Mezcla</b>	9,30 ± 0,04 <sup>c</sup>	9,40 ± 0.10 <sup>b</sup>	9,65 ± 0,09 <sup>b</sup>	9,37 ± 0,15 <sup>b</sup>

Los datos se expresan como media ± SD. Los superíndices con letras distintas muestran diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ).

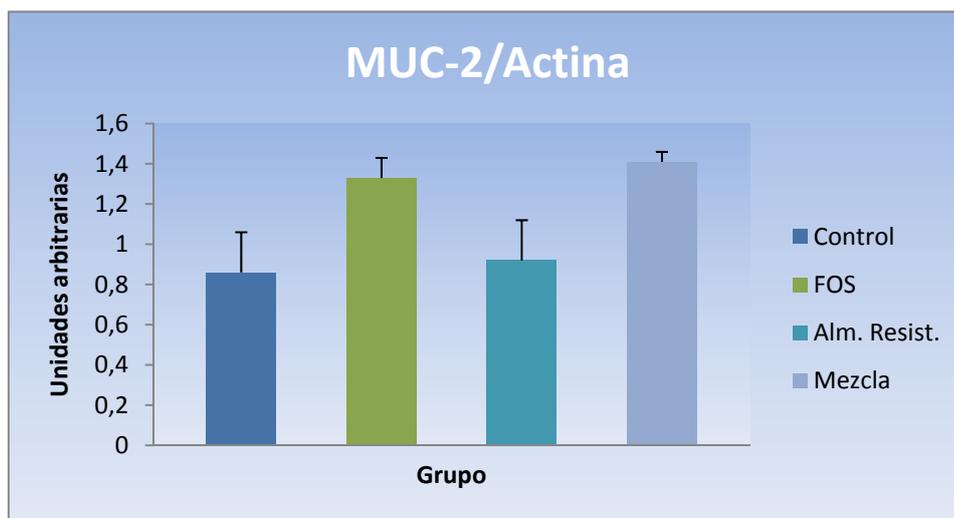
### **1.5 Evaluación de la expresión colónica de TFF-3 y MUC-2**

Las funciones de los TFF-3 funciones no están claramente definidas, pero parece ser que pueden estar relacionadas con la protección de la mucosa intestinal de las agresiones. Estas proteínas estabilizan la capa mucosa y afectan a la cicatrización del epitelio<sup>132</sup>. Las proteínas MUC-2 son secretadas en la superficie de la mucosa intestinal por las células caliciformes del epitelio. Estas proteínas, junto con pequeñas cantidades de otras proteínas relacionadas con la mucina, se polimeriza en un gel del cual el 80% de su peso son oligosacáridos con cadenas laterales que se añaden como modificaciones post-traduccionales de las proteínas de la mucina. Este gel proporciona una barrera mucosa insoluble que sirve para proteger el epitelio intestinal<sup>133</sup>.

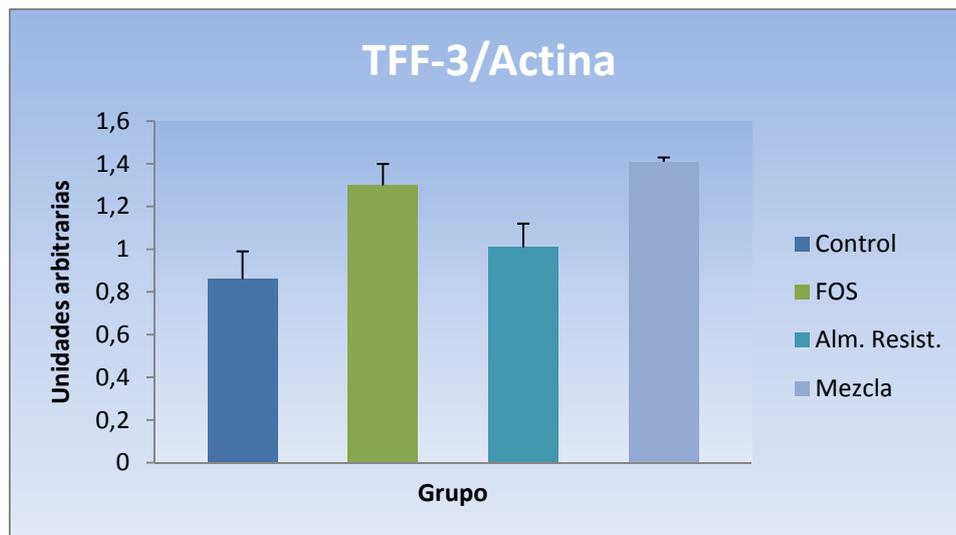
El análisis de las muestras de tejido colónico por RT-PCR reveló que todas las ratas que recibieron las fibras dietéticas aumentaron la expresión de TFF-3 y MUC-2 en comparación con las ratas no tratadas, siendo más evidente esta mayor expresión en el grupo de ratas tratadas con la mezcla de FOS y almidón resistente. (*Fig. 9.1, 9.2 y 9.3*).



**Fig. 9.1** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, sobre los marcadores con función de barrera del colon. MUC-2 v TFF-3. La expresión génica se analizó por RT-PCR.



**Fig. 9.2** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, sobre los marcadores de función de barrera del colon MUC-2. La expresión génica se analizó por RT-PCR.



**Fig. 9.3** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo ®-P95) (2 g / día), almidón resistente (RS) (Fibersol ® -2) (2 g / día), o su mezcla (2 g / día), durante dos semanas, sobre los marcadores de función de barrera del colon TFF-3. La expresión génica se analizó por RT-PCR.

## **2. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA INTESTINAL DE LA COMBINACION DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y ALMIDÓN RESISTENTE EN EL MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA MEDIANTE TNBS EN RATAS.**

### **2.1 Caracterización del modelo de colitis experimental**

Los mecanismos implicados en la iniciación y perpetuación de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) no se conocen con exactitud, aunque se han sugerido como principales componentes patológicos, la susceptibilidad genética del individuo, un sistema inmunológico alterado, un estilo de vida poco saludable y factores ambientales, principalmente la flora bacteriana intestinal<sup>134</sup>. A pesar de que no existen modelos animales que reproduzcan con fidelidad la etiopatogenia de la EII, el conocimiento adquirido a través de estos estudios experimentales nos ha permitido comprender aspectos relacionados con la aparición del brote inflamatorio y con el curso de la patología en humanos.

Además, estos modelos experimentales de inflamación intestinal permiten hacer aproximaciones a nuevas estrategias terapéuticas en fase preclínica. Entre los diferentes modelos desarrollados destaca el de la de colitis experimental inducida por el TNBS, que ha sido ampliamente utilizado en la evaluación preclínica de diferentes terapias farmacológicas<sup>135,136</sup>. Asimismo, este modelo de inflamación experimental también ha sido utilizado para la evaluación de maniobras de tipo dietético

potencialmente aplicables en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en humanos. En este sentido, distintos estudios experimentales en este modelo han apoyado el posible efecto beneficioso que los ácidos grasos n-3 pueden ejercer para atenuar el proceso inflamatorio, probablemente gracias a su capacidad de modular la síntesis de eicosanoides de tipo proinflamatorio. Igualmente, tanto compuestos procedentes de la dieta con propiedades antioxidantes, como bacterias probióticas y alimentos prebióticos, también han mostrado ser eficaces para reducir la lesión inflamatoria intestinal inducida en el colon de los animales de experimentación tras la instilación rectal de TNBS.<sup>137,138,139</sup>

La colitis inducida por la administración rectal de un enema de TNBS con etanol (al 50% en agua) fue descrita por primera vez en ratas por Morris y cols.<sup>140</sup>. Este modelo se ha reproducido en otras especies animales como en ratones y conejos. En general, existe una variabilidad en el curso clínico de esta patología entre cepas de animales de la misma especie y entre diferentes especies. Un sólo enema de TNBS llega a provocar una colitis de hasta 8 semanas de duración en las líneas de ratas más susceptibles, mientras que los ratones se muestran más resistentes a la inducción de la lesión intestinal.<sup>141,142</sup>

En la descripción inicial de este modelo de colitis experimental se procedía a la inducción del daño colónico

mediante la administración de una dosis única de 30 mg de TNBS en etanol al 50%. En el presente estudio se ha reducido la dosis a 10 mg con objeto de que el proceso inflamatorio inducido sea más fácil de modular mediante el tratamiento con los prebióticos objeto de nuestro estudio. De hecho, y en comparación con los resultados previos de nuestro grupo de investigación así como con los obtenidos por otros autores, la administración de 10 mg de TNBS provoca un daño en el intestino grueso de los animales de laboratorio cualitativamente similar al inducido con 30 mg, aunque cuantitativamente menor<sup>143</sup>.

Se ha propuesto que el daño inflamatorio que se desarrolla sobre la mucosa intestinal en este modelo de colitis experimental participa de forma determinante la capacidad del etanol en romper la barrera epitelial intestinal, lo que facilitaría el contacto entre antígenos lumenales colónicos y la lamina propia.<sup>144</sup> El resultado de este efecto sería, en consecuencia, la instauración de una fase inicial del proceso inflamatorio con la participación de macrófagos y neutrófilos, que se encuentran activados por una gran variedad de estímulos y que generan, entre otros mediadores, grandes cantidades de metabolitos derivados del oxígeno altamente reactivos.<sup>145</sup> Los efectos perjudiciales sobre la mucosa intestinal se pueden ver agravados por el efecto lesivo directo generado por el TNBS, que una vez que accede a la mucosa intestinal, es también capaz de generar *per se* metabolitos derivados del oxígeno

como el anión superóxido y  $H_2O_2$ <sup>146</sup>. Adicionalmente, el TNBS se comporta como un hapteno, por lo que puede modificar la estructura de las proteínas de la superficie celular al unirse covalentemente a residuos de lisina y tirosina, lo que provocaría también una activación exagerada de la respuesta inmune mediada por macrófagos y linfocitos T.<sup>147</sup>

La evaluación global del proceso inflamatorio intestinal se realizó mediante parámetros de carácter general como el peso de los animales, el consumo diario de comida y bebida, así como la consistencia de las heces y la presencia de sangre en éstas. Tras el sacrificio de los animales, se procedió al análisis histológico de los segmentos colónicos, tanto macroscópica como microscópicamente, así como a la determinación de distintos marcadores bioquímicos involucrados en el proceso inflamatorio intestinal inducido con el TNBS

La evolución del proceso inflamatorio intestinal durante semana siguiente a la inducción de daño se caracterizó por una disminución progresiva del peso corporal en todos los grupos de animales colíticos, hasta el momento del sacrificio. Esta pérdida de peso generalizada se puede explicar por la anorexia sufrida por los animales, manifestada por un descenso en el consumo de comida, en comparación con el grupo de animales sanos. Además, se puso de manifiesto la excreción de heces de consistencia diarreica en la mayoría de los animales con inflamación intestinal.

Tras el sacrificio de los animales siete días después de la inducción del daño mediante la administración del TNBS, se puso de manifiesto la existencia de un proceso inflamatorio en el intestino grueso, caracterizado por la presencia de estenosis, adherencias (90%) y engrosamiento de la pared intestinal. En relación con esto último, se pudo comprobar que la relación peso / longitud del colon se incrementó significativamente en más del doble en los animales colícticos en comparación con los animales sanos. (Tabla 7). Una vez limpiado el colon de sus contenidos intestinal, la evaluación macroscópica del daño mediante un observador ajeno al desarrollo del experimento de acuerdo con el criterio descrito en el año 1995<sup>148</sup> (Tabla 8), reveló la existencia de una lesión continua, fundamentalmente en el colon distal, con importantes áreas de necrosis y de inflamación transmural que afectaba a una longitud de aproximadamente 4 cm en el segmento intestinal (Tabla 9).

**Tabla 9.** Valores de los parámetros macroscópicos de los animales sanos y de los controles colícticos.

	<b>Índice de Daño Macroscópico (0-10)</b>	<b>Adhesiones (%)</b>	<b>Relación Peso/Longitud (mg/cm)</b>
<b>Sano</b>	0	0	71.0 ± 5.2
<b>Control</b>	7 (6.5-8)*	90*	175.9 ± 10.8*

**\*P<0,01 vs Grupo sano**

El estudio histológico de las muestras procedentes del grupo control reveló la existencia de numerosos signos de lesión inflamatoria que afectaba a todas las capas del intestino. De forma general, este estudio microscópico puso de manifiesto una ulceración importante de la mucosa intestinal, viéndose afectada en más del 75% de su superficie, con una importante necrosis del epitelio. En aquellas zonas en donde se mantiene la mucosa, se observa la existencia de hiperplasia de las criptas, junto con una severa depleción del contenido mucoso de las células caliciformes. Es característica la existencia de un importante infiltrado inflamatorio constituido principalmente por neutrófilos, aunque aparecen también linfocitos y macrófagos, en menor número que las células polimorfonucleares. En la submucosa, el componente inflamatorio mayoritario son las células mononucleares, si bien la existencia de numerosas células polimorfonucleares es patente. En esta zona del tejido intestinal existe una vascularización de grado moderado a severo. El infiltrado inflamatorio también se extiende hacia la capa muscular, constituido principalmente por células mononucleares (linfocitos y macrófagos), y en menor número polimorfonucleares, aunque éstos aparecen también entre las fibras. La existencia de edema también es constatable, junto con una afectación severa de la serosa, con la presencia de numerosas células inflamatorias y neovasos.

El proceso inflamatorio intestinal inducido con el TNBS también se evidenció bioquímicamente, con una alteración de

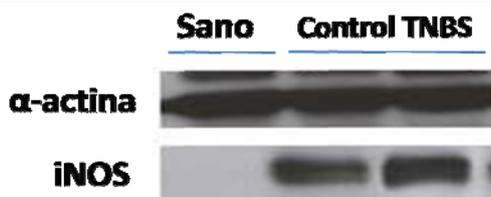
los distintos marcadores inflamatorios analizados. En este sentido, los animales del grupo control presentaron un incremento significativo de la actividad mieloperoxidasa (MPO) colónica, en comparación del grupo sano (*Tabla 10*). Esto es indicativo de la gran infiltración leucocitaria, principalmente de neutrófilos, que se pudo observar al realizar los correspondientes estudios histológicos mediante microscopía óptica.

Asimismo, la producción de las citocinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , se incrementó significativamente en los segmentos colónicos procedentes de los animales del grupo control en comparación con el grupo de animales sano (*Tabla 10*), que puede justificarse por la importante infiltración de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) que tiene lugar en el tejido inflamado, tal y como se ha descrito anteriormente microscópicamente.

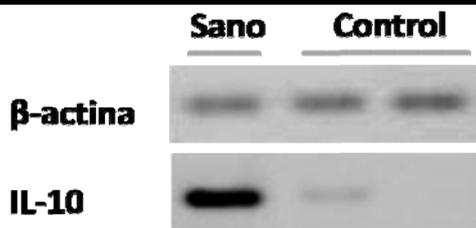
**Tabla 10.** Valores de los parámetros bioquímicos de los animales sanos y de los controles colíticos

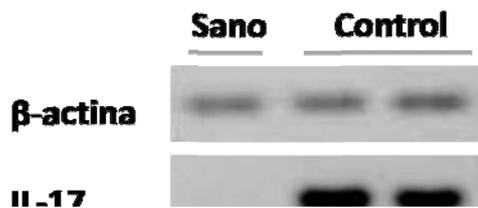
	<b>MPO</b> (unidades/g)	<b>TNF<math>\alpha</math></b> (pg/g tejido)	<b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/g tejido)
<b>Sano</b>	21,2 $\pm$ 3,9	250	2500
<b>Control</b>	122,9 $\pm$ 6,7	510	24000

Igualmente, la expresión de la enzima inducible iNOS se vio drásticamente incrementada en el tejido intestinal procedente de los animales del grupo control en comparación con los animales normales (*Figura 10*).

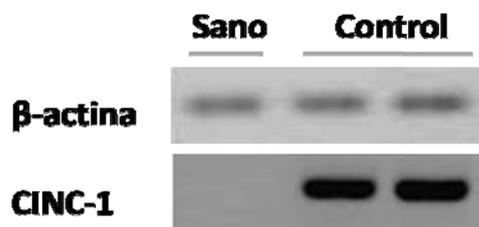
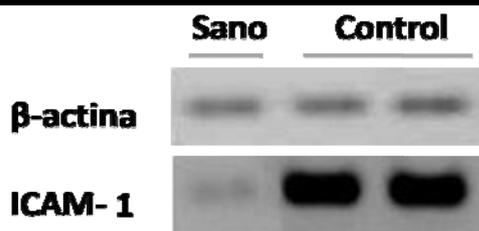


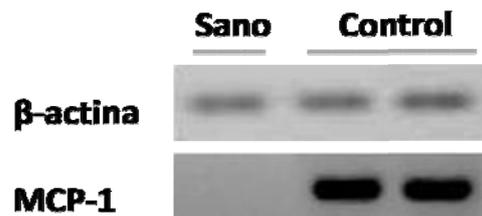
El análisis de la expresión de distintos marcadores inflamatorios mediante RT-PCR, puso de manifiesto que el daño intestinal inducido por el TNBS se asoció con un incremento en la expresión de la citocina proinflamatoria IL-17 junto con un descenso en la citocina de carácter antiinflamatorio IL-10. (*Fig. 11 y 12*).





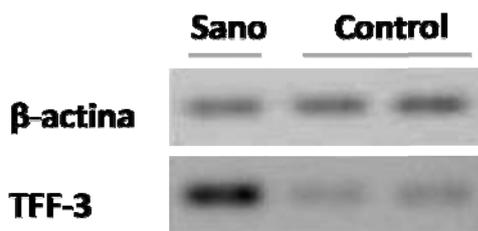
Cuando se analizaron mediadores relacionados con la infiltración leucocitaria, como ICAM-1 (Fig. 13), CINC-1 (Fig. 14) y MCP-1 (Fig. 15), se pudo comprobar un incremento en su expresión en el tejido intestinal inflamado en comparación con el grupo de animales sin daño intestinal.





BS

Por el contrario, la expresión de la proteína TFF-3 (Fig. 16), involucrada en las funciones de preservación de barrera del epitelio intestinal, estaba significativamente reducida en los animales colícticos frente a los del grupo sano.



S

Por último, el análisis de los contenidos intestinales procedentes de los animales del grupo colíctico puso de manifiesto que el proceso inflamatorio colónico inducido por el TNBS afectó a la microbiota intestinal, así como a su capacidad fermentativa. En este sentido, el recuento de las poblaciones bacterianas beneficiosas, lactobacilos y bifidobacterias, se

redujo significativamente en el grupo colítico control en comparación con los animales sanos, junto con un incremento, también significativo, de bacterias aerobias y de enterobacterias, poblaciones bacterianas potencialmente patógenas (*Tabla 11*). En consecuencia, la relación entre *bacterias beneficiosas* y *bacterias potencialmente patógenas*, es significativamente menor en el grupo de animales a los que se les administró el TNBS en comparación con las ratas sanas.

**Tabla 11.** Valores de los parámetros microbiológicos de los animales sanos y de los controles colíticos

	Lactobacilos (log. ufc/g)	Bifidobacterias (log. ufc/g)	Aerobios (log. ufc/g)	Enterobacterias (log. ufc/g)
<b>Sano</b>	9,37 ± 0,04	9,10 ± 0,06	7,05 ± 0,13	6,50 ± 0,2
<b>Control</b>	8,97 ± 0,02	8,69 ± 0,22	7,43 ± 0,16	7,08 ± 0,12

En lo referido con la producción de los Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC), cabe destacar su menor producción en los contenidos colónicos procedentes de los animales colíticos al comparar sus niveles con los obtenidos con los del grupo de animales no colíticos. (*Tabla 12*)

**Tabla 12** Valores de los AGCC de los animales sanos y de los controles colícticos

	<b>Acetato</b> ( $\mu\text{mol/g}$ contenido)	<b>Propionato</b> ( $\mu\text{mol/g}$ contenido)	<b>Butirato</b> ( $\mu\text{mol/g}$ contenido)
<b>Sano</b>	204,4 $\pm$ 30,1	84,2 $\pm$ 9,1	43,9 $\pm$ 5,3
<b>Control</b>	100,1 $\pm$ 22,5	485 $\pm$ 10,3	20,2 $\pm$ 3,2

## 2.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria intestinal de las fibras dietéticas y sus asociaciones.

### 2.2.1 Parámetros Macroscópicos

El pretratamiento de las ratas colícticas con las diferentes tipos de fibras dietéticas produjo una mejora del proceso inflamatorio inducido por TNBS en comparación el grupo control no tratado. Este efecto antiinflamatorio se evidenció macroscópicamente por un daño colónico significativamente menor en comparación con el grupo de ratas control ( $P < 0.05$ ); (*Tabla 13*), debido a una reducción significativa en la extensión del segmento intestinal con necrosis y/o inflamación como consecuencia de la administración de TNBS/etanol.

**Tabla 13** Efecto preventivo de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día) sobre el índice del daño macroscópico, relación peso/longitud, porcentaje de adhesiones y actividad mieloperoxidasa (MPO) en la colitis experimental inducida por TNBS en ratas.

Grupo (n=10)	Índice de daño macroscópico (0-10)	Peso/longitud (mg/cm)	Adhesiones (%)	Actividad MPO (unidades/g)
No- colítico	0	71,0 ± 5,2 <sup>b</sup>	0	21,2 ± 3,9 <sup>c</sup>
Control TNBS	7 (6,5-8) <sup>a</sup>	175,9 ± 10,8 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	122,9 ± 67 <sup>a</sup>
FOS	6,5 (5-7,5) <sup>b</sup>	158,6 ± 11,3 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	72,5 ± 10,9 <sup>b</sup>
Almidón resistente	6 (5,5-8) <sup>b</sup>	145,1 ± 4,4 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	102,2 ± 5,9 <sup>a,b</sup>
Mezcla	6 (5-7) <sup>b</sup>	145,1 ± 12,4 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	89,6 ± 7,8 <sup>b</sup>

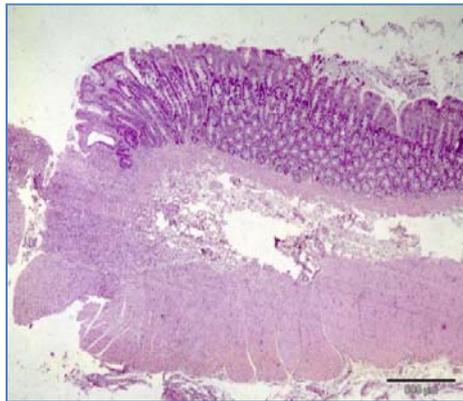
El índice de daño macroscópico para cada rata se asignó de acuerdo con los criterios indicados por Bell et al en 1995; los datos se expresan como mediana (rango). Los superíndices con letras distintas muestran diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0.01$ ) (Mann-Whitney U-test). Los valores correspondientes a la relación peso /longitud colónica y la de la actividad MPO se expresan como media ± error. Los superíndices con letras distintas muestran diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ). (Bonferroni t-test). En la columna correspondiente a los porcentajes de adhesiones, los superíndices con letras distintas muestran diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ) (test de chi-cuadrado).

Sin embargo, este efecto beneficioso fue más evidente en aquellas ratas colíticas tratadas con la combinación de las dos fibras dietéticas. En este sentido, además de reducir la extensión de la lesión inflamatoria en el colon, este grupo mostró una disminución significativa en el porcentaje de adherencias entre el intestino y los órganos adyacentes, en comparación con todos los otros grupos colíticos.

Por último, ningún tratamiento fue capaz de reducir la relación peso/longitud colónica (*Tabla 7*).

### 2.2.2 Parámetros Histológicos

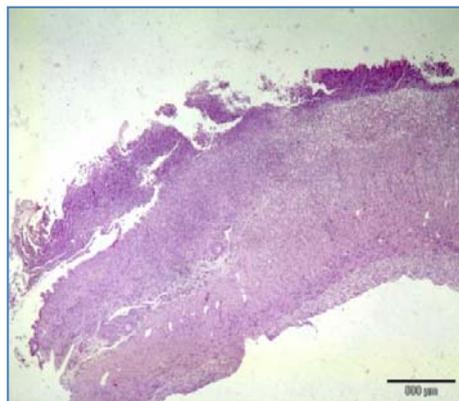
El análisis de las muestras intestinales procedentes del grupo de animales tratados con FOS (*Fig. 17*) reveló una evidente recuperación del proceso inflamatorio intestinal inducido con el TNBS, asignándoles un índice de daño microscópico de 13 (9 – 19), significativamente inferior al mostrado para el grupo control sin tratamiento ( $p < 0,05$ )



Grupo animales tratados con FOS



animales sanos



Grupo animales control colítico

**Fig. 17** Estudio histológico comparativo de los FOS vs los animales sanos y los controles instilados con TNBS

De forma general, en estas muestras la ulceración de la mucosa es inferior al 25%, y únicamente en dos muestras está comprendida entre el 50 y el 75% de la superficie de la mucosa. En la mayoría de las muestras analizadas el infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia es leve y está constituido principalmente por células polimorfo nucleares. Además, el epitelio de la mucosa está preservado y sólo se observa una ligera dilatación de las criptas. Aunque la inflamación se extiende a lo largo de las distintas capas intestinales, lo hace de forma moderada en submucosa y leve en la capa muscular, manifestándose la presencia de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, aunque siempre de carácter leve. Igualmente, se observa un incremento moderado en el número de vasos de la submucosa. Por último, en estas muestras el edema en la capa muscular es leve y no aparece afectación de la serosa.

En relación con el grupo que recibió el almidón resistente (*Fig. 18*), se observa también una recuperación del epitelio, aunque en menor medida que en el grupo anterior tratado con FOS, de forma que el Índice de Daño Microscópico asignado fue de 22,5 (18 - 28) ( $p < 0,05$  frente al grupo colítico control).

La ulceración de la mucosa se extiende en la mayoría de las muestras evaluadas entre el 25 y 50%, mientras que en una de las muestras la zona de ulceración de la mucosa es superior

al 75%. Sin embargo, como sucedía en el grupo anterior y a diferencia del grupo control, la presencia de células inflamatorias en la lámina propia es menos evidente, observándose fundamentalmente células polimorfonucleares.

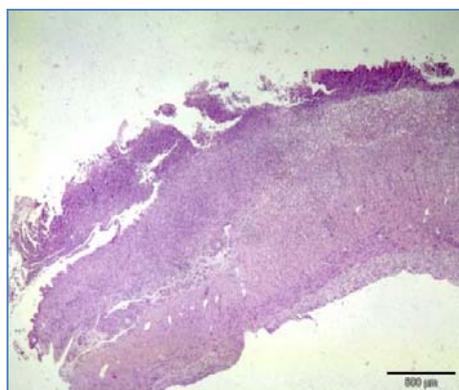
De forma general, este infiltrado inflamatorio es de carácter leve, y las criptas mantienen la estructura sin presencia de hiperplasia y con una ligera depleción de las células caliciformes. En la submucosa, el infiltrado está constituido sobre todo por células mononucleares, siendo de carácter leve a moderado. También aparecen células polimorfonucleares, sobre todo neutrófilos de forma leve o moderada, y un incremento moderado de la vascularización. La inflamación se extiende a la capa muscular y a la serosa, formado sobre todo por linfocitos y macrófagos, observándose un leve edema entre las fibras musculares, mientras que la serosa aparece afectada de forma leve.



Grupo tratado con almidón resistente



Grupo de animales sanos



Grupo control colítico

**Fig. 18** Estudio histológico comparativo del Almidón Resistente vs los animales sanos y los controles instilados con TNBS

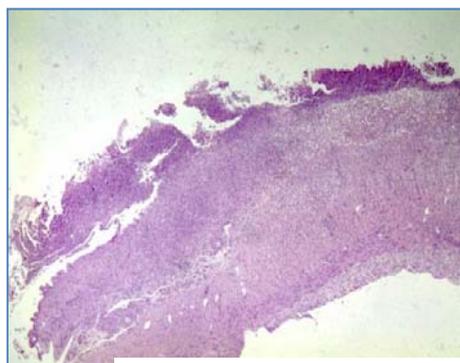
El estudio de las muestras procedentes de los animales a los que se les administró la combinación de ambas fibras (*Fig. 19*) confirma el efecto antiinflamatorio intestinal constatado macroscópicamente, obteniéndose una reducción significativa del Índice de Daño Microscópico en comparación con el grupo colítico sin tratamiento, que fue de 14,5 (7 - 16) ( $p < 0,05$ ), con características similares a las descritas anteriormente en el grupo de animales que recibió FOS.



Grupo de animales tratados con la



Grupo de animales sanos



Grupo de animales instilados con TNBS

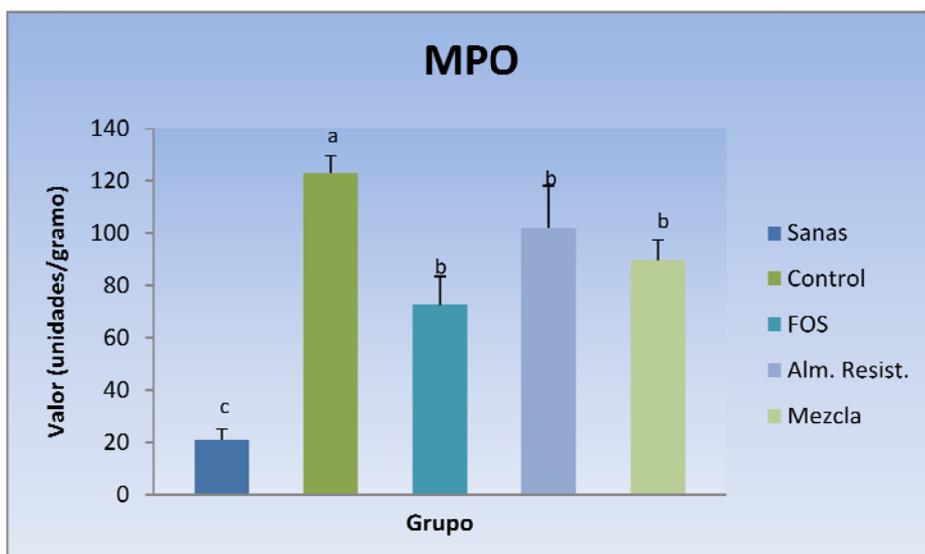
**Fig. 19** Estudio histológico comparativo de la mezcla de las fibras vs los animales sanos y los controles instilados con TNBS

En este sentido, la ulceración de la mucosa está comprendida mayoritariamente entre el 25% y el 50%, si bien una de las muestras presenta una ulceración que afecta a menos del 25% de la superficie de la mucosa. La intensidad del infiltrado inflamatorio es similar al descrito para los animales que recibieron FOS, estando constituido en este caso de forma casi única por células polimorfonucleares neutrófilos, sin la presencia de células mononucleares. La imagen histológica de las criptas es normal, con una ligera hiperplasia del epitelio, apareciendo dilatación en una de las muestras. También el infiltrado inflamatorio de la submucosa es similar en este grupo al que recibió FOS, aunque en este grupo, está constituido fundamentalmente por macrófagos y linfocitos, siendo éste de carácter leve / moderado y severo. El aumento de la vascularización es leve en todos los casos. En las capas muscular y serosa también se observan células inflamatorias aunque de forma leve .

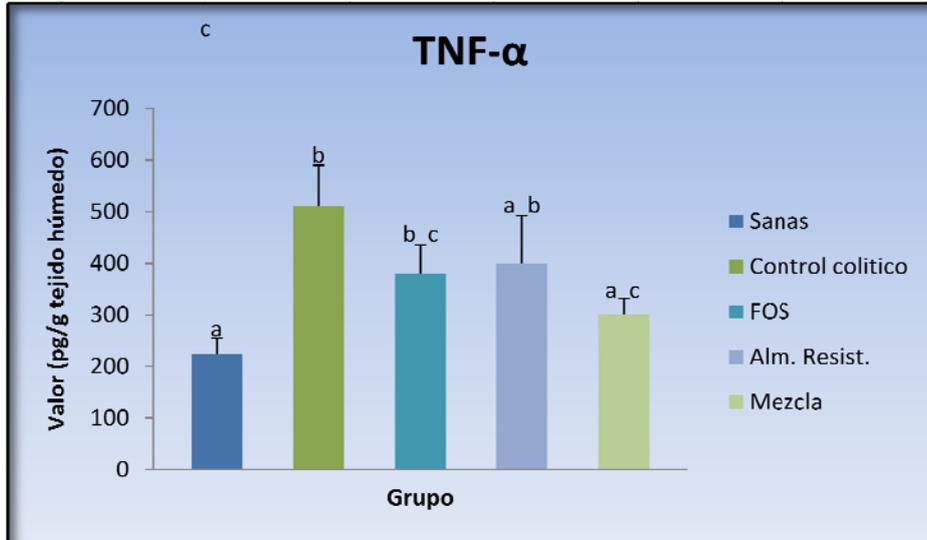
### *2.2.3 Parámetros Bioquímicos*

El efecto antiinflamatorio intestinal se corroboró bioquímicamente por una reducción en la actividad MPO colónica, que fue significativa en aquellos grupos de animales colíticos tratados con FOS o con la mezcla de ambas fibras (*Fig. 20*), confirmando la menor infiltración leucocitaria evidencias tras la realización de los correspondientes estudios histológicos.

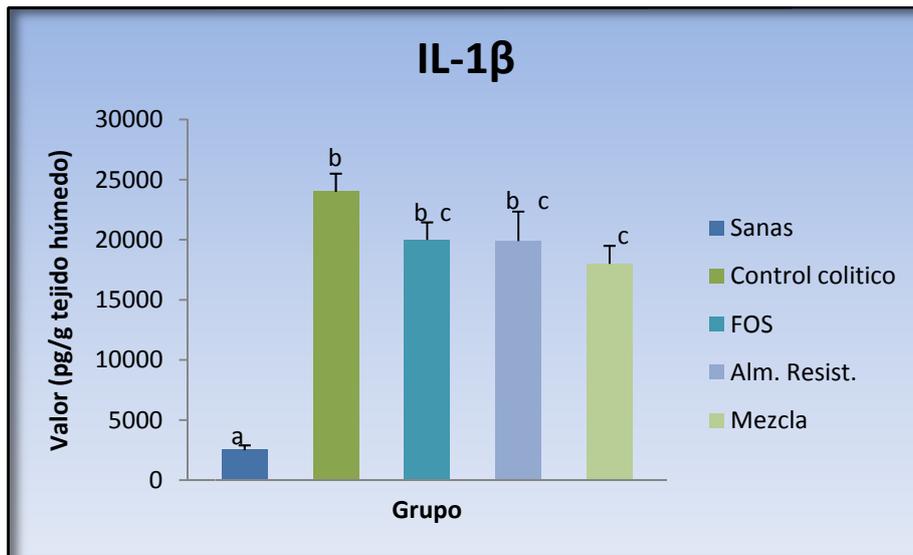
Asimismo, únicamente las ratas colíticas que recibieron la combinación de ambas fibras, mostraron una disminución significativa en la producción de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Fig. 21 y 22), si bien este grupo no manifestó diferencias significativas cuando se comparó los grupos de animales que recibieron el tratamiento de cada una de las fibras por separado.



2 / O t-

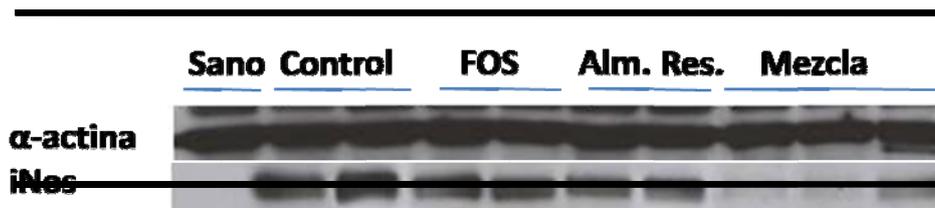


2 / x e s



neo ®-P95)  
u mezcla (2  
ción de IL-  
os datos se  
con letras

Por otra parte, las ratas tratadas con el almidón resistente o con la mezcla mostraron menor expresión de la iNOS que en el grupo de ratas control colítico, mientras que el grupo de animales colíticos que recibió FOS no mostró ninguna modificación significativa. (Fig. 23)



Cuando se analizan otros mediadores involucrados en la respuesta inmune alterada en el proceso inflamatorio inducido con TNBS, la administración de las fibras, tanto de forma aislada como en combinación, originó una marcada reducción en la expresión de la citocina IL-17 (Fig. 24), de las quimiocinas CINC-1 y MCP-1 (Fig. 25 y 26), así como de la molécula de adhesión ICAM-1 (Fig. 27). Sin embargo, sólo el grupo de animales tratados con la mezcla de fibras fue capaz de normalizar producción colónica de IL-10, que se encontraba disminuida como consecuencia del daño intestinal generado (Fig. 28).





Por último, el tratamiento con cualquiera de las fibras, FOS y/o almidón resistente, originó un incremento en la

expresión de TFF-3 en el segmento colónico inflamado, si bien la combinación de las fibras mostrara una eficacia más alta que cada fibra por separado (*Fig. 29*).

#### *2.2.4 Análisis Microbiológico*

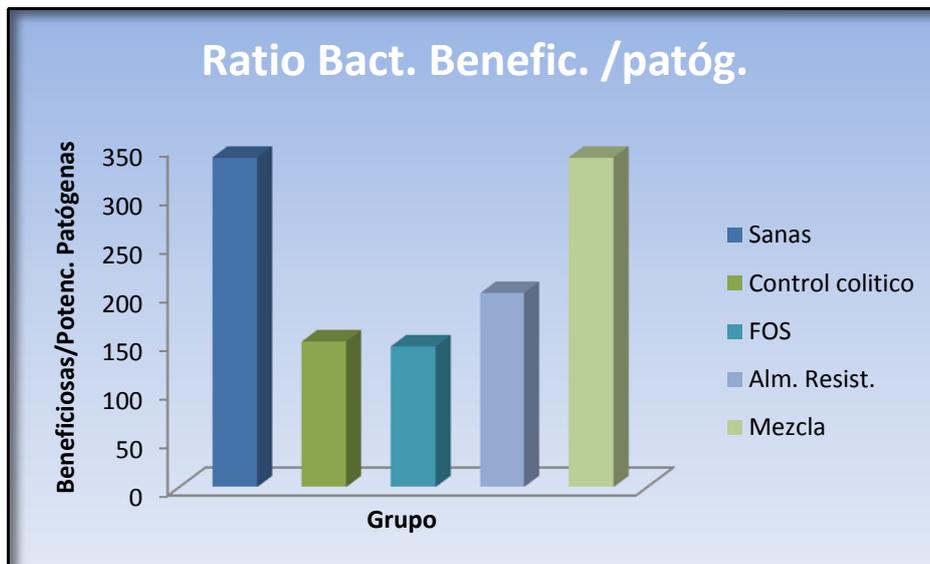
En relación con el impacto que la administración de las dos fibras, bien de forma aislada o en combinación, tiene sobre la población bacteriana del lumen intestinal, es importante indicar que ninguno de los tratamientos fue capaz de contrarrestar de manera significativa la disminución de los recuentos de lactobacilos. Sin embargo, tanto el grupo tratado con FOS como el que recibió la mezcla de ambas fibras, mostraron un aumento en las concentraciones de bifidobacterias en ratas colíticas en comparación con los correspondientes al grupo control colítico. (*Tabla 14*).

Además, la ingesta de las diferentes fibras dietéticas, solas o en combinación, originó una disminución significativa en el número de enterobacterias en comparación con los controles colíticos no tratados; aunque sólo la combinación de ambas fibras fue capaz de reducir las concentraciones de bacterias aerobias totales (*Tabla 12*). El resultado de estas acciones fue un aumento en la relación de bacterias beneficiosas (lactobacilos + bifidobacterias) / potenciales patógenos (enterobacterias + aerobias totales), restaurándose los valores obtenidos en el grupo de ratas sanas (*Fig. 30*).

**Tabla 14.** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g/día), o de su mezcla (2 g/día), sobre la concentración bacteriana en los contenidos colónicos en la colitis experimental inducida con TNBS en ratas

Grupo (n=10)	BENEFICIOSAS		PATÓGENOS POTENCIALES	
	Lactobacilos (log UFC)	Bifidobacterias (log UFC)	Aerobios totales (log UFC)	Enterobacterias (log UFC)
No colítico	9,37 ± 0,04 <sup>a</sup>	9,10 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,05 ± 0,13 <sup>a,c</sup>	6,50 ± 0,27 <sup>a</sup>
Control TNBS	8,97 ± 0,02 <sup>b</sup>	8,69 ± 0,22 <sup>b</sup>	7,43 ± 0,16 <sup>b</sup>	7,08 ± 0,12 <sup>b</sup>
FOS	9,04 ± 0,19 <sup>a,b</sup>	9,19 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,47 ± 0,15 <sup>b</sup>	6,61 ± 0,39 <sup>a,b</sup>
RS	9,17 ± 0,15 <sup>a,b</sup>	8,95 ± 0,13 <sup>a,b</sup>	7,35 ± 0,18 <sup>a,b</sup>	6,22 ± 0,26 <sup>a</sup>
Mezcla	9,06 ± 0,20 <sup>a,b</sup>	9,23 ± 0,07 <sup>b</sup>	6,74 ± 0,17 <sup>c</sup>	6,21 ± 0,21 <sup>b</sup>

Los datos se expresan como media ± DE. Los superíndices con letras distintas muestras diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ).



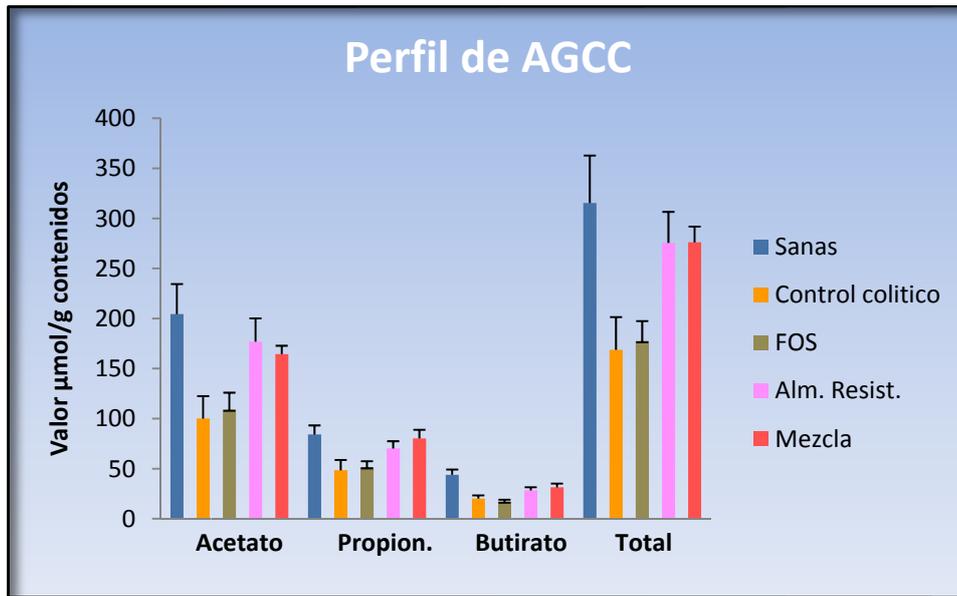
### 2.2.5 Determinación de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC)

El pretratamiento de los animales colícticos con almidón resistente, solo o en combinación, se tradujo en una restauración de la producción AGCC, acetato, propionato y butirato, en comparación con las ratas colícticas, tanto del grupo control como las tratadas con FOS, obteniendo valores similares a los mostrados en el grupo de animales no colícticos (*Tabla 13*) y (*Fig. 31*).

**Tabla 13.** Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) (Beneo®-P95) (2 g/día), almidón resistente (RS) (Fibersol®-2) (2 g/día), o su mezcla (2 g/día), sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta AGCC (acetato, propionato y butirato) en los contenidos intestinales en el modelo de colitis experimental en ratas inducida por TNBS

Grupo (n=10)	Acetato ( $\mu\text{mol/g}$ contenido)	Propionato ( $\mu\text{mol/g}$ contenido)	Butirato ( $\mu\text{mol/g}$ contenido)	Total ( $\mu\text{mol/g}$ contenido)
No colíctico	204,4 $\pm$ 30,1 <sup>a</sup>	84,2 $\pm$ 9,1 <sup>a</sup>	43,9 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup>	315,4 $\pm$ 47,5 <sup>a</sup>
Control –TNBS	100,1 $\pm$ 22,5 <sup>b</sup>	48,5 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>	20,2 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	168,8 $\pm$ 32,7 <sup>b</sup>
FOS	108,9 $\pm$ 17,1 <sup>b</sup>	51,4 $\pm$ 6,1 <sup>b</sup>	17,1 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	177,4 $\pm$ 20,1 <sup>b</sup>
RS	176,9 $\pm$ 23,3 <sup>a</sup>	70,3 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	28,4 $\pm$ 3,1 <sup>c</sup>	275,6 $\pm$ 31,0 <sup>a</sup>
Mezcla	164,5 $\pm$ 8,4 <sup>a</sup>	80,3 $\pm$ 8,6 <sup>a</sup>	31,4 $\pm$ 3,8 <sup>a,c</sup>	276,1 $\pm$ 15,8 <sup>a</sup>

Los datos se expresan como media  $\pm$  DE. Los superíndices con letras distintas muestran diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ).



) (2  
obre  
to y  
l en



DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

Los alimentos funcionales, cuando se ingieren en el contexto de una dieta equilibrada y un estilo de vida saludable, son utilizados para mejorar el estado de salud del individuo y para la prevención de enfermedades. Sin embargo, su diseño y desarrollo requieren de la validación de su eficacia, que debería basarse en los conocimientos científicos básicos. Los prebióticos son componentes interesantes de diferentes alimentos funcionales, que han demostrado ser capaces de promover cambios en la microbiota gastrointestinal y otorgar beneficios para la salud del hospedador<sup>149,150</sup>.

Entre los prebióticos, la fibra dietética es uno de sus principales representantes. Se compone de los restos de polisacáridos de las células comestibles de las plantas y de sustancias asociadas resistentes a la hidrólisis de las enzimas humanas del intestino; en consecuencia, llega intacta al intestino grueso donde puede ser fermentada por la microbiota, lo que induce a su modificación.<sup>151</sup> Sin embargo, hay varios tipos de fibra dietética en función de dos de las propiedades que la caracterizan: solubilidad y tasa de fermentación.

Estudios previos han demostrado que estas propiedades determinarán el grado de fermentación y en qué porción del intestino grueso tendrá lugar su efecto beneficioso<sup>152,153</sup>. Por esta razón, la combinación de diferentes tipos de fibra dietética

puede ser una manera interesante de lograr una fermentación más sostenida a lo largo de todo el colon, obteniendo así un amplio espectro de efectos beneficiosos para el individuo.

Teniendo en cuenta este enfoque innovador, lo primero que se evaluó fueron los efectos que la combinación de FOS (BENEO<sup>®</sup>-P95) y almidón resistente (Fibersol<sup>®</sup>-2), dos fibras solubles con una tasa de fermentación diferente, sobre la función intestinal en animales sanos.

La mezcla fue diseñada con una menor proporción de FOS que de almidón resistente para reducir al mínimo la producción de gas en el intestino, evitando así uno de los síntomas indeseables más frecuente de los prebióticos en humanos<sup>154</sup>. Se ha demostrado que los carbohidratos con un bajo grado de polimerización (inferior a 10), al igual que el FOS incluido en Beneo<sup>®</sup>-P95, son capaces de producir mayores cantidades de gas que los compuestos de cadena larga<sup>155</sup>, como el almidón resistente en Fibersol<sup>®</sup><sup>156</sup>.

Los resultados revelaron que la combinación de FOS y almidón resistente aumentó el porcentaje de agua en los contenidos intestinales, siendo superior al observado con cada una de las fibras administradas de forma independiente; sin embargo, la administración de cada fibra dietética por separado también fue capaz de aumentar significativamente la proporción de agua en los contenidos del colon, en comparación con ratas control sin tratar.

Además, la administración de FOS a los animales de laboratorio provocó un aumento significativo en el recuento de lactobacilos y bifidobacterias, tanto en ciego como en colon, de forma similar a como ha sido descrito previamente con diferentes fructanos tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*<sup>157,158</sup>. Los mecanismos por los cuales las bifidobacterias y lactobacilos ejercen un efecto antagónico frente a bacterias potencialmente patógenas no están totalmente dilucidados en la actualidad, habiéndose propuesto la participación de distintos factores como la inhibición del proceso de adhesión a las células epiteliales colónica, mediante la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas), ácidos biliares desconjugados, la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), o mediante estimulación de órganos linfoides asociados al tracto intestinal<sup>159</sup>, así como por competencia de nutrientes. Se ha observado que bacterias pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* o *Lactobacillus* inhiben el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus choleraesuis*, debido a que producen ácido láctico y ácido acético que son capaces de crear un ambiente más ácido en el intestino grueso impidiendo de esta manera el crecimiento de patógenos oportunistas que podrían causar enfermedades en el hospedador, como también se comprueba por la disminución en los valores de pH en los contenidos intestinales<sup>160</sup>. De este modo los lactobacilos y las bifidobacterias ejercen un papel importante en el efecto barrera de la mucosa intestinal frente a infecciones. (Fig. 31)

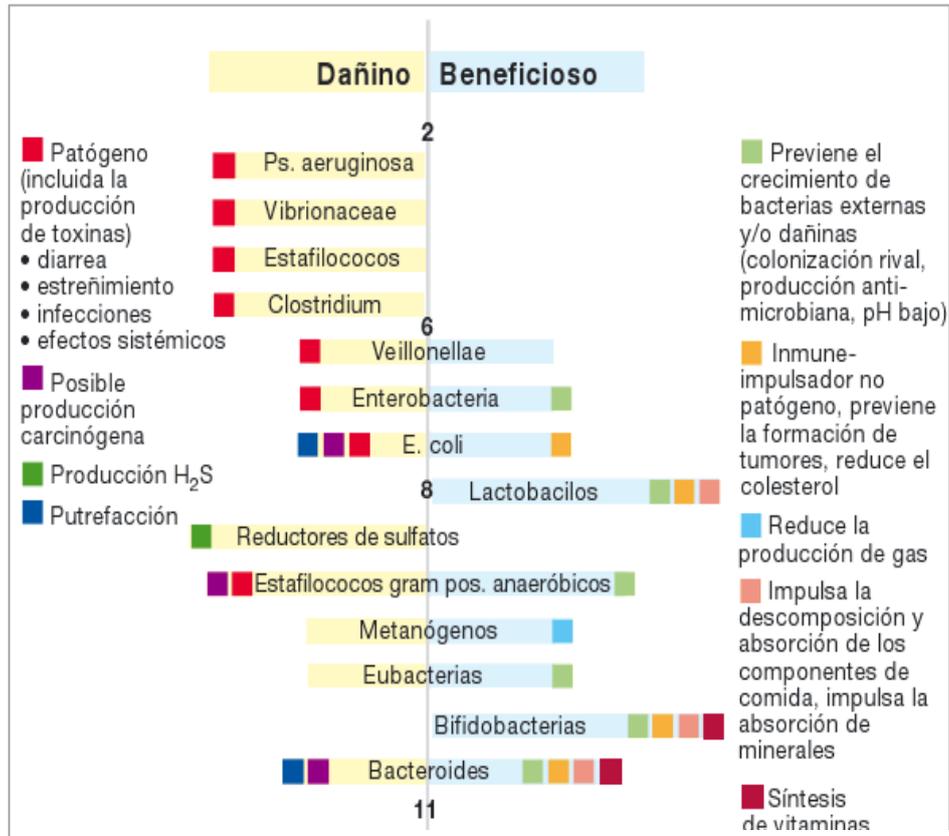


Fig. 32 Efectos beneficiosos/patógenos de algunas bacterias en el intestino grueso

En relación con la modificación del pH de los contenidos intestinales, se comprobó que la administración de la mezcla de los dos tipos de fibras originó un descenso significativo tanto en el ciego como en el colon, con valores similares a los obtenidos con FOS. Dado que la incorporación de almidón resistente no fue capaz de modificar el recuento de lactobacilos o bifidobacterias en ratas sanas, los efectos observados con la administración de la mezcla de ambas fibras pueden ser

atribuibles en su mayoría a la presencia de FOS. Es interesante destacar que los diferentes efectos prebióticos observados en nuestras experiencias y descritos en el presente estudio con ambos tipos de fibras fermentables, han sido igualmente documentados previamente con FOS y el almidón de patata cruda cuando se han administrado a ratas sanas, aunque a mayores dosis.<sup>161</sup>

Por el contrario, el papel beneficioso del almidón resistente en la combinación de ambas fibras es evidente cuando se evaluaron las expresiones de MUC-2 y TFF-3 en las muestras de colon.

Las mucinas (MUC) son glicoproteínas de alta masa molecular (0.25-2 MDa) constituidas de esqueletos polipeptídicos cuya parte central está altamente glicosilada con O-glicanos principalmente, en grupos de secuencias repetitivas, mientras que los extremos amino y carboxilo presentan una menor glicosilación. Los tipos de mucinas que se encuentran mayormente en el intestino delgado y grueso son MUC2 y MUC3 producidas por las células caliciformes<sup>162</sup>. El MUC-2 es el componente principal de la capa mucosa protectora colónica, y es secretada en las superficies mucosas<sup>163</sup>. Allí, la MUC-2, junto con pequeñas cantidades de proteínas relacionadas con la mucina, se polimeriza en un gel de los cuales el 80% en peso cadenas de oligosacáridos laterales que se agregan como modificaciones post-traduccionales de las proteínas de mucina.

Este gel proporciona una barrera mucosa insoluble que sirve para proteger el epitelio intestinal<sup>164</sup>.

Mientras que los TFF-3 son proteínas secretoras estables presentes en la mucosa intestinal constituidas por un péptido bioactivo que interviene en la protección epitelial y en la reparación del mismo. Este péptido es producido específicamente por las células caliciformes del intestino y aunque sus funciones no están claramente definidas, parece ser que pueden estar relacionadas el mantenimiento de la integridad del epitelio gastrointestinal y la estabilización de la capa mucosa, Ejerce un efecto citoprotector local frente a factores de agresión, limita el desarrollo de fenómenos apoptóticos y estimula la restitución celular y la cicatrización del epitelio.

El tracto gastrointestinal está constantemente expuesto a una compleja mezcla de agentes potencialmente lesivos, formada por ácidos, bacterias y productos bacterianos<sup>165</sup>. El epitelio gastrointestinal, una simple capa de células que permanecen unidas por uniones semipermeables, forma una barrera física contra estos agentes. Sin embargo, con frecuencia se producen pequeñas roturas de la superficie epitelial, por lo que la rápida restitución de la continuidad epitelial es esencial. Aunque este proceso puede ser modulado por numerosos factores, las investigaciones más recientes indican que los péptidos trébol podrían tener un papel fundamental en la reparación del epitelio<sup>166</sup>. La familia de los factores trébol (TFF)

está compuesta por los péptidos gástricos TFF-1 y TFF-2, y el factor trébol intestinal (TFF-3). Son pequeñas proteínas resistentes a las proteasas, secretadas en la superficie mucosa por las células productoras de moco del tracto gastrointestinal y cuya síntesis aumenta en las zonas lesionadas del epitelio. La función principal conocida de estos péptidos es la de participar activamente en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal, tanto en condiciones fisiológicas como facilitando su reparación una vez que la inflamación o la ulceración han ocurrido. Estas moléculas llevan a cabo su acción protectora actuando como barrera física, al interactuar directamente con el moco en la superficie mucosa, incrementando su densidad óptica, viscosidad y estabilidad física<sup>167</sup>. Otro mecanismo adicional que pueden utilizar para desarrollar su acción es a través de su unión a receptores específicos en la superficie celular. Los péptidos trébol son mitógenos *in vitro*, es decir, promueven la migración de las células epiteliales en cultivo y que se relacionan de manera muy estrecha con los factores de crecimiento.

El presente estudio manifiesta que todos los tratamientos con fibra dietética aumentaron la expresión de MUC-2 y TFF-3 en comparación con las ratas control sin tratamiento, aunque esto fue más evidente con la mezcla de ambas fibras, indicando así las propiedades adicionales ejercidas por los FOS y el almidón resistente. Este efecto puede estar igualmente relacionado con las modificaciones inducidas por estos

prebióticos en la microbiota intestinal ya que se ha demostrado que los lactobacilos y las bifidobacterias influyen positivamente en la función de barrera intestinal, disminuyendo la permeabilidad de la mucosa.<sup>168</sup>

Una vez demostrado el sinergismo de los efectos prebióticos de la combinación de FOS y el almidón resistente en animales sanos, se investigó además el impacto de esta asociación en una condición experimental caracterizada por una respuesta inmune intestinal alterada, asociada con una modificación en la microbiota<sup>169</sup> y en la producción de AGCC en el colon<sup>170</sup>, como es en el modelo de colitis inducida con TNBS en ratas,

El grupo de investigación de Farmacología de Productos Naturales del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada presenta una amplia experiencia en la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de la EII, que puedan constituirse en un alternativa al arsenal terapéutico disponible actualmente, dado que no existe un tratamiento con un perfil totalmente adecuado de eficacia, seguridad y coste. En este sentido, se han estudiado diferentes estrategias terapéuticas como la administración de flavonoides,<sup>171</sup> ácidos grasos mono y poliinsaturados<sup>172</sup>, probióticos<sup>173,174</sup> y prebióticos<sup>175</sup>, incluyendo entre estos últimos a la fibra dietética.<sup>176,177</sup>

En la actualidad, la etiología de la EII es aún desconocida. No obstante, son numerosas las evidencias

científicas que ponen de manifiesto que la microbiota intestinal juega un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de estas enfermedades intestinales, como por ejemplo es el hecho de que se hayan detectado niveles elevados de anticuerpos frente a bacterias intestinales en pacientes de EII.<sup>178</sup> De acuerdo con esto, en los últimos años, la manipulación de la flora intestinal con probióticos y prebióticos ha suscitado un gran interés para la prevención y tratamiento de esta patología.

Así, durante los últimos años son numerosos los estudios clínicos desarrollados y que han demostrado los efectos beneficiosos que distintos probióticos pueden ejercer sobre la inflamación intestinal. El primer estudio que valoró la eficacia de los probióticos en la EII se realizó en pacientes con CU, en donde se evaluó la actividad de *Escherichia coli* Nissle 1917 en comparación con bajas dosis de mesalamina. Los resultados obtenidos revelaron que la relación remisión/recaídas (en porcentaje) en el caso del probiótico fue del 16/67 frente al 11/73 de la mesalamina.<sup>179</sup> En el 2004<sup>180</sup> se ampliaron estos estudios, valorando la efectividad de una preparación oral de *E. coli* Nissle frente a mesalamina en un estudio aleatorio a doble ciego con 327 pacientes durante 12 meses, obteniendo igualmente la ausencia de diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento, siendo el porcentaje de las recaídas del 36,4% en el grupo de pacientes tratados con probiótico, y del 33,9% en el grupo tratado con mesalamina. Más recientemente, la administración de VSL#3, una preparación de probióticos que

contiene bifidobacterias, lactobacilos y una cepa de *Streptococcus thermophilus*, ha demostrado ejercer un efecto beneficioso en el mantenimiento de remisión de la enfermedad en pacientes con CU<sup>181</sup>. Igualmente, la eficacia de los probióticos se ha puesto también de manifiesto en distintos modelos experimentales de inflamación intestinal. Por ejemplo, la administración de *Lactobacillus salivarius* previene la inflamación colónica en el modelo de colitis inducida por TNBS en rata<sup>182</sup>.

Análogamente, la modulación de la microbiota intestinal tras la administración de prebióticos se ha sugerido que puede constituir una posibilidad terapéutica en el tratamiento o prevención de la inflamación intestinal. En este sentido, se han publicado diferentes estudios que evalúan el efecto que la fibra dietética puede ejercer en el proceso inflamatorio intestinal<sup>183,184</sup>. Igualmente, los estudios realizados en modelos de colitis experimental también corroboran la posibilidad de utilizar esta estrategia terapéutica en el tratamiento de estas enfermedades. Por ejemplo, se ha demostrado que la inulina puede mejorar la colitis distal por el DSS en rata, y la lactulosa también disminuye la colitis inducida por TNBS en ratas<sup>185,186</sup>.

Por tanto, en esta Tesis doctoral decidimos seguir esta última línea de actuación, dado que la fibra ha demostrado tener un papel beneficioso en pacientes de EII.

Como antecedente del tema, los diferentes estudios que existen sobre fibra dietética en la EII demuestran que estos componentes llegan casi intactos a las porciones distales del intestino, donde la lesión suele ser mucho más evidente. La fermentación de la fibra por la microbiota intestinal del colon distal produce AGCC y conduce al desarrollo de una microbiota intestinal beneficiosa, contribuyendo a la resolución de las lesiones colónicas. Sin embargo, no existen evidencias científicas de que la fermentación en el colon distal sea un prerrequisito para el efecto beneficios de la fibra dietética en la inflamación intestinal.

En realidad se ha sugerido que la fermentación de los FOS en las regiones más proximales del intestino grueso, puede llegar a tener efectos beneficiosos en todo el colon, incluyendo las lesiones colónicas distales<sup>187</sup>. Uno de los planteamientos del presente estudio fue evaluar la existencia o no de diferencias en el perfil antiinflamatorio *in vivo* de distintos tipos de fibra con características de fermentabilidad diferentes. A diferencia de los fructooligosacáridos de cadena corta, que son rápidamente degradados por microbiota intestinal en el ciego y segmentos iniciales del colon, existen otros tipos de fibra que son fermentados de una forma más paulatina a lo largo del colon, como es el caso del almidón resistente. Además, quisimos comprobar si la combinación de ambos tipos de fibra con diferentes tasas de fermentabilidad, mediante su

suplementación en las dietas de las ratas, podría resultar en un sinergismo en el modelo de colitis experimental empleado.

La administración de ambos tipos de fibras dietéticas, FOS y almidón resistente, ejerció una sinergia en sus efectos preventivos en el modelo de colitis inducida con TNBS en ratas. De hecho, todos los tratamientos fueron capaces de mitigar los daños en el colon, una semana después de la administración del agente causal. Esto se evidenció macroscópicamente por una reducción significativa de la zona inflamada que se reflejó en una menor puntuación en el índice de daño macroscópico, así como microscópicamente al evaluar el daño histológico.

El efecto beneficioso se confirmó tras la evaluación de los parámetros bioquímicos estudiados, como es el caso de la actividad MPO colónica. Esta enzima fue aislada inicialmente por Agner en 1941<sup>188</sup>, siendo la proteína más abundante en los neutrófilos y la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso. Es un enzima ampliamente distribuido en el organismo, siendo sus fuentes fundamentales los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos<sup>189</sup>. En los neutrófilos se encuentra localizado a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos, constituyendo el 2-5 % de las proteínas totales de los mismos<sup>190</sup>. En consecuencia, su actividad es proporcional al número de neutrófilos presentes en el tejido y, por tanto, puede utilizarse como índice de migración leucocitaria e infiltración de neutrófilos, e

indirectamente como parámetro de inflamación<sup>191</sup>. De hecho, esta actividad enzimática constituye un marcador comúnmente utilizado para caracterizar y hacer un seguimiento del proceso inflamatorio intestinal en modelos experimentales<sup>192, 193</sup>. En consecuencia, una disminución en la actividad de esta enzima en el tejido colónico inflamado se puede interpretar como la manifestación de la actividad antiinflamatoria intestinal de un determinado tratamiento. En este sentido, en los grupos de animales sometidos a inflamación experimental con TNBS y tratados con FOS o con la mezcla de ambas fibras dietéticas se observó una disminución de la actividad de la MPO colónica, confirmando el efecto antiinflamatorio intestinal evidenciado macroscópicamente. Además, la disminución en esta actividad enzimática igualmente corrobora los resultados obtenidos de los estudios histológicos que revelaron que los grupos de animales que recibieron tratamiento con las diferentes fibras dietéticas, fundamentalmente en el caso de la asociación, presentaban una reducción patente en la infiltración leucocitaria de tipo de los neutrófilos.

El tratamiento con ambos tipos de fibra se tradujo en una disminución en el tejido colónico inflamado en las concentraciones de las citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mediadores a los que se les ha atribuido un papel clave en la etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal, tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa.

En este sentido, las concentraciones de IL-1 $\beta$  se encuentran claramente incrementadas en el intestino de enfermos con EC o con CU<sup>194</sup>, al igual que ocurre en modelos experimentales de inflamación intestinal, tal y como se ha podido comprobar en el presente estudio, de manera que las muestras colónicas procedente de ratas del grupo control colítico presentaron valores significativamente superiores a los obtenidos en el grupo de animales sanos. Este incremento de la citocina de carácter proinflamatorio se ha descrito se asocia con la disminución de su antagonista fisiológico, IL-1ra<sup>195</sup>. Algunos autores han propuesto a la IL-1 $\beta$  como un marcador del proceso inflamatorio intestinal<sup>196</sup>, debido a que induce la producción de otros mediadores que amplifican la respuesta inflamatoria<sup>197</sup>. Se trata de una citocina producida principalmente por las células mononucleares activadas<sup>198</sup>, y su principal función, al igual que el TNF $\alpha$ , es ser mediadora de la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad innata, actuando sobre las células endoteliales y aumentando la expresión de moléculas de superficie que propician la adhesión leucocitaria y su posterior migración a la mucosa intestinal inflamada. En este sentido, el ensayo ha permitido comprobar que únicamente las ratas colíticas que recibieron la combinación de ambas fibras, mostraron una disminución significativa en la producción de IL-1 $\beta$  con el consiguiente beneficio que ello conlleva.

Similares resultados se obtuvieron cuando se evaluó la producción de TNF $\alpha$  en el tejido colónico procedente de los

distintos grupos de animales. Se trata de una citocina de carácter proinflamatorio sintetizada y liberada por distintos tipos celulares presentes en la mucosa intestinal inflamada, principalmente macrófagos, aunque también linfocitos T, linfocitos NK y mastocitos<sup>199</sup>. Son numerosos los estudios que establecen el importante papel que desempeña en la inflamación intestinal<sup>200</sup>, ya que estimula e induce la producción de otros mediadores inflamatorios como ROS, IL-6, IL-1 y NO, al mismo tiempo que, al comportarse como un potente agente quimiotáctico, promueve el reclutamiento y la activación de leucocitos, ampliando así la respuesta inflamatoria<sup>201, 202</sup>. Sus niveles se encuentran muy elevados en el suero, en la orina y en la mucosa intestinal de los pacientes con EC activa. En los pacientes con CU también se encuentra muy elevado en la mucosa colónica, que las células mononucleares de la lámina propia producen mucho TNF- $\alpha$  y que los niveles de esta citocina en heces y en orina están muy elevados en estos enfermos<sup>203,204</sup>. El papel crucial atribuido a esta citocina ha quedado claramente demostrado por la eficacia del tratamiento con anticuerpos frente a TNF $\alpha$ , como el Infliximab y el adalimumab, en la EII en humanos<sup>205,206</sup>. El hecho de que el infliximab haya demostrado igualmente su efecto beneficioso en el modelo de colitis experimental por TNBS<sup>207</sup>, sustenta la utilización de este modelo en la evaluación de terapias potencialmente aplicables en la inflamación intestinal en humanos. Dado el importante papel que esta citocina desempeña como potente quimiotáctico en el proceso inflamatorio intestinal, la menor producción de TNF $\alpha$

observada en los animales sometidos a tratamiento con la mezcla de ambas fibras dietéticas podría justificar la menor infiltración leucocitaria en el tejido colónico inflamado que se evidenciaron tras los estudios histológicos y que fueron corroborados bioquímicamente por la menor actividad MPO colónica.

Además, los efectos inhibidores que ejercen la administración de fibras objeto de nuestro estudio sobre la infiltración leucocitaria pueden ser también debidos a la disminución en la producción en el tejido colónico inflamado de otros mediadores con propiedades quimiotácticas, como CINC-1, ICAM-1 y MCP-1 tal y como lo demuestra el análisis de su expresión en el tejido colónico procedente de los distintos grupos de animales utilizados en el presente estudio.

En este sentido, y tal y como se ha venido describiendo, uno de los componentes esenciales de la reacción inflamatoria, sea cual sea el contexto en el se produzca, es el reclutamiento de leucocitos hacia el foco inflamatorio. No obstante, para que tenga lugar la extravasación de leucocitos hacia el área inflamada se deben de establecer una serie de interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales. Estas interacciones leucocito-endotelio constan de varias fases que están estrechamente reguladas por una serie de moléculas situadas en la superficie de los leucocitos y de las células endoteliales, denominadas MAC (Moléculas de Adhesión

Celular). La importancia funcional de las MAC en el campo de la EII ha sido puesta de manifiesto tanto en modelos de colitis en animales de experimentación como en pacientes con EII<sup>208,209</sup>. Sin embargo, y a pesar del importante papel que se le atribuye, son escasos, y muy recientes, los estudios terapéuticos realizados en enfermos en los que se han aprovechado los conocimientos básicos adquiridos en este campo.

Entre las diferentes familias de MAC que participan en las interacciones leucocito-célula endotelial destacan las inmunoglobulinas, a las que pertenecen las moléculas de adhesión ICAM-1, que fueron analizadas en el presente estudio. Esta molécula se encarga del reconocimiento de los linfocitos CD11a/CD18 y CD11b/CD18, y se expresa de forma constitutiva en células endoteliales, células epiteliales, leucocitos y fibroblastos<sup>210,211</sup>. La activación del endotelio por medio de citocinas, lipopolisacáridos u otros estímulos proinflamatorios, como los que se generan tras la administración intracolónica del TNBS, induce a un incremento en la expresión de ICAM-1 en comparación con el grupo sano. El tratamiento con los distintos tipos de fibras, tanto de forma aislada como en combinación, originó una disminución evidente en la expresión de esta molécula de adhesión en comparación con el grupo control sin tratamiento, siendo más marcada en el grupo que recibió la mezcla de FOS y almidón resistente.

Con respecto al CINC-1, su expresión y producción se encuentra incrementada en el foco inflamatorio, donde ejerce un

efecto quimiotáctico sobre los neutrófilos, contribuyendo de forma notoria a que se produzca su infiltración en la zona dañada<sup>212</sup>. La menor expresión de esta quimiocina en los animales colíticos sometidos a tratamiento con los distintas fibras, tanto de forma aislada como en asociación, probablemente también contribuya en su efecto beneficioso en el proceso inflamatorio colónico al traducirse en una menor infiltración leucocitaria, especialmente de neutrófilos.

Por otro lado, la proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1 induce la migración de los monocitos/macrófagos así como, también de basófilos y mastocitos a las zonas con inflamación<sup>213</sup>. Las células T sensibles a la MCP-1, como son los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, migran en respuesta a este tipo de quimiocinas. Al ser las MCP-1 mediadores inflamatorios que estimulan la migración específica de las células T, así como los monocitos, estas proteínas pueden jugar igualmente un papel importante en el reclutamiento de células inmunes en sitios con desafío antigénico. La administración de las fibras a los animales sometidos a inflamación intestinal con TNBS se tradujo en una disminución de su expresión en el tejido colónico en comparación a los animales colíticos no tratados, lo que se traduciría en una disminución de la infiltración de estos tipos celulares que participan de forma activa en la instauración y perpetuación del proceso inflamatorio, contribuyendo de esta manera en su efecto beneficioso.

La posible menor actividad de los macrófagos que podría derivarse tras la administración de las fibras dietéticas en la zona de inflamación colónica también se evidenció por una reducción significativa en la expresión de la iNOS,<sup>214</sup> lo que evitaría así los efectos perjudiciales que la sobreproducción de NO puede tener en la función intestinal en situaciones de inflamación intestinal.<sup>215,216</sup> De hecho, el óxido nítrico (NO) ha sido considerado también como un mediador de carácter proinflamatorio importante, y que juega un papel clave en la patogénesis del proceso inflamatorio intestinal, probablemente debido al incremento de la expresión de la enzima iNOS<sup>217</sup>. El NO es un mediador muy importante en la regulación de la homeostasis de muchos sistemas fisiológicos, entre los que podemos incluir el sistema cardiovascular y el tracto gastrointestinal. Se trata de NO “bueno”, el cual es producido en cantidades picomolares por la NOSc, de forma que un déficit se asocia con una disfunción tisular allí dónde se produce<sup>218</sup>. Sin embargo, en determinadas situaciones patológicas puede tener lugar una producción excesiva de este mediador (en cantidades de nanomoles) como consecuencia de la inducción de la iNOS por parte de distintos estímulos, como son las endotoxinas bacterianas y citocinas de carácter proinflamatorio (IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), en numerosos tipos celulares, incluidos macrófagos, neutrófilos, hepatocitos, células endoteliales lisas, y que presentan un efecto deletéreo en la funcionalidad tisular, recibiendo el calificativo de NO “malo”. Esto último se ha postulado que ocurre en el caso de la EII, en donde se ha

demostrado que existe un incremento en la producción de NO por parte de la mucosa intestinal de pacientes con EC o con CU<sup>219</sup>, derivado de un incremento de la expresión de la iNOS<sup>220</sup> en las zonas donde tiene lugar el proceso inflamatorio intestinal. A pesar de esto, el papel del NO en la patogénesis de la EII no está completamente dilucidado. Se han propuesto distintos mecanismos por los que la sobreproducción de NO puede tener un papel clave en el proceso inflamatorio: bien por una actuación directa de este mediador sobre determinadas células diana, bien por una actuación indirecta. Entre los primeros, se ha comprobado que el NO puede facilitar el proceso inflamatorio gracias a sus propiedades quimiotácticas frente a leucocitos polimorfonucleares y monocitos<sup>221, 222</sup> y ejercer un efecto tóxico sobre las células, por su capacidad de liberar hierro intracelular, de inhibir la función mitocondrial o de inhibir la síntesis de ADN<sup>223</sup>. Los mecanismos indirectos del daño tisular mediado por la sobreproducción de NO surgen probablemente como consecuencia de su combinación con aniones superóxido, cuya producción está igualmente incrementada en la EII, generándose especies químicas muy reactivas, como el peroxinitrito entre otros.<sup>224, 225</sup> Como se ha comentado, la excesiva producción de NO en el proceso inflamatorio intestinal se puede atribuir a la inducción de la enzima iNOS colónica<sup>226</sup>, tal y como se ha comprobado en el presente estudio. Entre los numerosos tipos celulares que ven incrementada la expresión de esta enzima destacan los macrófagos, en respuesta a muchos agentes inflamatorios, como LPS o TNF $\alpha$ <sup>227</sup>. En

consecuencia, el descenso observado en la expresión colónica de iNOS en los grupos tratados con las fibras, podría contribuir a su efecto preventivo en este modelo de colitis experimental.

Por otra parte, todos los tratamientos prebióticos provocaron una disminución de la expresión en el colon de las ratas colíticas de la IL-17, siendo esto indicativo de una disminución de la regulación de la vía linfocitaria Th17, que se ha demostrado recientemente también participa de forma relevante en los procesos inflamatorios, incluidos los localizados en el tracto gastrointestinal, como es la EII<sup>228</sup>. La IL-17 es una citocina de carácter proinflamatorio, y es probable que su incremento en las zonas de mayor inflamación esté asociado con una alteración en la respuesta inmune de la mucosa intestinal. Numerosas funciones de regulación inmune se han atribuido a esta citocina IL-17, destacando la participación en la inducción y mediación de respuestas proinflamatorias. La IL-17 induce la producción de muchas otras citocinas (como la IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , el TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (como la IL-8, GRO- $\alpha$ , y MCP-1), y las prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) de muchos tipos de células (fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, macrófagos...)<sup>229</sup>. La función IL-17 también es esencial para un subconjunto de células CD4+ y células T colaboradoras 17 (Th17)<sup>230</sup>. Como resultado de estas funciones, la familia de la IL-17 se ha relacionado con muchas enfermedades inmunes/autoinmunes como la artritis reumatoide,

asma, lupus, rechazo de aloinjertos, la inmunidad antitumoral;<sup>231</sup> así como en la enfermedad inflamatoria intestinal.<sup>232,233,234</sup>

El efecto beneficioso ejercido por las fibras administradas también se puso de manifiesto al evaluar la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Así, la expresión de esta citocina se encontró disminuida en el grupo de ratas control colítico sin tratamiento, pero se restableció en aquellos grupos de animales colíticos que recibieron el tratamiento con prebióticos. Inicialmente, la IL-10 fue caracterizada como un factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF)<sup>235</sup>, al actuar inhibiendo la producción de citocinas por los linfocitos T, particularmente el IFN- $\gamma$  por las células Th1<sup>236</sup>. En estos estudios se comprobó, sin embargo, que esta inhibición sólo se observaba cuando los macrófagos actuaban como células presentadoras de antígenos (CPA)<sup>80</sup>. Trabajos posteriores han puesto de manifiesto que la IL-10 es, de hecho, una citocina con propiedades pleiotrópicas que actúa sobre diferentes tipos celulares, incluyendo los timocitos<sup>237</sup>, las células T citotóxicas<sup>238</sup>, los mastocitos<sup>239</sup>, las células B<sup>240</sup> y los monocitos-macrófagos<sup>241</sup>. Por ello, se considera como una de las citocinas antiinflamatorias por excelencia<sup>242, 243</sup>, cuya ausencia podría desempeñar un papel fundamental en la inflamación incontrolada observada en la EII.<sup>244</sup> La IL-10 producida por linfocitos T, B y por los monocitos activados por lipopolisacárido, inhibe la producción de algunas citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 o TNF- $\alpha$ . De esta forma, desempeña un importante papel en el control y limitación del proceso inflamatorio intestinal; así, ratones deficientes genéticamente en IL-10 (IL-10 KO) desarrollan

de forma espontánea una enterocolitis crónica, que puede prevenirse con la administración exógena de IL-10<sup>245</sup>. De igual forma, en humanos se ha demostrado el efecto beneficioso de la administración de enemas que contienen IL-10 en pacientes con CU<sup>246</sup>. Por tanto, el incremento en la expresión de esta citocina tras el tratamiento preventivo con las fibras puede colaborar en el efecto antiinflamatorio observado en este modelo. Es importante destacar que la asociación de FOS y almidón resistente se tradujo en una mayor incremento en la expresión colónica de IL-10, ratificando el efecto sinérgico que ambos prebióticos pueden ejercer cuando se administran conjuntamente.

De forma análoga, la inflamación colónica inducida con el TNBS en las ratas se asoció con una menor expresión de TFF-3, probablemente derivado de la alteración de la respuesta de reparación epitelial que tiene lugar después de la administración del hapteno. Esto es similar a lo que con anterioridad se ha descrito que puede ocurrir en ratones sometidos a quimioterapia o radioterapia en el intestino<sup>247</sup> o a la colitis inducida en ratones TLR2<sup>-/-</sup> con el modelo del sulfato sódico de dextrano.<sup>248</sup> Igualmente, en humanos también se ha comprobado que existe una sobreexpresión de los péptidos trébol a nivel gastrointestinal en la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>249,250</sup>, en úlceras<sup>251</sup>, en la metaplasia gástrica<sup>252</sup> y en algunos tumores<sup>253</sup>. Más recientemente, se han podido cuantificar estos péptidos en el suero de pacientes afectos de EII, encontrándose incrementados TFF-1 y TFF-3<sup>254</sup>. Sin embargo, han sido los

estudios en animales de experimentación los que han permitido comprobar su importancia en la reparación tisular gastrointestinal, de forma que animales que carecen del gen que codifica TFF-3 se caracteriza por una capacidad reparativa deteriorada de la mucosa<sup>255</sup>, lo que les hace más vulnerables a agentes lesivos como el DSS. La administración en enema de la proteína recombinante TFF-3 a estos animales deficientes en el péptido aceleró la curación de la colitis. Además, en un modelo de colitis en rata por ácido sulfónico dinitrobenceno (DNBS), se ha comprobado que la administración tópica de TFF-2 mejora la reparación mucosa<sup>256</sup>. El efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por estos prebióticos se asoció con un incremento en la expresión de TFF-3, lo que facilitaría la recuperación del epitelio y la función intestinal.

Es indudable que en los efectos beneficiosos que se observaron en este modelo de colitis experimental tras la administración de los dos tipos de fibra dietética, tanto de forma aislada como en asociación, contribuye la capacidad que tienen para estimular el crecimiento de bacterias protectoras, es decir, el efecto prebiótico que les caracteriza, y que se puso de manifiesto en los animales sanos.

En el presente estudio se confirma que el proceso inflamatorio intestinal inducido experimentalmente con TNBS se asocia con una alteración evidente de la microbiota intestinal. Así, la administración intracolónica del hapteno a las ratas produjo una reducción significativa en los contenidos colónicos

tanto de los lactobacilos como de las bifidobacterias en comparación con las ratas sanas. Estas modificaciones se vieron ratificadas por un aumento de la flora aeróbica total así como de las enterobacterias, disminuyendo de esta forma la relación entre las bacterias beneficiosas y los potenciales patógenos. Además, el proceso inflamatorio intestinal se caracterizó por una disminución en la producción colónica de los AGCC analizados, acetato, propionato y butirato, que se han descrito desempeñan un papel clave en la homeostasis<sup>257</sup> de colon<sup>258</sup>. En concreto el butirato es considerado como el principal nutriente de los colonocitos, habiéndose sugerido que una disminución de la oxidación del butirato en el lumen colónico ocasionaría un déficit energético epitelial, y puede de esta forma estar implicado en la patogénesis de la CU<sup>259,260,261</sup>. De hecho, en los pacientes con CU se ha observado disminución de los niveles fecales de AGCC, que guarda relación con la gravedad de la enfermedad<sup>262, 263</sup>. La disminución de la  $\beta$ -oxidación del butirato se ha podido demostrar recientemente en la CU humana, incluso cuando la enfermedad está inactiva<sup>264,265</sup>. Asimismo, estudios experimentales recientes han sugerido que el butirato inhibe la producción de algunas citocinas y la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, siendo éstas las primeras evidencias de un efecto antiinflamatorio real del butirato<sup>266, 267</sup>. Los AGCC tienen además otros múltiples efectos beneficiosos incluidos la estimulación de la secreción mucosa, el aumento del flujo vascular, la motilidad y la absorción de sodio. Se ha descrito igualmente que los AGCC tienen un efecto

citoprotector y antiinflamatorio, reductor de la permeabilidad paracelular e inductor de la respuesta inmune<sup>268</sup>.

Todos estos datos sugieren que el proceso fermentativo en el lumen intestinal en los animales sometidos a inflamación colónica se encuentra comprometido. Sin embargo, en aquellos grupos de animales que recibieron las fibras se observó una restauración de esta capacidad fermentativa, observando una normalización tanto de la microbiota intestinal como de la producción de AGCC, ratificando de esta forma el importante papel que desempeña el efecto prebiótico en la mejora del proceso inflamatorio intestinal inducido experimentalmente. Este efecto fue más patente tras la administración conjunta de ambas fibras, FOS y almidón resistente, confirmándose de esta forma el efecto sinérgico que se puede obtener al combinar diferentes tipos de fibras con diferente grado de fermentabilidad.

Los efectos preventivos de los diferentes prebióticos, incluyendo oligosacáridos<sup>269,270,271</sup> y el almidón resistente,<sup>272</sup> se han descrito previamente en modelos experimentales de colitis en roedores. Sin embargo, no hay muchos estudios en los que se establezca la eficacia del tratamiento con prebióticos en la EII en humanos. Los mejores resultados se han obtenido tras la administración de la mezcla de los prebióticos inulina y oligofruktosa, en pacientes con CU<sup>273</sup> o de esta mezcla junto con *Bifidobacterium longum* en pacientes con EC<sup>274</sup>. En consecuencia, la combinación de diferentes prebióticos para

estas afecciones intestinales parece ser un enfoque interesante, que se confirma en el presente estudio.

En conclusión, los alimentos funcionales basados en la combinación de dos fibras dietéticas distintas, con diferente tasa de fermentación a lo largo del intestino grueso, puede resultar en un efecto sinérgico y, por tanto, en un efecto prebiótico más evidente que puede conferir un mayor beneficio para la salud del paciente que las ingiera.



## **CONCLUSIONES**

- 1. La administración durante dos semanas a animales de experimentación, y en condiciones normales, de dos tipos de fibras con diferente velocidad de fermentación en el intestino grueso, fructooligosacáridos y almidón resistente, se traduce en un efecto prebiótico. Esto se pone de manifiesto por una modificación en la composición de la microbiota intestinal, promoviendo el desarrollo de bacterias potencialmente beneficiosas (lactobacilos y bifidobacterias). La administración conjunta de ambos tipos de fibras genera un efecto aditivo en las propiedades prebióticas obtenidas con cada una de las fibras por separado.**
- 2. Cuando se administran de forma preventiva, el efecto prebiótico de cada una de las fibras estudiadas se traduce en un efecto antiinflamatorio intestinal en el modelo de colitis inducida por TNBS en rata.**
- 3. La administración de la mezcla de ambos tipos de fibras en este modelo de colitis inducida con TNBS en ratas genera una sinergia en sus efectos antiinflamatorios intestinales, tal y como se pone de manifiesto tras la evaluación de los distintos marcadores inflamatorios estudiados. Se comprueba**

que la acción prebiótica sinérgica ejercida por la combinación puede desempeñar un papel clave, y ésta se evidencia por la restauración en el lumen intestinal de la relación de bacterias beneficiosas y potencialmente patógenas, así como por la mayor producción de ácidos grasos de cadena corta.

4. La combinación en el contexto de una alimentación sana, basada en la ingesta de fibras dietéticas distintas, con diferentes tasas de fermentación a lo largo del intestino grueso, puede derivar a un efecto sinérgico que les confiera un mayor potencial beneficioso para la salud del paciente que las ingiera.



## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mowm B, Ekbom A, Vatn MH y cols. Inflammatory bowel disease: reevaluation of the diagnosis in a prospective population based study in south eastern Norway. *Gut* 1997; 40: 328-332.
- 2 . Van Wijlick EHJ, Lennard-Jones J, Schivananda S, Stockbrugger RW, Russel MGVM for the EC-IBD group. IBD: Diagnostic Changes and clinical features over a four-year period. Results of the European Prospective Study on Inflammatory Bowel Disease. New Orleans LA: *Digestive Disease Week*; 1998; 16-22.
- 3 . Fiocchi C. Inflammatory Bowel disease: Etiology and Pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.
4. Oyura Y, Bonen DK, Inohara N y cols. A frameshift mutation in NOD2 associated with to susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606.
5. 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: 501-507.
6. Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflammatori Bowel Dis* 2006; 6: 107-115

7. Sartor , R. B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 1997; 92: 5S-11S.
- 8 . Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 29-43.
9. Martini GA, Brandes JW. Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klin Wochenschr* 1976; 54: 367-371.
10. Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754-760.
11. Thornton JR, Emmett PM, Heaton KW. Diet and Crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet. *Br Med J* 1979; 2: 762-764..
12. Martini GA, Stenner A, Brandes WJ. Diet and ulcerative colitis. *Br Med J* 1980; 280: 1321.
13. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2016-25.

14. Thornton JR, Emmett PM, Heaton KW. Diet and Crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet. *Br Med J* 1979; 2: 762-764.
15. Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754-760.
16. Martini GA, Stenner A, Brandes WJ. Diet and ulcerative colitis. *Br Med J* 1980; 280:1321.
- 17 Amre DK, D'Souza S, Morgan K, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2016-2025.
- 18 Thornton JR, Emmett PM, Heaton KW. Diet and Crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet. *Br Med J* 1979; 2: 762-764.
19. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2016-2025.
20. Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992; 3: 47-52.

21. Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754-760.
22. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 154-163.
23. Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992; 3: 47-52.
24. Thornton JR, Emmett PM, Heaton KW. Diet and Crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet. *Br Med J* 1979; 2: 762-4. Driscoll RH Jr, Rosenberg IH. Total parenteral nutrition in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1978; 62: 185-201.
25. Seidman EG. Nutritional management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1989; 18: 129-155.
26. Driscoll RH Jr, Rosenberg IH. Total parenteral nutrition in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1978; 62: 185-201.
27. Seidman EG. Nutritional management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1989; 18: 129-155.

28. Driscoll RH Jr, Rosenberg IH. Total parenteral nutrition in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1978; 62: 185-201.
29. Driscoll RH Jr, Rosenberg IH. Total parenteral nutrition in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1978; 62: 185-201.
30. Seidman EG. Nutritional management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1989; 18: 129-155.
31. McKay DM. Intestinal inflammation and the gut microflora. *Can J gastroenterol* 1999; 13(6): 509-516.
- 32 . Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors. *HepatoGastroenterology* 2000; 47: 29-43.
33. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 673-751.
34. Wollenweber E. Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties. Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A . *A.R. Liss*, New York. 1988: 45-55.
35. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for

inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 673-51.

36. Middleton E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998; 439:175-182.

37. Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1990; 36: 317-322.

38. Valenzuela A, Aspigalla M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med* 1989; 55: 420-422.

39. Galvez J, de la Cruz JP, Zarzuelo A, Sanchez de Medina F, Sanchez de la Cuesta F. Oral administration of quercitrin modifies intestinal oxidative status in rats. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 1237-1243.

40. Loguercio C, D'Argenio G, Dell 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: 1204-1121.

41. 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: 1949-1959.

42. Yamada T, Grisham MB. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Targan SR, Shanahan F (Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland 1994: 133-150.
43. Lefer AM, Lefer DJ. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: 572-575.
44. Lefer AM, Lefer DJ. Nitric oxide II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: 572-575.
45. Miller MJS, Sandoval M. Nitric oxide III. A molecular to intestinal prelude inflammatory. *Am J Physiol* 1999; 276: 795-799.
46. 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 Rad Biol Med* 1991; 11: 1-8
47. Camuesco D, Comalada M, Rodriguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2004; 143(7): 908-918.
48. Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer EM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 591-593.

49. Bertran X, Mañe J, Fernandez-Bañares E, Castella R, Bartoli I, Ojanguren M et al. Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 1996; 38: 899-904.
50. Fretland DJ, Widomski D, Tsai D-S, Zemaitis JM, Levin S, Djuric SW, Shone RL et al. Effect of the leukotriene B4 receptor antagonist SC-41930 on colonic inflammation in rat, guinea pig and rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 572-576.
51. Fretland DJ, Widomski D, Tsai D-S, Zemaitis JM, Levin S, Djuric SW, Shone RL et al. Effect of the leukotriene B4 receptor antagonist SC-41930 on colonic inflammation in rat, guinea pig and rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 572-576.
52. Yamada T, Grisham MB. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Targan SR, Shanahan F (Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland 1994: 133-150.
53. Veljaca M, Lesch CA, Pillana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulphonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 417-422.
54. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals: downregulation of COX-2

and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat Res* 2001; 480-481: 243-268.

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

56. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through the downregulation of NF- $\kappa$ B pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35: 584-592.

57. Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, et al. Effects of idoxifene and estradiol on NF- $\kappa$ B activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver*, 2001; 21: 183-91.

58. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996; 98: 136-141.

59. Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrier J, Steinhart AH, Wolman SL, Baron D, Allard JP. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 259-64.

60. Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD, et al. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1820-1827
61. Miralles-Barrachina O, Savoye G, Belmonte-Zalar I y cols. Low levels of glutathione in endoscopic biopsies of patients with Crohn's colitis: the role of malnutrition. *Clin Nutr* 1999; 18: 313-317.
62. Aghdassi E, Wendland BE, Steinhart AH y cols. Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress. A randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:348-353.
63. Seidner DL, Lashner BA, Brzezinski A y cols. An oral supplement enriched with fish oil, soluble fiber, and antioxidants for corticosteroid sparing in ulcerative colitis: a randomized, controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 358-369.
64. Heaton KW, Thornton JR, Emmett PM. Treatment of Crohn's disease with an unrefined-carbohydrate, fibre-rich diet. *Br Med J* 1979; 2: 764-6.
65. Trowell HC, Burkitt DP. The development of the concept of dietary fibre *Mol Aspects Med.* 1987;9: 7-15. Review.
66. Harris PJ, Ferguson LR. Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutat Res.* 1993 Nov;290(1):97-110. Review.

67. Williams CL, Bollella M, Spark A, Puder D. Soluble fiber enhances the hypocholesterolemic effect of the step I diet in childhood. *J Am Coll Nutr.* 1995 Jun;14: 251-257.
68. Cummings, J. H. & Branch, W. J. (1986) Fermentation and the production of short chain fatty acids in the human large intestine. *Dietary Fibre: Basic and Clinical Aspects* . *Plenum Press.*, New York, NY. 131-152.
69. Nordgaard I, Hove H, Clausen MR, Mortensen PB. Colonic production of butyrate in patients with previous colonic cancer during long-term treatment with dietary fibre (*Plantago ovata* seeds). *Scand J Gastroenterol.* 1996;31:1011-1020.
70. El Oufir L, Barry JL, Flouri B, Cherbut C, Cloarec D, Boret F & Galmiche JP (2000) Relationships between transit time in man and in vitro fermentation of dietary fiber by fecal bacteria. *European Journal of Clinical Nutrition* 54, 603-609.
71. Blundell J. E., Burley V. J. Satiating, satiety and the action of fibre on food intake. *Int. J. Obes.* 1987;11:9-25.
72. Duncan K. H., Bacon J. A., Weinsier R. L. The effects of high and low energy density diets on satiety, energy intake, and eating time of obese and nonobese subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 1983; 37: 763-767.
73. Glore S. R., Van Treeck D., Knehans A. W., Guild M. Soluble fiber and serum lipids: a literature review. *J. Am. Diet Assoc.* 1994; 94: 425-436.

74. Goodlad, R. A., Lenton, W., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. & Wright, N. A. (1987). Effects of an elemental diet, inert bulk and different types of dietary fibre on the response of the intestinal epithelium to refeeding in the rat and relationship to plasma gastrin, enteroglucagon and ppy Levels. *Gut* 28, 171-180.
75. Andoh, A.; Tsujikawa, T.; Fujiyama, Y. Role of Dietary Fiber and Short-Chain Fatty Acids in the Colon. *Current Pharmaceutical Design*, Volume 9, Number 4, February 2003; 12: 347-358.
76. Burkitt D.P. A deficiency of dietary fiber may be one cause of certain colonic and venous disorders. *Digestive diseases and Sciences* 1976; 21.
77. Schloss I, Kidd MS, Tichelaar HY, Young GO, O'Keefe SJ. Dietary factors associated with a low risk of colon cancer in coloured west coast fishermen. *J Gen Intern Med* 1997;12:15-24.
78. Holtug† K, Clausen M, Hove, H J. Christiansen and P. B. Mortensen. The Colon in Carbohydrate Malabsorption: Short-Chain Fatty Acids, pH, and Osmotic Diarrhoea. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1992, Vol. 27, No. 7, Pages 545-552
79. Brøbech P, Mortensen† and Clausen M. Short-Chain Fatty Acids in the Human Colon: Relation to Gastrointestinal Health and Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1996; 31: 132-148.

80. Holtug† K, Clausen M, Hove, H J. Christiansen and P. B. Mortensen. The Colon in Carbohydrate Malabsorption: Short-Chain Fatty Acids, pH, and Osmotic Diarrhoea. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1992; 27: 545-552.
81. Ritzhaupt A, Ellis A, B Hosie K and P Shirazi-Beechey S. The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. *The Journal of Physiology*, 1998; 507: 819-830.
82. Holtug† K, Clausen M, Hove, H J. Christiansen and P. B. Mortensen. The Colon in Carbohydrate Malabsorption: Short-Chain Fatty Acids, pH, and Osmotic Diarrhoea. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1992; 27: 545-552.
83. Roediger W. Famine, Fiber, Fatty Acids, and Failed Colonic Absorption: Does Fiber Fermentation Ameliorate Diarrhea. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1994; 18: 4-8.
84. Roediger W. Famine, Fiber, Fatty Acids, and Failed Colonic Absorption: Does Fiber Fermentation Ameliorate Diarrhea. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1994; 18: 4-8.
85. Edward Giovannucci, Eric B. Rimm, Meir J. Stampfer, Graham A. Colditz, Alberto Ascherio and Walter C. Willett. Intake of Fat, Meat, and Fiber in Relation to Risk of Colon Cancer in Men. *Cancer Research* 1994; 54: 2390-2397.

86. Rombeau JL, Kripke SA. Metabolic and intestinal effects of short-chain fatty acids. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1990; 14:181-185.
87. Burkitt D.P., Trowell, H *Some implications of dietary fiber.* Academic, London 1975
88. Novartis: RDI para Energía, Carbohidratos, Fibra, Grasas, Ácidos grasos, Colesterol, Proteínas y Aminoácidos (2002). Food and Nutritional Board [www.nap.edu](http://www.nap.edu)
89. Gorma, M.A. & Bowman, C. Position of the American Dietetic Association; health implications of dietary fiber. *J. Am. Dietetic Assoc.* 1993; 93: 1446-1447
90. Howarth NC, Saltzman E & Roberts SB (2001) Dietary fiber and weight regulation. *Nutr Rev* 59: 129–139.
91. Zarzuelo A. Fibra. *Guías alimentarias para la población española* 2001; 277-289.
92. Kromhout, D., Keys, A., Aravanis, C., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B. S. & Toshima, H. Food consumption patterns in the nineteen sixties in seven countries. *American Journal of Clinical Nutrition* 1989; 49: 889-894.
93. Vernia P, Annese V, Bresci G, et al. Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis:

---

results of a multicentre trial. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 244–248.

94. Simpson, E. J., Blottiere, H.M., Cherbut, C., Galmiche, J.P. Butyrate stimulate cyclin D and p21 and inhibits cyclindependent kinase 2 expresison in HY-29 colonic epithelial cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 1997; 232: 169-172.

95. Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA, Rhodes JM. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut.*1995; 36: 93-99.

96. Roediger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet.* 1980 ;2: 712-715.

97. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. Roediger WE, Nance S. *Br J Exp Pathol.* 1986; 67: 773-782.

98. 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: 73-76.

99. Allan ES, Winter S, Light AM, Allan A. Mucosal enzyme activity for butyrate oxidation; no defect in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 1996; 38: 886-93.

100. Clausen MR, Mortensen PB. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis.. *Gut.* 1995; 37: 684-689.

101. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottière HM, Galmiche JP Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease.. *Gut*. 2000; 47:397-403.

102. Patz J, Jacobsohn WZ, Gottschalk-Sabag S, Zeides S, Braverman DZ. Treatment of refractory distal ulcerative colitis with short chain fatty acid enemas. *Am J Gastroenterol*. 1996; 91: 731-734.

103. Breuer RI, Soergel KH, Lashner BA, Christ ML, Hanauer SB, Vanagunas A, Harig JM, Keshavarzian A, Robinson M, Sellin JH, Weinberg D, Vidican DE, Flemal KL, Rademaker AW Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial.. *Gut*. 1997; 40: 485-91.

104 Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. Scheppach W. *Dig Dis Sci*. 1996; 41: 2254-2259.

105. Revision and consensus in nutritional therapy: nutrition in inflammatory intestinal diseases] Fernández-Bañares F, Gassull Duro MA. *Nutr Hosp*. 1999; 14: 71-80.

106 Weaver GA, Tangel CT, Krause JA, Parfitt MM, Jenkins PL, Rader JM, Lewis BA, Miller TL, Wolin MJ. Acarbose enhances human colonic butyrate production. *J Nutr*. 1997; 127: 717-723.

107. Davies PS, Rhodes. Maintenance of remission in ulcerative colitis with sulphasalazine or a high-fibre diet: a clinical trial. *J.Br Med.* 1978;16:1524-1525.
108. Hallert C, Kaldma M, Petersson BG. Ispaghula husk may relieve gastrointestinal symptoms in ulcerative colitis in remission. *Scand J Gastroenterol.* 1991; 26: 747-750.
109. Mitsuyama K, Saiki T, Kanauchi O, Iwanaga T, Tomiyasu N, Nishiyama T, Tateishi H, Shirachi A, Ide M, Suzuki A, Noguchi K, Ikeda H, Toyonaga A, Sata M. Treatment of ulcerative colitis with germinated barley foodstuff feeding: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12: 1225-1230
110. Fernández-Bañares F, Gassull Duro MA. Revision and consensus in nutritional therapy: nutrition in inflammatory intestinal diseases *Nutr Hosp* 1999; 14: 2:71-80.
111. The influence of ispaghula husk and lactulose on the in vivo and the in vitro production capacity of short-chain fatty acids in humans. Rasmussen HS, Holtug K, Andersen JR, Krag E, Mortensen PB. *Scand J Gastroenterol.* 1987; 22: 406-410.
112. Araki Y, Fujiyama Y, Andoh A, Koyama S, Kanauchi O, Bamba T. Scand J The dietary combination of germinated barley foodstuff plus *Clostridium butyricum* suppresses the dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Gastroenterol.* 2000; 35: 1060-1067.

113. Kanauchi O, Iwanaga T, Mitsuyama K, Saiki T, Tsuruta O, Noguchi K, Toyonaga A Butyrate from bacterial fermentation of germinated barley foodstuff preserves intestinal barrier function in experimental colitis in the rat model.. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999;14: 880-888.
114. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Willén R, Andersson R, Molin G, Bengmark S The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat.. *Scand J Gastroenterol.* 1993; 28:155-62.
115. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 2007; 137: 830-837.
116. Cherbut C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br J Nutr* 2002; 87: 159-162.
117. Nyman M. Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. *Br J Nutr* 2002; 87:163-168.
- 118 . Sanderson IR. Dietary modulation of GALT. *J Nutr* 2007;137: 2557-62.
- 119 Stewart ML, Timm DA, Slavin JL. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. *Nutr Res* 2008; 28: 329-334.

120. Le Blay G, Michel C, Blottière HM, Cherbut C. Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J Nutr* 1999;129: 2231-2235
- 121 . Le Blay G, Michel C, Blottière HM, Cherbut C. Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *Br J Nutr* 1999; 82: 419-26.
122. Le Blay GM, Michel CD, Blottière HM, Cherbut CJ. Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *J Appl Microbiol* 2003;94
123. Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Laboisse CL, Nguyen PG, Siliart BS, Dumon HJ, Champ MM. Restoration of the integrity of rat caecocolonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Br J Nutr* 2003; 90:75–85.
124. Rodríguez-Cabezas ME, Gálvez J, Lorente MD, Concha A, Camuesco D, Azzouz S, Osuna A, Redondo L, Zarzuelo A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *J Nutr* 2002;132:3263-3271

125. Camuesco D, Peran L, Comalada M, Nieto A, Di Stasi LC, Rodriguez-Cabezas ME, Concha A, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 265-2671.
126. Morris GP, Beck PL, Herridge W, Depew W, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803.
127. Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*. 1992;102:1524-1534.
128. Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268: 622-630.
129. Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279: 1298-1306.
130. 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: 1344-1350.
131. McCafferty DM, Rioux KJ, Wallace JL. Granulocyte infiltration in experimental colitis in the rat is interleukin-1 dependent and leukotriene independent. *Eicosanoids* 1992; 5: 121-125.

132. Thim L, Woldike HF, Nielsen PF, Christensen M, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry* 1995; 34: 4757-4764.

133. Gott P, Beck S, Machado JC, Carneiro F, Schmitt H, Blin N. Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet* 1997; 4: 308-15.

134. Mane Almero, J. Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal: Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutr. Hosp.* [online]. 2007, vol.22, n.2 [citado 2010-05-25], pp. 178-189.

135. Bertran X, Mane J, Fernandez-Banares F y cols. Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 1996; 38: 899-904.

136. Triantafillidis JK, Papalois AE, Parisi A y cols. Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6843-6847

137. Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M y cols. Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. *Int J Mol Med* 2006; 17: 497-502

138. Lorén V, Mañé J, Pedrosa E y cols. La administración de *Lactobacillus fermentum* (LF) después de la inducción de la colitis por en ratones balb/c mejora la evolución de la lesión colónica. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 188 (Abstract).

139 . Cherbut C, Michel C, Lecannu G. The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J Nutr* 2003; 133: 21-27.

140. 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: 795-803.

141 . Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental Models of *Inflammatory Bowel Disease*. *Gastroenterology* 1995; 109: 1344-1367.

142. 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: 795-803.

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

144. 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: 795-803.
145. Palmen MJ, Dijkstra CD, van der Ende MB, Pena AS, van Rees EP. Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 351-356.
146. Grisham MB, Ware K, Gilleland HE Jr, Gilleland LB, Abell CL, Yamada T. Neutrophil-mediated nitrosamine formation: role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology* 1992; 103: 1260-1266.
147. Cogswell JP, Scott DW. Role of self carriers in the immune response and tolerance. XII. Effect of epitope density and antigen-presenting cell phenotype on the presentation of haptenmodified self for the induction of immunity or tolerance in vitro. *Cell Immunol* 1988; 114: 71-82.
148. Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268: 622-630.
149. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 2007;137: 830-837.
150. Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr* 2007; 137: 2493-502.

---

151. Cherbut C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br J Nutr* 2002; 87: 159-162.

152. Stewart ML, Timm DA, Slavin JL. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. *Nutr Res* 2008; 28: 329-34.

153 . Le Blay G, Michel C, Blottière HM, Cherbut C. Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *Br J Nutr* 1999; 82: 419-426.

154 . Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 415-420.

155. Hernot DC, Boileau TW, Bauer LL, Middelbos IS, Murphy MR, Swanson KS, Fahey GC Jr. In vitro fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 1354-61.

156. Cherbut C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br J Nutr* 2002; 87: 159-162.

157. Hernot DC, Boileau TW, Bauer LL, Middelbos IS, Murphy MR, Swanson KS, Fahey GC Jr. In vitro fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by

---

certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 1354-61.

158. Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 452-60.

159. Totowa, N.J. McFarland, L.V.. In G. W. Elmer, L. MaFarland, and C Surawicz Biotherapeutic agents for *Clostridium difficile*-associated disease, *Humana Press Inc.*, 1999; 159-193

160. Percival, M.. Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr* 199; 6: 1-4.

161. Le Blay GM, Michel CD, Blottière HM, Cherbut CJ. Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 312-20.

162. Ouwehand, A.C. and P.L. Conway, *Op.cit.*

163. Allen A, Hutton DA, Pearson JP. "The MUC2 gene product: a human intestinal mucin". *Int. J. Biochem. Cell Biol* 1998; 30: 797–801.

164 Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; 274: 262-5.

165 . Podolsky DK. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol* 1999; 277: 495-499.

166. Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 721-732.

167. Gajhede M, Petersen TN, Henriksen A, Petersen JF, Dauter Z, Wilson KS, Thim L. Pancreatic spasmolytic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides. *Structure* 1993; 1: 253-62.

168. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001;121: 580-591.

169. Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailón E, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Br J Nutr* 2007; 97: 96-103.

170. Rodríguez-Cabezas ME, Gálvez J, Lorente MD, Concha A, Camuesco D, Azzouz S, Osuna A, Redondo L, Zarzuelo A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *J Nutr* 2002;132: 3263-3271

171. Camuesco, D, Comalada, M., Concha, A., Nieto, A., *et al.* Intestinal antiinflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin. Nutr.* 2006; 25: 466-476

172. Camuesco, D, Comalada, Rodríguez-Cabezas, M.E., Nieto, A., *et al.* The Intestinal antiinflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br.J.Pharmacol.* 2004, 143, 908–918.

173. Guandalini S. Use of *Lactobacillus*-GG in paediatric Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 63-65.

174. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 305-309.

175. Perán, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., *et al.* Preventive effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp, in

TNBS model of rat colitis. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 5185-5192.

176. Rodríguez-Cabeza, M. E., Galvez, J., Lorente, M. D., Concha, A., *et al.* Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in TNBS induced colitic in ratas. *J. Nutr.* 2002, 132, 3263-3271.

177. Rodríguez-Cabeza, M. E., Galvez, J., Lorente, M. D., Concha, A., *et al.* Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in TNBS induced colitic in ratas. *J. Nutr.* 2002; 132: 3263-3271.

178. Mow, W.S., Vasiliauskas, E.A., Lin, Y., Fleshner, P.R., *et al.* Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 414-424.

179. Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 853-858.

180. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53: 1617-1623.

181 Bibiloni, R., Fedorak, R. N., Tannock, G. W., Madsen, K.L., et al. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 2005; 100: 1539-1546.

182. Perán, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., et al. Preventive effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp, in TNBS model of rat colitis. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 5185-5192.

183. Sabater-Molina M, Larqué E, Torrella F, Zamora S. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *J Physiol Biochem.* 2009; 65: 315-328.

184. Lara-Villoslada F, de Haro O, Camuesco D, Comalada M, Velasco J, Zarzuelo A, Xaus J, Galvez J. Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. *Eur J Nutr.* 2006; 45: 418-425.

185. Ito H, Tanabe H, Kawagishi H, Tadashi W, Yasuhiko T, Sugiyama K, Kiriya S, Morita T. Dig. Short-chain inulin-like fructans reduce endotoxin and bacterial translocations and attenuate development of TNBS-induced colitis in rats. *Dis Sci.* 2009 Oct;54(10):2100-8.

186. Osman N, Adawi D, Molin G, Ahrne S, Berggren A, Jeppsson B. BMC. *Bifidobacterium infantis* strains with and

without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *Gastroenterol.* 2006 Oct 28;6:31.

187. Lara-Villoslada F, de Haro O, Camuesco D, Comalada M, Velasco J, Zarzuelo A, Xaus J, Galvez J. Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. *Eur J Nutr.* 2006; 45: 418-425.

188 . Agner K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leukocytes. *Acta Physiol Scand* 1941; 2 :1-62.

189. Bradley PP, Priebat PA, Christensen RD, Rothstein GR. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206-209.

190. Márquez LA, Dunford HB, Wart HV. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990; 265: 5666-5570.

191. Junger WG, Cardoza TA, Liu FC, Hoyt DB, Goodwin R. Improved rapid photometric assay for qualitative measurement of PMN migration. *J Immunol Methods* 1993; 160: 73-79.

192. Peterson CG, Sangfelt P, Wagner M, Hansson T, Lettesjö H, Carlson M. Fecal concentrations of leukocyte markers reflect

---

disease activity in patients with ulcerative colitis. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67: 810-20.

193. Wagner M, Peterson CG, Ridefelt P, Sangfelt P, Carlson M. Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5584-5589.

194. Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 1989; 30: 835-838.

195. Ishizuka K, Sugimura K, Homma T *et al.*, Influence of interleukin-10 on the interleukin- 1 receptor antagonist / interleukin-1 beta ratio in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Digestion* 2001; 63: 22-27.

196. Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1989; 97: 326-337.

197 .Fiocchi C. Cytokines. En: MacDermott RP, W Stenson, eds. *Inflammatory Bowel Disease*, New York: Elseiver, 1992: 137-162.

198 . Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. Localization of intestinal

interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 1993; 104: 749-758.

199. Woywodt A, Ludwig D, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Jantschek G, Kirchner H, Stange EF. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 267-276.

200. Rutgeerts P, van Assche G, Vermeire S. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 1593–1610.

201. 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: 1281-1290.

202. Stallmach A, Giese T, Schmidt C, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Meuer SC. Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 308-315.

203 . Pallone F, Monteleone G. Regulatory cytokines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 75-9.

204 Danese S, Gasbarrini A. Chemokines in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 2005; 58: 1025-1027.

---

205 van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology*. 1995; 109:129-135.

206. Chey WY. Infliximab for patients with refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2001; 7: 30-33.

207. Triantafillidis JK, Papalois AE, Parasi A, Anagnostakis E, Burnazos S, Gikas A, Merikas EG, Douzinas E, Karagianni M, Sotiriou H. Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 6843-4847.

208 . Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998; 114: 1066-1090.

209. Ala A, Dhillon AP, Hodgson HJ. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut. *Int J Exp Pathol* 2003; 84: 1-16.

210 Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MJ. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9238-9242.

211. Cordell JL, Pulford K, Turley H, Jones M, Micklem K, Doussis IA, Tyler X, Mayne K, Gatter KC, Mason DY. Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol* 1994; 47: 143-47.
212. Al-Mokdad M, Shibata F, Nakawa H. Effects of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) on shape change, adhesiveness and phagocytosis of rat neutrophils. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1997; 20: 920-923
213. D D Taub, P Proost, W J Murphy, M Anver, D L Longo, J van Damme, and J J Oppenheim. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest.* 1995; 95: 1370–1376.
214. Dijkstra G, Zandvoort AJ, Kobold AC, de Jager-Krikken A, Heeringa P, van Goor H, van Dullemen HM, Tervaert JW, van de Loosdrecht A, Moshage H, Jansen PL. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in circulating monocytes from patients with active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 546-54.
215. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 311-22.

216. Beck PL, Li Y, Wong J, Chen CW, Keenan CM, Sharkey KA, McCafferty DM. Inducible nitric oxide synthase from bone marrow-derived cells plays a critical role in regulating colonic inflammation. *Gastroenterology* 2007; 132: 1778-1790.

217. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Dugo L, Lepore V, Fonti MT, Ciccolo A, Terranova ML, Caputi AP, Thiemermann C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Eur J Pharmacol* 2000; 406: 127-137.

218. Moroi et al. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1225-1232.

219 . Kimura el al. Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1997; 42:1047-1054

220 . Kimura el al. Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1997; 42:1047-1054

221. Belenky et al. Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. *J Lab Clin Med.* 1993a; 122:338-394.

222. Belenky et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J Leukoc Biol.* 1993b; 53: 498-503

223. Kwon et al. Inhibition of tumor cells ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med.* 1991; 174: 761-767.

224. Beckman et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury for nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 1620-1625

225. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D. A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 73-81.

226. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D. A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 73-81.

227. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D. A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 73-81.

228 . Abraham C, Cho J. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1090-1100.

229 . Vélez, Viviana M; París, Sara C; García, Luis F. Interleuquina-17: características, vías de diferenciación, señalización y funciones biológicas. *latreia*. 2007; 20:186-195,

230 . Vélez, Viviana M; París, Sara C; García, Luis F. Interleuquina-17: características, vías de diferenciación, señalización y funciones biológicas. *latreia*. jun. 2007; 20: 186-195,

231. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 71: 1–8.

232. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 2593-2603.

233. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 2007;137: 830-837.

234. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008; 28: 454-467.

235. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095

236. De Waal Malefyt R, Abrams RJ, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin (IL)-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209-1220

237. MacNeil IA, Suda T, Moore KW, Mosmann TR, Zlotnik A. IL-10 a novel growth cofactor for mature and immature t cells. *J Immunol* 1990;1 45: 4167-4173.

238 . Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic cell differentiation factor. *J Immunol* 1991; 147: 528-34.

239 Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 1991;1 73: 507-10.

240 . Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, et al. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory

factor: unresponsiveness of X chromosome linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 1990; 172: 1625-1631

241. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)10 inhibits nuclear factor  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270: 9558-9563.

242. De Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin-10. *Ann Med* 1995; 27: 537-41

243. Moore K, O'Garra A, De Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Ann Rev Immunol* 1993; 11:1 65-90.

244. Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 666-676.

245. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263.

246 Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6419.

247. Beck PL, Wong JF, Li Y, Swaminathan S, Xavier RJ, Devaney KL, Podolsky DK. Chemotherapy- and radiotherapy-

---

induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology* 2004; 126: 796-808.

248 .Podolsky DK, Gerken G, Eyking A, Cario E. Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. *Gastroenterology* 2009; 137: 209-220.

249. Rio MC, Chenard MP, Wolf C, Marcellin L, Tomasetto C, Lathe R, Bellocq JP, Chambon P. Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology* 1991; 100: 375-379.

250. Wright NA, Poulson R, Stamp G, Van Noorden S, Sarraf C, Elia G, Ahnen D, Jeffery R, Longcroft J, Pike C, et al. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104: 12-20.

251. Khulusi S, Hanby AM, Marrero JM, Patel P, Mendall MA, Badve S, Poulson R, Elia G, Wright NA, Northfield TC. Expression of trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide in gastric metaplasia at the margin of duodenal ulcers. *Gut* 1995;37:205-9.

252. Khulusi S, Hanby AM, Marrero JM, Patel P, Mendall MA, Badve S, Poulson R, Elia G, Wright NA, Northfield TC. Expression of trefoil peptides pS2 and human spasmolytic

polypeptide in gastric metaplasia at the margin of duodenal ulcers. *Gut* 1995; 37: 205-209.

253. Luqmani YA, Ryall G, Shousha S, Coombes RC. An immunohistochemical survey of pS2 expression in human epithelial cancers. *Int J Cancer* 1992; 50: 302-304.

254. Vestergaard EM, Brynskov J, Ejksjaer K, Clausen JT, Thim L, Nexø E, Poulsen SS. Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 146-156.

255 Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; 274: 262-265.

256. Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS. Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut* 1999; 44: 636-42.

257 . Sanderson IR. Dietary modulation of GALT. *J Nutr* 2007;137: 2557-2562.

258 Looijer-van Langen MA, Dieleman LA. Prebiotics in chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 454-62.

259. Roediger WEW. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficient disease? *Lancet* 1980; 2: 712-715.

260. Chapman MAS, 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; 35:73-76.
261. Kim Y. Short-chain fatty acids in ulcerative colitis. *Nutrition Rev* 1998; 56:17-24.
262. Chapman MAS, 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; 35:73-76.
263. Kim Y. Short-chain fatty acids in ulcerative colitis. *Nutrition Rev* 1998; 56:17-24.
264. Den Hond E, Hiele M, Evenpoel P, Peeters M, Ghooos Y, Rutgeerts P. *In vivo* butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998; 115: 548-590.
- 265 . Simpson EJ, Chapman MAS, Dawson J, Berry D, MacDonald IA, Colen A. *In vivo* measurement of colonic butyrate metabolism in patients with quiescent ulcerative colitis. *Gut* 2000; 46:73-77.
266. Inan MS, Rasoulpour EJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 2000; 118:724-734.

---

267. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C y cols. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 397-403.

268. Kles KA, Chang EB. Short Chain fatty acids impact on intestinal adaptation, inflammation, carcinoma and failure. *Gastroenterol* 2006; 130:100-105.

269. Lara-Villoslada F, de Haro O, Camuesco D, Comalada M, Velasco J, Zarzuelo A, Xaus J, Galvez J. Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. *Eur J Nutr* 2006; 45: 418-25.

270. Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A, Concha A, Galvez J, Lopez-Huertas E, Boza J, Obled C, Xaus J. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr* 2006; 25: 477–88.

271. Winkler J, Butler R, Symonds E. Fructo-oligosaccharide reduces inflammation in a dextran sodium sulphate mouse model of colitis. *Dig Dis Sci* 2007;52:52–58.

272. Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Laboisie CL, Nguyen PG, Siliart BS, Dumon HJ, Champ MM. Restoration of the

---

integrity of rat caecocolonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Br J Nutr* 2003; 90: 75–85.

273. Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N, Kamm MA, Knight SC, Forbes A. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut* 2006; 55: 348–55.

274. Furrle E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'Neil DA, Macfarlane GT. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54: 242-9.