

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Nutrición y Bromatología**



**EFFECTO DE LA INGESTA DE COMPUESTOS  
AVANZADOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD SOBRE  
EL METABOLISMO GASTROINTESTINAL**

**TESIS DOCTORAL**

**SILVIA PASTORIZA DE LA CUEVA**

**2013**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Silvia Pastoriza de la Cueva  
D.L.: GR 1894-2013  
ISBN: 978-84-9028-586-2





DEPARTAMENTO DE  
NUTRICION Y BROMATOLOGIA  
FACULTAD DE FARMACIA

Teléfono 958 24 38 63  
FAX: 958 24 95 77  
18071 - GRANADA  
e-mail: [fnutri@ucartuja.ugr.es](mailto:fnutri@ucartuja.ugr.es)

**JOSÉ ÁNGEL RUFÍAN HENARES, Profesor Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada.**

**CERTIFICA:** Que Doña **SILVIA PASTORIZA DE LA CUEVA**, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada y Máster en Nutrición Humana por la Universidad de Granada, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **EFFECTO DE LA INGESTA DE COMPUESTOS AVANZADOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD SOBRE EL METABOLISMO GASTROINTESTINAL** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de DOCTOR por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, a 14 de febrero de 2013

Fdo. José Ángel Rufián Henares





DEPARTAMENTO DE  
NUTRICION Y BROMATOLOGIA  
FACULTAD DE FARMACIA

Teléfono 958 24 38 63  
FAX: 958 24 95 77  
18071 - GRANADA  
e-mail: [fnutri@ucartuja.ugr.es](mailto:fnutri@ucartuja.ugr.es)

**MIGUEL NAVARRO ALARCÓN, Catedrático y Director del  
Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de  
Granada**

**CERTIFICA:** Que el presente trabajo ha sido realizado por **Doña SILVIA PASTORIZA DE LA CUEVA**, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada y Master en Nutrición Humana por la Universidad de Granada, en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Granada, a 14 de febrero 2013

Fdo. Miguel Navarro Alarcón





DEPARTAMENTO DE  
NUTRICION Y BROMATOLOGIA  
FACULTAD DE FARMACIA

Teléfono 958 24 38 63  
FAX: 958 24 95 77  
18071 - GRANADA  
e-mail: [fnutri@ucartuja.ugr.es](mailto:fnutri@ucartuja.ugr.es)

La memoria de **TESIS DOCTORAL** que lleva por título **EFFECTO DE LA INGESTA DE COMPUESTOS AVANZADOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD SOBRE EL METABOLISMO GASTROINTESTINAL** ha sido presentada por la Licenciada Silvia Pastoriza de la Cueva para aspirar al grado de **DOCTOR** por la Universidad de Granada, habiendo sido dirigida por el Doctor José Ángel Rufián Henares, Profesor Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Fdo. Silvia Pastoriza de la Cueva





La realización de la presente **Tesis Doctoral** se ha llevado a cabo gracias a un Contrato de Técnico Superior de Laboratorio adscrito al **Proyecto de Excelencia** concedido por la Junta de Andalucía (**AGR-4135**) denominado **“Repercusiones de la ingesta de compuestos avanzados de la reacción de Maillard sobre el metabolismo gastrointestinal y óseo”**.



*Había una vez dos ranas que cayeron en un recipiente de nata. Inmediatamente se dieron cuenta de que se hundían: era imposible nadar o flotar demasiado tiempo en esa masa espesa como arenas movedizas. Al principio, las dos ranas patalearon en la nata para llegar al borde del recipiente. Pero era inútil, solo conseguían chapotear en el mismo lugar y hundirse. Sentían que cada vez era más difícil salir a la superficie y respirar.*

*Una de ellas dijo en voz alta: “No puedo más. Es imposible salir de aquí. En esta materia no se puede nadar. Ya que voy a morir, no veo por qué prolongar este sufrimiento. No entiendo qué sentido tiene morir agotada por un esfuerzo estéril”. Dicho esto, dejó de patalear y se hundió con rapidez, siendo literalmente tragada por el espeso líquido blanco.*

*La otra rana, más persistente o quizá más tozuda se dijo: “¡No hay manera! Nada se puede hacer para avanzar en esta cosa. Sin embargo, aunque se acerque la muerte, prefiero luchar hasta mi último aliento. No quiero morir ni un segundo antes de que llegue mi hora”.*

*Siguió pataleando y chapoteando siempre en el mismo lugar, sin avanzar ni un centímetro, durante horas y horas. Y de pronto, de tanto patalear y batir las ancas, agitar y patalear, la nata se convirtió en mantequilla. Sorprendida, la rana dio un salto y, patinando, llegó hasta el borde del recipiente. Desde allí, pudo regresar a casa croando alegremente.*

**“NO TE DES POR VENCIDO NI AÚN VENCIDO”**

*(Jorge Bucay)*



A  
JOSÉ ÁNGEL

“Sin ti  
este sueño  
no se hubiera hecho realidad”

GRACIAS



A  
PABLO  
y  
ADRIANA

“Hacéis de  
mi realidad  
un sueño”

GRACIAS





**AGRADECIMIENTOS**



En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. José Ángel Rufián Henares, mi director de tesis y “compañero de viaje” por querer compartir conmigo no solo su Proyecto de Investigación sino también su Proyecto de Vida. GRACIAS.

En segundo lugar quiero dar las gracias a todas las personas que forman parte del departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Todos y cada uno de vosotros me habéis aportado algo durante mi estancia en el departamento.

Por último, quiero dar las gracias al Dr. Ákos Végvári por permitirme realizar una estancia predoctoral en los laboratorios del Biomedical Center (Universidad de Lund, Suecia) durante los meses de verano de 2012 y al Dr. Simon K Jackson (Universidad de Plymouth, UK) por la supervisión de los resultados inmunológicos obtenidos para la realización de la presente tesis doctoral.



## ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO 1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1. PARDEAMIENTO QUÍMICO	3
2.1.1. DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO	4
2.1.2. CARMELIZACIÓN	4
2.1.3. REACCIÓN DE MAILLARD	5
2.1.3.1. Química de la reacción de Maillard	5
2.1.3.2. Variables y prevención de la reacción de Maillard	9
2.1.3.3. Consecuencias nutricionales de la reacción de Maillard	20
2.1.3.4. Control de la reacción de Maillard	27
2.1.3.5. Consecuencias del desarrollo de la reacción de Maillard en alimentos y efectos de su consumo	29
A. Efectos negativos	29
A.1. Reducción del valor nutritivo	29
A.2. Aparición de sustancias con actividad mutagénica y/o carcinogénica	30

B. Efectos positivos	33
B.1. Actividad antioxidante	33
B.2. Efecto antimutagénico	34
B.3. Acción antimicrobiana	35
B.4. Carácter antialérgico	36
2.1.4. COMPUESTOS AVANZADOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD-AGEs	37
2.1.4.1. Carboximetilisina y otros AGEs	38
2.1.4.2. Carboximetilisina- receptor RAGE	42
2.2. PATOLOGÍA INTESTINAL	48
2.2.1. INTESTINO	48
2.2.1.1. Anatomía y funciones del intestino	48
2.2.1.2. Intestino y sistema inmune.	55
2.2.2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	58
2.2.2.1. Aspectos generales	58
2.2.2.2. Epidemiología y calidad de vida	59

2.2.2.3. Enfermedad de Crohn	60
2.2.2.4. Colitis ulcerosa	61
2.2.3. FACTORES QUE AFECTAN A LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	62
2.2.3.1. Factores genéticos	63
2.2.3.2. Factores medioambientales	64
A. Dieta	64
B. Industrialización	70
C. Tabaco	70
D. Infección	71
E. Estrés fisiológico	71
F. Medicamentos	72
G. Isquemia-Cirugía	72
2.2.3.3. Composición de la microbiota intestinal	73
2.2.3.4. Defectos en la barrera mucosa	74
<b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS</b>	<b>85</b>



<b>CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>87</b>
4.1. PREPARACIÓN CML	87
4.2. CONTENIDO CML EN ALIMENTOS Y TEJIDOS	87
4.3. DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS	88
4.4. ENSAYOS CELULARES	89
4.4.1. ACTIVACIÓN GPR43	90
4.4.2. ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA	91
4.4.3. ACTIVIDAD FAGOCÍTICA	91
4.4.4. PRODUCCIÓN DE ROS	92
4.5. ENSAYOS ANIMALES	92
4.5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	92
4.5.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	94
4.5.2.1. Índice de actividad diaria	94
4.5.2.2. Infiltración neutrófilos	95
4.5.2.3. Mieloperoxidasa	95

4.5.2.4. Permeabilidad de la mucosa intestinal	96
4.5.2.5. Determinación de citoquinas	96
4.5.2.6. Expresión receptores RAGE y GPR43	98
4.5.2.7. Determinación $\beta$ -defensinas	98
4.5.2.8. Estudio de la microbiota intestinal	98
4.5.2.9. Contenido de sulfatasas intestinales	99
4.5.2.10. Determinación de ocludina	100
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	101
<b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>103</b>
5.1. EFECTO DE LA CML SOBRE EL RECEPTOR GPR43	103
5.2. EFECTO DE LA CML SOBRE LA INFLAMACIÓN INTESTINAL AGUDA	111
5.3. EFECTO DE LA CML SOBRE LA INFLAMACIÓN INTESTINAL CRÓNICA	122
5.4. EFECTO DE LA INGESTA DE CML A LARGO PLAZO	132
<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES</b>	<b>145</b>
<b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>147</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la reacción de Maillard.	9
<b>Figura 2.</b> Rutas metabólicas de formación de AGEs a partir de glucosa.	38
<b>Figura 3.</b> Rutas metabólicas de formación de <i>CML in vivo</i> .	39
<b>Figura 4.</b> Inducción del RAGE mediante activación.	43
<b>Figura 5.</b> Perpetuación de la activación del NFκB.	45
<b>Figura 6.</b> Relación del RAGE con rutas proinflamatorias.	47
<b>Figura 7.</b> Sección transversal del intestino.	49
<b>Figura 8.</b> Tipo de uniones del epitelio intestinal.	51
<b>Figura 9.</b> Coordinación entre el transporte paracelular y transcelular.	52
<b>Figura 10.</b> Papel de las tight junctions y de la barrera epitelial sobre la homeostasis de la mucosa.	57
<b>Figura 11.</b> Relación entre componentes de la dieta y el sistema inmune.	67
<b>Figura 12.</b> Relación de los SCFAs con el receptor GPR43.	69
<b>Figura 13.</b> Dieta, microbiota intestinal y regulación del sistema inmune.	75
<b>Figura 14.</b> Esquema del priming y activación del inflamasoma NLRP3.	78

<b>Figura 15.</b> Papel del inflammasoma NLRP3 en la regulación de la homeostasis intestinal.	81
<b>Figura 16.</b> Papel del inflammasoma NLRP6 en la regulación de la homeostasis intestinal.	82
<b>Figura 17.</b> Esquema determinaciones ELISA.	97
<b>Figura 18.</b> Estructura química de la CML y ácido propiónico.	104
<b>Figura 19.</b> Activación del receptor GPR43 mediante propionato, CML y BSA-G.	105
<b>Figura 20.</b> Actividad quimiotáctica de propionato, CML y BSA-G.	106
<b>Figura 21.</b> Efecto sobre la fagocitosis de propionato, CML y BSA-G.	109
<b>Figura 22.</b> Efecto sobre la formación de ROS de propionato, CML y BSA-G.	110
<b>Figura 23.</b> Evolución del DAI en ratones con colitis aguda inducida y alimentados con BSA-C.	113
<b>Figura 24.</b> Evolución del DAI en ratones con colitis aguda inducida y alimentados con BSA-G.	113
<b>Figura 25.</b> Longitud del colon en ratones con colitis aguda inducida y alimentados con BSA-C.	114
<b>Figura 26.</b> Longitud del colon en ratones con colitis aguda inducida y alimentados con BSA-G.	115
<b>Figura 27.</b> Infiltración neutrofílica en ratones con colitis aguda inducida.	116
<b>Figura 28.</b> Actividad de la mieloperoxidasa en ratones con colitis aguda inducida.	117
<b>Figura 29.</b> Permeabilidad intestinal en ratones con colitis aguda inducida.	118

<b>Figura 30.</b> Secreción de TNF $\alpha$ en ratones con colitis aguda inducida.	119
<b>Figura 31.</b> Secreción de IL6 en ratones con colitis aguda inducida.	120
<b>Figura 32.</b> Secreción de IL10 en ratones con colitis aguda inducida.	121
<b>Figura 33.</b> Evolución del DAI en ratones con colitis crónica inducida y alimentados con BSA-C.	123
<b>Figura 34.</b> Evolución del DAI en ratones con colitis crónica inducida y alimentados con BSA-G.	124
<b>Figura 35.</b> Longitud del colon en ratones con colitis crónica inducida y alimentados con BSA-C.	125
<b>Figura 36.</b> Longitud del colon en ratones con colitis crónica inducida y alimentados con BSA-G.	125
<b>Figura 37.</b> Infiltración neutrofílica en ratones con colitis crónica inducida.	126
<b>Figura 38.</b> Actividad de la mieloperoxidasa en ratones con colitis crónica inducida.	127
<b>Figura 39.</b> Permeabilidad intestinal en ratones con colitis crónica inducida.	128
<b>Figura 40.</b> Secreción de TNF $\beta$ en ratones con colitis crónica inducida.	129
<b>Figura 41.</b> Secreción de IL6 en ratones con colitis crónica inducida.	130
<b>Figura 42.</b> Secreción de IL10 en ratones con colitis crónica inducida.	130
<b>Figura 43.</b> Secreción de citoquinas durante ingesta prolongada de CML.	133
<b>Figura 44.</b> Expresión de RAGE, GPR43 y contenido colónico de CML durante ingesta prolongada de CML.	135

<b>Figura 45.</b> Contenido de NLRP6 y citoquinas relacionadas durante ingesta prolongada de CML.	137
<b>Figura 46.</b> Evolución de mBD-3 y especies bacterianas durante la ingesta prolongada de CML.	139
<b>Figura 47.</b> Evolución de sulfatasas y CCL5 durante la ingesta prolongada de CML.	141
<b>Figura 48.</b> Evolución de la permeabilidad intestinal, ocludina y MPO durante la ingesta prolongada de CML.	142
<b>Figura 49.</b> Evolución temporal de los efectos mediados por la ingesta prolongada de CML.	143

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Efecto de diversos alimentos sobre la actividad quimiotáctica inducida por propionato	108
---	-----

## 1. RESUMEN

La mayoría de los alimentos que se ingieren con la dieta son sometidos a un **tratamiento térmico** durante su procesado, cocinado y/o almacenamiento. Este calentamiento lleva intrínseco una serie de transformaciones que inciden en la aceptabilidad del producto. Una de estas transformaciones es la llamada **reacción de Maillard**, la cual genera en sus etapas avanzadas compuestos como la **N-ε-carboximetilisina (CML)** compuesto que también se produce en humanos durante el envejecimiento o en patologías como la diabetes. La CML puede unirse a un receptor conocido como **RAGE**, dando lugar a un efecto proinflamatorio.

El objetivo general de la presente tesis doctoral consiste en estudiar el efecto que tiene la ingesta de compuestos avanzados de la reacción de Maillard, especialmente la CML sobre la inflamación a nivel intestinal.

Los resultados obtenidos demuestran que la CML proveniente de la dieta es capaz de activar el receptor RAGE y bolquear el receptor GPR43. De esta forma, la CML promueve la aparición de un desequilibrio en el status inmunológico a nivel intestinal, dando lugar a una **inflamación de bajo grado**.





## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. PARDEAMIENTO QUIMICO

El **pardeamiento químico** (también conocido como pardeamiento no enzimático) es un conjunto de reacciones muy complejas producidas en los alimentos tratados térmicamente y que da lugar a la formación de productos pardos (Cheftel and Cheftel, 1980). Se produce durante el procesado y almacenamiento de diversos alimentos, se acelera con el calor y se acusa especialmente durante las operaciones de cocción, pasteurización, esterilización y deshidratación. Estas reacciones provocan modificaciones en el olor, color y sabor de los alimentos. Los problemas derivados de este tipo de transformaciones en algunos alimentos obliga a la industria alimentaria a establecer normas de procesado y control que reduzcan este tipo de alteraciones.

El pardeamiento químico puede producir efectos indeseables durante la preparación y almacenamiento de alimentos líquidos (leche, zumos de frutas y jarabes) y deshidratados (leche, huevos, carne) (Cheftel and Cheftel, 1980) pero también puede producir efectos favorables para ciertos alimentos como el pan, cereales de desayuno, galletas, asados, caramelos, cerveza, café y chocolate.

El pardeamiento químico agrupa las reacciones de **degradación del ácido ascórbico, caramelización** (transformación de carbohidratos) y **reacción de Maillard** (interacción proteína-carbohidrato).

### 2.1.1. DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

El **ácido L-ascórbico** o vitamina C es una sustancia muy soluble en agua que posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras, debido a su estructura de enodiol conjugado con el grupo carbonilo de una lactona, por lo que es una molécula muy sensible a diversas formas de degradación (Finholt et al., 1965).

La degradación del ácido ascórbico se realiza sin la presencia de grupos amino a pH ligeramente ácido, con  $a_w$  media/alta y temperatura moderada (Badui, 2006). Sigue tanto una vía oxidativa (Velísek et al., 1976) como no oxidativa (Kurata and Sakurai, 1967) produciendo ambas diversos compuestos como furfural, 3-hidroxi-2-pirona, ácido 2-furancarboxílico, ácido acético y 2-acetilfurano. Algunas de estas sustancias contribuyen al aroma de ciertos alimentos como es el caso de las patatas (Buttery et al., 1970), café (Bondarovich et al., 1967) y el pan (Mulders et al., 1972).

### 2.1.2. CAMELIZACIÓN

La **caramelización** se presenta cuando los azúcares son calentados por encima de su temperatura de fusión. Se produce en ausencia de oxígeno y grupos amino, a  $a_w$  bajas y a pH tanto ácidos como básicos. En ella, los monosacáridos forman enoles como paso inicial de la reacción (Badui, 2006). Las pentosas generan 2-furaldehído como principal producto de degradación, mientras que las hexosas producen 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF) y otros compuestos como

2-hidroxiacetilfurano e isomaltol. La fragmentación de estos productos primarios da lugar a la formación de compuestos como ácido fórmico, acetal, diacetilo, ácido acético, etc. Algunos de estos productos poseen intenso olor y pueden conferir fuertes aromas deseables o indeseables (Fennema, 1993).

### **2.1.3. REACCIÓN DE MAILLARD**

La **reacción de Maillard** ocurre principalmente en aquellos alimentos que contienen azúcares reductores o lípidos oxidados y grupos amino de un aminoácido, péptido o proteína, que sufren un procesado térmico (calentamiento o conservación a temperatura ambiente) y se produce por lo general a  $a_w$  intermedias.

#### **2.1.3.1. Química de la reacción de Maillard**

La **reacción de Maillard** es un conjunto de reacciones químicas en cadena que dan lugar a la formación de pigmentos pardos con modificaciones del olor, color y sabor de diversos alimentos. Se desarrolla a  $a_w$  intermedias y diversos pH, necesitando un aporte de calor moderado (Badui, 2006). Se origina entre el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína y el grupo carbonilo de un azúcar reductor o un lípido oxidado, dando lugar a los denominados **productos de la reacción de Maillard (PRMs)** (Baxter, 1995). Entre ellos, como productos finales, pueden citarse las melanoidinas.

Esta reacción es especialmente importante para la industria alimentaria, ya que se da con frecuencia durante el almacenamiento de los alimentos y en procesos como el horneado, tostado, fritura, etc. confiriéndoles nuevos colores, olores, sabores y texturas agradables para el consumidor (Rizzi, 1997), aunque también pueden originarse sustancias aromáticas y compuestos pardos indeseados (Baltes, 1982). Además, la reacción de Maillard puede disminuir el valor nutritivo de los alimentos, principalmente el afectar la calidad de las proteínas, debido a la destrucción de aminoácidos o disminución de su biodisponibilidad (Castrillón et al., 1996) y la de otros nutrientes (Finot, 1993).

La reacción de Maillard puede dividirse en tres etapas:

1. **Etapa temprana:** En esta etapa aún no aparece el pardeamiento. Comienza con la condensación entre el grupo carbonilo libre de un azúcar reductor o un lípido oxidado y el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína que, tras deshidratación, da lugar a una base de Schiff inestable que se transforma en glicosamina-N-sustituida. Esta reacción es reversible ya que en un medio fuertemente ácido se regenera el azúcar y el aminoácido. Las glicosilaminas son más estables cuando proceden de aminos aromáticas que de aminoácidos (Rosen et al., 1953; Pigman and Johnson, 1953; Finot and Magneat, 1981).

2. **Etapa intermedia:** En esta etapa se produce la inmediata reorganización irreversible de la glicosilamina-N-sustituida. Cuando se parte de una aldósilamina-N-sustituida, mediante la **transposición de Amadori**, se genera 1-amino-1-desoxi-2-cetosa, mientras que cuando se

parte de una cetosilamina-N-sustituida, mediante la **transposición de Heyns** se genera 2-amino-2-desoxialdosa. Los compuestos de Amadori (Mauron, 1981) y de Heyns (McPherson et al., 1988) han sido encontrados en diversos alimentos y en el organismo humano.

La importancia de la transposición de Amadori para la producción de colores pardos, fue demostrada por Hodge and Rist (1953). Con estos conocimientos se pudo controlar las reacciones de pardeamiento en alimentos desecados. Los compuestos de Amadori y de Heyns sufren una serie de descomposiciones que varían en función del pH o de la temperatura del medio. Estas reacciones comprenden las etapas intermedias de la reacción de Maillard y dan lugar a compuestos con color y olor. A partir de los compuestos de Amadori pueden seguirse tres rutas diferentes:

- A pH ácido se produce una **enolización en posición 1,2** que origina compuestos dicarbonílicos (potentes precursores del pardeamiento) que dan lugar a 5-hidroximetilfurfural (HMF) o furfural (Moye and Krzeminski, 1963) y por el contrario, a pH básico se produce una **enolización en posición 2,3** que da lugar a reductonas (Cheftel and Cheftel, 1980) las cuales pueden deshidratarse para generar dehidroreductonas y estas a su vez en etapas más avanzadas pueden reaccionar con grupos amino y polimerizar.

- Los compuestos de Amadori pueden escindir-se dando lugar a diversos productos de fisión (compuestos dicarbonílicos) como el acetal o el diacetaldehido (Nursten, 1986).

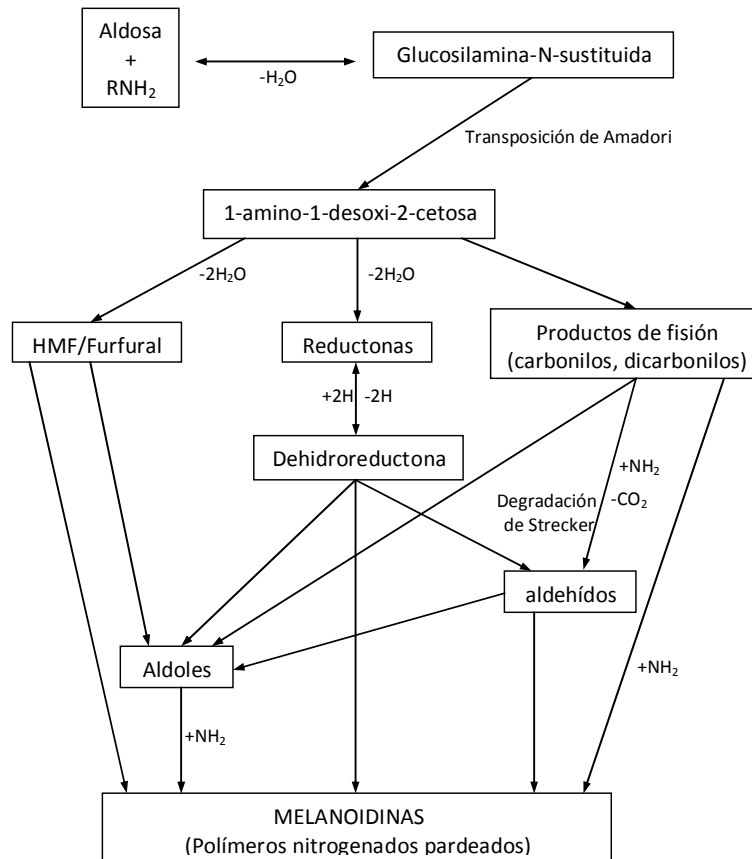
- La interacción de aminoácidos con los compuestos dicarbonílicos, ya sean dehidroreductonas o productos de fisión, se conoce como **degradación de Strecker** y supone la pérdida de aminoácidos del alimento (Cheftel and Cheftel, 1980). Como resultado de esta degradación se formarán nuevos aldehídos con un carbono menos que se elimina como CO<sub>2</sub> (Stadtman et al., 1952).

3. **Etapas avanzadas:** Las etapas finales de la reacción de Maillard son complejas y dan lugar a dos tipos de compuestos: las melanoidinas y los compuestos avanzados de la reacción de Maillard.

Las **melanoidinas** son polímeros pardos producidos mediante la condensación de compuestos aminados procedentes de las etapas intermedias de la reacción de Maillard (O'Reilly, 1982) como son pirroles N-sustituídos, 2-formilpirroles N-sustituídos y 2-furaldehído (Tressl et al., 1998). Las melanoidinas varían ampliamente en peso molecular y poseen rasgos distintivos en la región visible del espectro (Richards, 1956; Clark and Tannenbaum, 1970).

Los **compuestos avanzados de la reacción de Maillard** conocidos "in vivo" como AGEs se forman por la oxidación o fragmentación de azúcares o sus aductos con proteínas. Estas reacciones están catalizadas por especies reactivas del oxígeno (ROS) y peroxinitritos. Uno de estos AGEs es la llamada **carboximetilisina** la cual se puede formar a partir de glioxal o *glicosaldehído* generados a partir de la oxidación de azúcares libres (aldosas, cetosas) o aductos de azúcares con proteínas,

por oxidación del ácido ascórbico, por peroxidación lipídica y por degradación de aminoácidos (serina), entre otros (figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la reacción de Maillard

### 2.1.3.2. Variables y prevención de la reacción de Maillard

El desarrollo de la reacción de Maillard depende de una serie de factores como son la estructura química de los reactantes y su concentración, la actividad de agua, el pH, la temperatura y el tiempo de calentamiento, la presión hidrostática, etc. (O'Brien and Morrissey, 1989; Wijewickreme et al., 1997).



## Sustratos

Los principales sustratos involucrados en la reacción de Maillard son los grupos carbonilos, principalmente de azúcares reductores (aunque también de lípidos oxidados) y los grupos amino, principalmente de aminoácidos libres, péptidos o proteínas con grupos amino en su cadena lateral. El primer punto a tener en cuenta es que, aunque es una reacción isomolecular entre un azúcar y un aminoácido, la pérdida del primero es mayor que la del segundo, principalmente debido a que tiene lugar otra reacción química al mismo tiempo, como es la caramelización (Rufián- Henares et al., 2009a). La intensidad de la reacción depende en gran medida de la naturaleza del azúcar implicado en el proceso. Así las cetosas favorecen la formación de productos intermedios, como los productos de Heyns, mientras que las aldosas favorecen la formación de los productos de Amadori.

Los **carbohidratos** de bajo peso molecular son más reactivos que los de alto peso molecular debido al menor impedimento estérico (Stepanenko and Serbyuk, 1950). Así, concentraciones estandarizadas de azúcares producen pérdidas de lisina próximas al 16% para los disacáridos, 42% para las hexosas y 60% para las pentosas. La reactividad de los azúcares es proporcional a la cantidad de forma abierta (Burton and McWeeny, 1963). En los isómeros, la configuración estereoquímica determina su reactividad. De forma general, el grado de pardeamiento en los azúcares decrece en el siguiente orden: (1)

pentosas, ribosa > xilosa > arabinosa; (2) hexosas, galactosa > manosa, glucosa > fructosa; (3) disacáridos, maltosa= lactosa.

Hay que tener en cuenta que el azúcar no tiene un grado de reactividad absoluta y su comportamiento depende también del estado y naturaleza de la proteína con la que reacciona. Así, la rafinosa destruye 6 veces más lisina de la lactoalbúmina que de la globulina, aunque pentosas y hexosas presentan una reactividad similar en ambas proteínas (Overby and Frost, 1952; Frangne and Adrian, 1972).

Cuando el pardeamiento de Maillard no es deseado se puede prevenir eliminando uno de los sustratos, normalmente el azúcar. En el caso de huevos deshidratados, se puede oxidar la glucosa a ácido glucónico, por medio de glucosa oxidasa o bien eliminarla por fermentación. Durante la formulación de ciertos alimentos, concretamente alimentos para animales, se evita incorporar azúcares reductores, incluso la sacarosa sólo se utiliza en pequeñas dosis y se añade lo más tarde posible, después del tratamiento térmico (Cheftel and Cheftel, 1980).

*Otras moléculas con grupos carbonilo* (Montgomery and Day, 1965; Pokorny, 1981) como los formados por degradación de Strecker (formaldehído, acetal, propional) o los producidos durante la degradación de los compuestos de Amadori (furfural e hidroximetilfurfural) (Obretenov et al., 1983) pueden reaccionar con los grupos amino e iniciar otra vez la reacción. Cuando un alimento contiene productos de estas clases la reacción de Maillard puede

producirse sin el concurso de los azúcares, como ocurre en el queso o en las frutas y zumos de fruta (Clegg, 1964).

En cuanto a las **proteínas**, todas ellas son susceptibles de reaccionar con los azúcares excepto las proteínas insolubles como la queratina. Los  $\alpha$ -aminoácidos, que forman junto al grupo carbonilo el enlace peptídico, son poco accesibles durante los tratamientos por calor y reacciones químicas a diferencia de los  $\alpha$ -aminoácidos terminales y los que tienen un segundo grupo amino en estado libre como es el caso de la lisina. El grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina es el principal responsable del desarrollo de la RM en los alimentos proteicos (Rufián-Henares et al., 2009b). En la caseína, la cantidad de grupos  $\epsilon$ -amino libre es 50 veces mayor que la cantidad del grupo  $\alpha$ -amino libre, por lo que la pérdida de lisina a través del grupo  $\epsilon$  es la consecuencia nutricional más grave. Cuando una mezcla de caseína y glucosa se calienta, la destrucción de histidina alcanza el 17%, la arginina el 22% y la lisina el 46% (Erbersdobler et al., 1968; Brown et al., 1973). Cuando la reacción tiene lugar con aminoácidos incluidos en una cadena proteica, no todos son capaces de reaccionar con los azúcares por encontrarse ocultos en la estructura tridimensional, siendo el grupo amino terminal más reactivo, seguido de los aminoácidos básicos.

La intensidad de pardeamiento es proporcional a la concentración de lisina en los alimentos proteicos. Así, las proteínas lácteas producen una mayor velocidad de pardeamiento que las proteínas de soja (Hackler and Stillings, 1967; Wolf et al., 1977) y estas

mayor que las de los cereales (Frangne and Adrian, 1972). La destrucción de lisina en productos lácteos es más rápida cuando la lactosa es hidrolizada o sustituida por glucosa; en este caso se puede llegar a una destrucción de hasta un 50% según el procedimiento utilizado para la obtención de leche en polvo (Burvall et al., 1978; Finot and Magnenat, 1981).

Los *aminoácidos básicos libres* no reaccionan con los azúcares a una velocidad marcadamente superior al resto de aminoácidos, sino que es la configuración estereoquímica la que determina su comportamiento. Así, los porcentajes de pérdida de los aminoácidos fenilalanina, metionina, lisina, isoleucina, treonina y valina fueron 57%, 62%, 69%, 73%, 78% y 80% respectivamente cuando se calentaron con glucosa a 120°C (Adrian, 1963). Por otra parte la presencia de aminoácidos libres condiciona el desarrollo de la reacción de Maillard entre lisina y azúcar, la valina acelera la velocidad de la reacción entre lisina-azúcar mientras que la arginina la disminuye.

Ashoor and Zent (1984) establecieron en sus ensayos una clasificación de los aminoácidos en función del grado de pardeamiento:

- Aminoácidos productores de alto grado de pardeamiento: lisina, glicina, triptófano y tirosina.

- Aminoácidos productores de un grado medio de pardeamiento: prolina, leucina, isoleucina, alanina, hidroxiprolina, fenilalanina, metionina, valina, ácido glutámico y asparragina.

- Aminoácidos productores de un grado bajo de pardeamiento: histidina, treonina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico y cisteína.

Sin embargo, otros autores (Wolf from and Rooney, 1953) estudiaron este mismo efecto en un sistema glucosa-mezcla de aminoácidos y encontraron que la mayor intensidad y velocidad de coloración se obtenía con la arginina y el ácido 4-aminobutírico, seguidos de glicina, alanina, serina y prolina.

La *mezcla de proteínas completas y aminoácidos libres* produce una mayor pérdida nutricional y a la pérdida de lisina en proteínas intactas hay que unir la de los otros aminoácidos (Adrian and Frangne, 1973).

En cuanto a la prevención, la transformación del grupo amino en amido mediante las transglutaminasas impide la 1ª etapa de la reacción (Friedman, 1996; Friedman et al. 1990). En alimentos, una mayor proporción de azúcares reductores respecto a grupos amino acelera el pardeamiento. Esto puede ser debido a diferentes mecanismos de destrucción de azúcares y aminoácidos. Jokinen et al., (1976) observaron en un sistema compuesto por proteína de soja/glucosa calentado a 130°C que la pérdida de glucosa seguía una cinética de primer orden, mientras que para la destrucción de lisina era de orden cero. El pardeamiento en sistemas modelo aminoácido/azúcar también es máximo cuando los azúcares están en exceso. Dworschak and Orsi (1977) comprobaron que la proporción molar óptima en un sistema metionina/glucosa era de 2:3.

El efecto que sobre el pardeamiento ejerce la concentración de azúcares reductores depende, así mismo, de la temperatura de reacción. Wolf et al., (1977) en un sistema modelo similar al anterior, demostraron que un tratamiento térmico de 80°C a 130°C supone un incremento de la reacción de 5 a 25 veces respectivamente cuando la concentración de glucosa es 10 veces la del aminoácido.

## **pH**

El desarrollo de la reacción de Maillard está fuertemente condicionado por el pH inicial de los reactantes así como por la capacidad tampón del sistema (Ellis, 1959; Nursten, 1980). En general, un incremento del pH favorece su desarrollo y la aparición de color (Ames, 1990) mientras que a pH ácido la velocidad es mínima y su desarrollo escaso (Lea and Hannan, 1949) alcanzando su máximo cuando el pH se eleva a 10 (Ashoor and Zent, 1984). El avance de la reacción supone una disminución del pH debido a la formación de ácidos grasos de cadena corta y a la desaparición de aminoácidos básicos (Rufián-Henares et al., 2009a). La reactividad del grupo amino es mayor cuando el aminoácido está en forma aniónica y este valor depende del carácter ácido-base del aminoácido. En aminoácidos ácidos (ácido aspártico y glutámico) la forma aniónica se produce a pH 3, pero en aminoácidos básicos (lisina y arginina) se necesita un pH de 10 (Song and Chichester, 1967; Powell and Spark, 1971). A pH mayor de 10, el descenso de protones necesario para la catálisis de la reestructuración

de Amadori y Heyns, puede ser la causa del descenso de esta reacción (Carson, 1955; Isbell and Frush, 1958).

Si estudiamos el efecto del pH en los alimentos, podemos distinguir:

a) *Alimentos cuyo pH está comprendido entre 6 y 8* (leche, huevos, cereales, carnes) en los que las condiciones son favorables a la reacción de Maillard. Un descenso del pH permite atenuar el pardeamiento durante la deshidratación, pero modifica desfavorablemente los caracteres organolépticos.

b) *Alimentos cuyo pH está comprendido entre 2.5 y 3.5* (zumos y concentrados de frutas ácidas). Estos productos son pobres en aminoácidos y la reacción de Maillard aparece de forma muy débil. Es la degradación del ácido ascórbico, así como la caramelización de los azúcares, la responsable del pardeamiento. Estas reacciones están catalizadas por el ácido cítrico y algunos aminoácidos presentes.

c) *Alimentos de pH intermedio* (conservas vegetales, alimentos fermentados, miel, salsas, sopas) en los que puede ocurrir simultáneamente la reacción de Maillard y la degradación del ácido ascórbico.

### **Actividad de agua**

Uno de los factores que más influencia tiene en el desarrollo de la reacción de Maillard es el agua presente en los alimentos, expresado como actividad de agua ( $a_w$ ) (Labuza and Saltmarch, 1981; Ames, 1990).

La velocidad de la reacción aumenta de manera exponencial con el contenido de humedad del sistema (Labuza et al., 1970) hasta un máximo de  $a_w$  entre 0.3 y 0.7 (Karel, 1960; Heiss, 1968) y ya a partir de 0.8 la velocidad de reacción disminuye debido a la dilución del soluto en la fase acuosa (Kane and Labuza, 1989).

Esta cinética se explica de la siguiente forma: con un contenido en agua muy bajo está frenada la difusión de especies químicas entre sí. La adición o aumento del agua facilitan la difusión de los reactantes (Schwart and Lea, 1952; Wolfron and Rooney, 1953; Labuza et al., 1970) y aumenta la velocidad de pardeamiento. Sin embargo, con cantidades superiores de agua, las concentraciones de sustancias reactivas en solución disminuyen y se reduce, de acuerdo con la ley de acción de masas, la velocidad de la reacción (Eichner and Karel, 1972). En sistemas con una humedad pequeña o nula la reacción de Maillard podría proseguir por el agua que aparece en las deshidrataciones de las primeras etapas de la reacción (Adrian, 1982).

El estado fisicoquímico en sistemas de alimentos puede también afectar a la reacción de Maillard. La isoterma de sorción dependerá de si el sistema es cristalino o amorfo y de otros factores tales como el porcentaje en grasa (O'Brien and Morrissey, 1989). A bajas  $a_w$  un sistema de alimentos amorfo absorbe más agua en el espacio que hay entre las moléculas, mientras que en un sistema cristalino, la absorción del agua sólo puede darse en la superficie del entramado del cristal. En alimentos desecados como la leche en polvo, un cambio del estado amorfo al



cristalino ocurre a valores de  $a_w = 0.6$  a  $0.7$  (O'Brien and Morrissey, 1989). La fase amorfa absorbe agua hasta que las moléculas adquieren suficiente movilidad y espacio para formar el entramado del cristal. Como la cristalización se ha iniciado, el agua es expulsada y puede quedar atrapada en áreas localizadas del alimento (Erbersdobler, 1971). Este agua está entonces disponible para la interacción con otros componentes y afectará al grado de la reacción de Maillard, a no ser que se evapore (Erbersdobler and Zucker, 1966).

Por lo general, es durante la deshidratación cuando los riesgos de pardeamiento son mayores y en especial en la fase del proceso en que el contenido en agua es inferior al 20% y la temperatura es elevada. Tratamientos a temperaturas más bajas presentan el inconveniente de alargar el proceso de deshidratación y el alimento permanece más tiempo con un contenido crítico de agua. Así por ejemplo en la elaboración de pan la baja actividad de agua favorece la formación de color durante el horneado pero a medida que avanza la cocción, aumenta la temperatura y disminuye la actividad de agua por lo que se acelera el pardeamiento y acumulación de compuestos coloreados en la corteza (Purlis, 2010).

### **Temperatura**

La reacción de Maillard se produce tanto a temperatura ambiente (durante el almacenamiento) como a altas temperaturas (esterilización). A mayor temperatura el desarrollo de la reacción de

Maillard es más intenso aunque el factor clave no solo es la temperatura utilizada sino el tiempo empleado. Así se puede obtener el mismo grado de pardeamiento si el producto se calienta a una temperatura elevada durante un periodo de tiempo corto como si el tiempo empleado es mayor y la temperatura que se alcanza es menor. Por eso es importante tener en cuenta que la mejor variable para predecir el pardeamiento es la carga de calor: cantidad de calorías aplicadas al producto. Este valor puede obtenerse multiplicando el tiempo de calentamiento (en minutos) por la temperatura (en grados centígrados) (Rufián-Henares et al., 2009a).

Debido a las fuertes energías de activación de algunas de las reacciones de pardeamiento, no deben someterse los alimentos a tratamientos térmicos demasiado enérgicos y además hay que conseguir que el almacenamiento sea a una temperatura moderada para minimizar el avance de la reacción de Maillard.

### **Presencia de metales**

La presencia de cationes metálicos afecta a la reacción de Maillard ya que mediante reacciones de oxidación pueden favorecer la formación de compuestos dicarbonílicos que participan en la reacción (Wolf, 1996) o bien de complejos capaces de catalizarla (Kato et al., 1981; O'Brien et al., 1994) y por tanto incrementar el desarrollo del pardeamiento. Las sales de cobre e hierro aceleran la reacción mientras que el manganeso la inhibe (Bohart and Carson, 1955). Hay que hacer

notar que los primeros estudios atribuyen efectos a los cationes metálicos debidos al descenso del pH que se produce en su incorporación al sistema (Powell and Spark, 1971).

### **2.1.3.3. Consecuencias nutricionales de la reacción de Maillard**

#### **Pérdida de aminoácidos esenciales**

La reacción de Maillard reduce el valor nutritivo de los alimentos al disminuir la biodisponibilidad de los aminoácidos esenciales (O'Brien and Morrissey, 1989). Esta reducción se produce aunque no se observen cambios en el color y aroma de los alimentos (Mauron, 1981) y se debe a la destrucción de aminoácidos mediante la reacción de Maillard. La lisina es el aminoácido más afectado de la reacción de Maillard, no obstante, el tratamiento térmico de los alimentos produce pérdida de otros aminoácidos esenciales como aminoácidos azufrados (Adrian, 1982; Bjorck et al., 1983), triptófano (Bjorck et al., 1983) e histidina (Lee et al., 1982).

La base de Schiff formada en la primera etapa de la reacción deja nutricionalmente disponible al aminoácido (Finot and Mauron, 1972; Finot et al., 1978; Finot and Magnenat, 1981) pero no sucede lo mismo con el compuesto de Amadori. Finot (1990) demostró que sólo un 5-15% de la N- $\epsilon$ -fructosil-lisina administrada a animales de experimentación es utilizada como fuente de aminoácido. Erbersdobler et al., (1989 y 1991) observan que el 90% de la N- $\epsilon$ -fructosa-lisina administrada oralmente a 42 personas voluntarias en forma de caseína glicosilada no se

encontraba en orina ni en heces e indica que puede ser metabolizada por la microbiota intestinal.

Un nivel bajo de aminoácidos (<0.5%) pueden ser generados *in vivo* a partir de los compuestos de Amadori (Sgarbieri et al., 1973; Finot et al., 1978; Finot and Magnenat, 1981; Perkins et al., 1981). La microbiota intestinal puede ser la responsable de la regeneración de estos aminoácidos (Finot and Magnenat, 1981).

La pérdida nutricional del alimento depende del tipo de proteína, carbohidrato, severidad del tratamiento y binomio tiempo/temperatura. Estudios en ratas alimentadas con diferentes tipos de proteína y combinadas con un 10% de carbohidratos tratados en autoclave (Knipfel et al., 1975) muestran que:

a) El peso ganado por ratas alimentadas con proteínas de huevo, independientemente del carbohidrato, es menor que el de las ratas alimentadas con proteínas de leche y soja y la utilización proteica neta de la caseína es mayor que la obtenida con proteínas de huevo y soja.

b) La digestibilidad de la proteína de huevo es menor que la de soja y leche.

c) La presencia de glucosa o fructosa reduce el valor nutritivo en una proporción mayor que cuando el tratamiento se realiza sólo con proteína. La celulosa y el almidón tienen poco efecto sobre el valor nutricional.

La suplementación de alimentos tratados térmicamente con aminoácidos de síntesis no restituye el valor nutricional inicial del

alimento. Rao et al., (1963) demostraron que cuando la caseína se calentaba con glucosa el coeficiente de eficacia proteica (CEP) pasaba de 2.6 a 0.7 y cuando se adicionaba lisina y metionina se elevaba a 2.2; resultados similares se obtienen en leche en polvo.

La digestibilidad del nitrógeno y la liberación *in vitro* de aminoácidos por hidrólisis enzimática es menor que el porcentaje de pérdida o bloqueo de lisina. Una destrucción de un 52% de lisina y un 2% de metionina se produce cuando se calienta soja a 120°C durante 4 horas y sin embargo la proteólisis de estas muestras indica que la digestibilidad se reduce en un 72% para la lisina y 42% para la metionina (Riesen et al., 1947).

La fracción de aminoácidos útiles *in vitro* es siempre mayor que el CEP. Pérdidas de un 15% de lisina y 35% de metionina en carnes muestran una disminución de un 50% en la utilización proteica neta (Donoso et al., 1962). Además, el porcentaje de aminoácidos es menor que la digestibilidad obtenida sobre todo para la metionina, lisina y treonina (Bruggemann and Erbersdobler, 1968; Erbersdobler et al., 1972). Las proteínas que permanecen tienen menor eficacia nutricional.

A pequeñas dosis, las premelanoidinas formadas (8,5-50,0 mg de nitrógeno degradado/kg de dieta) poseen un efecto beneficioso, ya que gracias a su aroma y sabor estimulan la ingestión de alimentos. En los casos más favorables se ha observado un incremento de un 40%, lo que ha producido un aumento en peso de los animales de experimentación del 25% (Adrian et al., 1966). Sin embargo, a grandes dosis, el nitrógeno

degradado de las premelanoidinas no es útil aunque sea retenido y su presencia es perjudicial para el organismo. En animales de experimentación se obtienen pérdidas de peso de 1.36 g/día (dieta libre de nitrógeno y premelanoidinas) frente a 1.13 g/día en el control (dieta libre de nitrógeno) (Adrian and Frangne, 1973).

### **Efecto sobre los enzimas digestivos**

La reacción de Maillard produce cambios en la estructura proteica que impiden la acción de las peptidasas digestivas en las proximidades de los enlaces cruzados. *In vitro* se observa una mayor cantidad de péptidos y menor de aminoácidos libres (Ford and Salter, 1966; Adrian and Frangne, 1973) e *in vivo* un descenso de la digestibilidad (Adrian and Frangne, 1973).

Junto a estos efectos se ha observado que algunos componentes de la reacción de Maillard pueden inhibir la actividad de los enzimas digestivos. Adrian and Frangne, (1973) demostraron que los productos hidrosolubles (premelanoidinas) del sistema de reacción glucosa/glicina inhibían la proteólisis *in vitro* de globulinas de soja, seroalbúminas y  $\alpha$ -lactoalbúminas por el sistema pepsina/tripsina/erepsina y que la tripsina es el enzima más afectado por la presencia de productos de Maillard. En otros ensayos (O'Brien and Morrisey, 1989), las cantidades de lisina y metionina resultantes de la digestión proteolítica de péptidos en presencia de compuestos pardos, eran inferiores a las determinadas en ausencia de los mismos.

Los efectos inhibidores de los productos de bajo peso molecular sobre la actividad de algunas enzimas fueron confirmados por Oste et al., (1986, 1987). La tripsina, las carboxipeptidasas A y B, la aminopeptidasa N y la enzima citosólica glicina-leucina dipeptidasa, se afectan por estos compuestos. No se vieron afectadas la dipeptidilpeptidasa IV o la prolina dipeptidasa.

Las disacaridasas intestinales también pueden verse afectadas. Los productos de Maillard de bajo peso molecular son inhibidores *in vitro* de la lactasa, invertasa, maltasa y trehalasa, a concentraciones de 5 a 10 mg/ml (Oste et al., 1985). Los compuestos de alto peso molecular también causan inhibición a concentraciones de 1.4 a 2.8 mg/ml. Cuantitativamente sólo estos últimos parecen tener importancia en la disminución de la actividad enzimática (Oste et al., 1983, 1985). Por el contrario, otros autores afirman que la administración oral de melanoidinas a ratas incrementa la actividad disacaridasa de los enzimas del intestino delgado de forma proporcional a la dosis (Gomyo and Miura, 1986).

Moughan et al., (1996) han sugerido que los compuestos de la reacción de Maillard podrían incluso complicar la absorción y digestibilidad del nitrógeno que ha quedado sin reaccionar. En un estudio realizado con dietas animales ricas en caseína, estos autores han encontrado menor digestibilidad de la lisina intacta tras el tratamiento térmico frente a la lisina de la misma dieta sin tratar.

### **Efecto sobre las vitaminas**

La influencia que ejercen los compuestos de la reacción de Maillard sobre las vitaminas no es del todo conocida. Algunas premelanoidinas pueden reaccionar con las vitaminas y destruirlas. Ford et al., (1983) demostraron la pérdida de tiamina (vitamina B1) y piridoxina (vitamina B6) durante el almacenamiento de leche en polvo durante 9 semanas a 60°C. La tiamina tiene un grupo amino y la piridoxina tiene un grupo aldehído por lo que ambos pueden, teóricamente, participar en la reacción de Maillard. A 70°C la destrucción de las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y B<sub>5</sub> (ácido pantoténico) era más rápida y ocurría de forma paralela a la degradación de la lactulosa-lisina y a la aparición de productos de la reacción de Maillard. Otros autores (Finot and Furniss, 1989) encontraron pérdidas similares de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido pantoténico mientras que el ácido nicotínico (vitamina B<sub>3</sub>) y la biotina (vitamina B<sub>8</sub>) eran relativamente insensibles.

La destrucción del ácido ascórbico en algunos alimentos está estrechamente relacionada con la reacción de Maillard (Archer and Tannenbaum, 1979). El ácido dehidroascórbico reacciona, vía Maillard, con los compuestos amino de los alimentos para formar pigmentos rojos y pardos (Namiki et al., 1986; Ishii et al., 1986). La pérdida nutricional de esta vitamina por la reacción de Maillard es insignificante. En las condiciones de almacenamiento y procesado habituales, gran parte del ácido ascórbico se destruye antes de que la reacción de Maillard tenga carácter significativo (Archer and Tannenbaum, 1979).



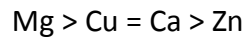
### **Efecto sobre los minerales**

Los productos de la reacción de Maillard interfieren con el metabolismo de los minerales, aunque la naturaleza de las interacciones entre ambos es aún poco conocida. La importancia de las uniones de los productos de la reacción de Maillard con los metales ha sido estudiada por diversos autores. Así, en 1975 Hrdlicka realizó un ensayo in vitro en el que señalaba que al calentar mezclas de glucosa-glicina o fructosa glicina en presencia de sales de  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ , se originan pigmentos insolubles (melanoidinas) que actúan como agentes quelantes de dichos cationes, de manera que al ser introducidos en dietas para animales podrían afectar la biodisponibilidad de los cationes.

Rendleman (1986), en sus estudios de quelación de minerales por los productos de la reacción de Maillard en alimentos, demuestra que panes elaborados con leche presentan una mayor afinidad por el cobre y calcio que los que no la llevan como ingrediente. Al poseer la caseína una mayor afinidad por el calcio cuando se calienta junto con lactosa, este autor concluye que el efecto observado en los panes elaborados con leche se debe también a los productos de Maillard. Posteriormente, Rendleman and Inglet (1990) han propuesto que dos iones  $\text{H}^+$  son sustituidos por un ión  $\text{Cu}^{2+}$  que se une así a las melanoidinas.

La hipótesis del desplazamiento de los hidrogeniones ha sido constatada por O'Brien et al., (1994), quienes afirman que el desplazamiento de protones es evidente en la mayoría de los sistemas

estudiados. Estos autores sugieren que existe un orden de afinidad para acomplejar los distintos minerales:



La capacidad de complejación de metales podría explicar algunos efectos como la inhibición de metaloenzimas (Carboxipeptidasas A y B) (Schnepf and Satterlee, 1986), el efecto inhibitor de los compuestos de Maillard en el transporte de metales en el intestino delgado (Schnepf and Satterlee, 1986) y el efecto antibiótico que poseen estos compuestos (Einarsson et al., 1988).

#### **2.1.3.4. Control de la reacción de Maillard**

Todos los parámetros enumerados anteriormente pueden ser manipulados en el laboratorio trabajando con sistemas modelos y hacer que la velocidad de la reacción sea controlable. Sin embargo, dada la complejidad química que presentan los alimentos, en un ambiente real sólo es posible modificarlos moderadamente (Labuza and Schmidl, 1986). La reducción del pH, de la temperatura y de la actividad del agua inhibe la reacción considerablemente, aunque en ocasiones lograrlo resulta imposible, técnica y económicamente.

Antiguamente, una de las formas más comunes para controlar la reacción de pardeamiento consistía en la adición de sulfitos, metabisulfitos o anhídrido sulfuroso; sin embargo, los cambios en la legislación de diferentes países, provocados por los efectos adversos de

los sulfitos y compuestos similares, han obstaculizado el uso de los sulfitos, provocando la búsqueda de otras alternativas.

Existen muchos compuestos que inhiben el mecanismo de la reacción de Maillard en ensayos de laboratorio, por ejemplo los cianuros, la hidroxilamina, las hidracinas, los mercaptanos, los bromuros y las sales de estaño. Sin embargo, son muy tóxicos o confieren olores indeseables.

Un método adecuado para el control es la optimización de los procesos térmicos. Para evitar la activación energética de las reacciones implicadas en los fenómenos de pardeamiento, es una medida aconsejable trabajar con tratamientos térmicos poco intensos y conservar el alimento en almacenes a temperaturas moderadas (Badui, 2006).

Para evitar los fenómenos de pardeamiento existen casos de alimentos en los que es posible eliminar el monosacárido presente, como ocurre en la elaboración de huevos desecados en los que la poca glucosa contenida en el huevo se oxida por medio de la enzima glucosa oxidasa a ácido glucónico, o bien se elimina por fermentación. En el caso de las patatas se puede conseguir, mediante un almacenamiento a 20°C durante dos semanas, un proceso conocido con el nombre de reacondicionamiento. Por otro lado, la conversión del grupo amino en la función amida por la actividad de enzimas transglutaminasas permite impedir que se pueda producir la primera etapa de la alteración (Bello Gutiérrez, 2000).

### **2.1.3.5. Consecuencias del desarrollo de la reacción de Maillard en alimentos y efectos de su consumo**

Se han estudiado distintas propiedades de los productos de la reacción de Maillard alimentarios:

- Poder quelante, en el café (Homma et al., 1986; Homma and Murata, 2001) y tostadas (Rendleman, 1987).
- Capacidad antioxidante, en el café (Borrelli et al., 2002), pan (Borrelli and Fogliano, 2005), galletas (Martín et al, 2009) y patatas fritas (Serpen et al., 2007).
- Potencial prebiótico de la corteza de pan (Borrelli and Fogliano, 2005).

Por todo ello parece evidente que el consumo de estos compuestos puede acarrear consecuencias beneficiosas y perjudiciales.

#### **A. Efectos negativos**

##### **A.1. Reducción del valor nutritivo**

Tal y como se ha comentado anteriormente, la reacción de Maillard puede dañar seriamente el valor nutricional de los alimentos a través de la destrucción de aminoácidos esenciales y de la producción de compuestos antinutritivos y tóxicos, así como la inhibición de diversos enzimas necesarios para realizar la digestión de los alimentos.

## **A.2. Aparición de sustancias con actividad mutagénica y/o carcinogénica.**

El tratamiento térmico es muy común durante el procesado y/o cocinado, así como durante la conservación de los alimentos. Los tratamientos térmicos de esterilización, fritura, tostado, horneado, etc. alcanzan temperaturas de hasta 220°C. Estos procesos llevan intrínsecos una serie de transformaciones en el alimento que conducen a la formación de nuevos compuestos que inciden, de manera general, en la aceptabilidad del producto por el consumidor. Sin embargo, en algunos casos, el empleo de altas temperaturas, en combinación con otros factores externos al alimento, puede dar lugar a la formación de algunos compuestos tóxicos que reduzcan el valor biológico, incidiendo en la seguridad de los mismos. Estas sustancias químicas se denominan contaminantes químicos de procesado. Los contaminantes químicos de procesado son compuestos que no estaban presentes en el alimento fresco y que su génesis está directamente relacionada con el proceso tecnológico y/o culinario aplicado. La mayoría de estos compuestos están relacionados con actividades mutagénicas, teratogénicas, carcinogénicas, etc., en organismos vivos y por ello debe de evaluarse y, si es necesario, ejercer las medidas de control necesarias por parte de las Agencias de Seguridad Alimentaria estatales correspondientes. Se conocen una serie de contaminantes químicos de procesado como son las aminas heterocíclicas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (ej. benzopireno), N-nitrosaminas, monocloropropanodiolos (ej. 3-MCPD),

furano y recientemente y de gran importancia acrilamida e hidroximetilfurfural.

### Acrilamida

En Abril de 2002, la Agencia Sueca de Seguridad Alimentaria informó de los altos niveles de acrilamida detectados en diversos alimentos fritos de alto consumo en la dieta occidental (Tareke et al., 2002). Los niveles excedían ampliamente las recomendaciones de 0.5 µg/kg de la OMS (OMS, 1996) para agua de consumo y de los 10 µg/kg de la legislación europea sobre migración química en envolturas plásticas (E.C. Commission Directive 92/39/EEC). Estos resultados fueron rápidamente confirmados por diversas agencias de seguridad alimentarias y organismos mundiales de control alimentario. La acrilamida ha sido definida por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como un probable agente carcinogénico para humanos (IARC, 1994).

Hasta la fecha diversos mecanismos teóricos han sido propuestos para explicar la formación de acrilamida en los alimentos procesados térmicamente (Mottram et al., 2002; Stadler et al., 2002; Zyzak et al., 2003). Las investigaciones apuntan a que muy probablemente la acrilamida se forme mayoritariamente a partir de la reacción de Maillard, donde la asparragina sea el principal reactante en sistemas ricos en carbohidratos. En concreto, el contenido en asparragina representa el 40% del total de aminoácidos de la patata, lo que hace a

esta matriz especialmente sensible (Martín and Ames, 2001). De hecho las matrices alimentarias ricas en carbohidratos, como los derivados de la patata, eran las que presentaban mayores niveles de acrilamida en los estudios iniciales de la Agencia Sueca. Diferentes organismos internacionales pusieron su atención en evaluar la incidencia de la presencia de acrilamida en la dieta y, concretamente, su relación con el consumo de patatas fritas.

### Hidroximetilfurfural

El hidroximetilfurfural (HMF) es un compuesto que se forma en grandes cantidades a partir del procesado térmico de los alimentos. Uno de sus metabolitos, el sulfoximetilfurfural (SMF) posee una actividad mutagénica y nefrotóxica bastante elevada, aunque hasta la fecha no se ha podido evidenciar su formación *in vivo*. El HMF está presente en niveles altos en muchos alimentos, encontrando concentraciones particularmente altas (hasta 9,5 g/Kg) en vinos dulces y vinagre balsámico (Bachmann et al., 1997; Hussoy et al., 2008). Sin embargo, el café es la mayor fuente de exposición en muchas personas debido a las grandes cantidades consumidas de este alimento (Murkovic and Pichler, 2006). La ingesta diaria estimada de HMF oscila entre los 30-150 mg/persona (Ulbricht et al., 1984; Janzowski et al., 2000; Rufián-Henares and de la Cueva, 2008).

Aunque el HMF es inactivo en los test estándares de evaluación genotóxica (Janzowski et al., 2000; Glatt and Sommer, 2006), se ha

observado que la administración de concentraciones altas de HMF a ratas induce y promueve la formación de lesiones preneoplásicas en diferentes órganos (Zhang et al., 1993). Así mismo, en un estudio realizado a través del Programa Nacional de Toxicología de los EE.UU. se ha visto que incrementa la incidencia de adenomas hepatocelulares en ratones hembra. Diversos estudios han mostrado que el HMF sufre una activación metabólica hasta un éster alílico conocido como SMF gracias a la acción de las sulfotransferasas, enzimas que se ignoran en los test de genotoxicidad estándares. El SMF, al contrario que el HMF, forma aductos de ADN y se muestra carcinogénico a nivel hepático sin requerir un sistema activador (Glatt and Sommer, 2006; Surh et al., 1994). Recientemente se ha observado que el SMF es nefrotóxico (Nadiya et al., 2009), ya que se produce una reabsorción tubular que conduce a necrosis y agregados proteicos en los túbulos proximales.

## **B. Efectos positivos**

### **B.1. Actividad antioxidante**

Una de las características positivas más conocidas de la reacción de Maillard es su acción antioxidante, ya que algunos de los compuestos generados tienen propiedades antioxidantes. En los últimos años se ha incrementado el estudio de las diferentes propiedades funcionales de las melanoidinas. Su actividad antioxidante resulta especialmente interesante ya que se forman de manera natural en el alimento durante su procesado o su almacenamiento (Bendinghaus and Ockerman, 1995).



Las melanoidinas pueden llevar ligados compuestos de bajo peso molecular, unidos a su esqueleto de manera no covalente y que normalmente ocupan el centro de la estructura melanoidínica (Cammerer et al., 2002; Delgado-Andrade et al., 2005). En un estudio reciente (Rufián-Henares and Morales, 2007) donde se pretendía conocer la actividad antioxidante de las distintas fracciones de las melanoidinas usando diferentes sistemas modelo azúcar- aminoácido, se observó que los compuestos de bajo peso molecular unidos a las melanoidinas tenían una actividad antioxidante mayor que las propias melanoidinas. Así ensayos de ABTS y DPPH de este estudio muestran que la actividad antioxidante de los compuestos unidos a las melanoidinas es mayor que la de las propias melanoidinas.

El mecanismo de la actividad antioxidante de estas melanoidinas no se conoce muy bien, pero se cree que se basa en la habilidad para atrapar las especies electrofílicas cargadas positivamente, en la eliminación de los radicales de oxígeno y/o la quelación de metales para formar complejos inactivos (Delgado-Andrade et al., 2005).

## **B.2. Efecto antimutagénico**

Debe hacerse referencia también al efecto antimutagénico de los compuestos de Maillard, bien por las modificaciones químicas o enzimáticas que inducen o por su efecto supresor de las alteraciones sobre el DNA inducidas por agentes mutágenos (Kada et al., 1985).

### B.3. Acción antimicrobiana

En ciertos productos de la reacción de Maillard se ha manifestado una acción antimicrobiana. Las experiencias de Einarsson (1987) mostraron que 20 géneros distintos de bacterias disminuían o inhibían su tasa de crecimiento en presencia de los productos de la reacción de Maillard (PRMs) originados de diversas maneras. En ensayos posteriores, Einarsson and Eriksson (1990) compararon este efecto antibacteriano con el del ácido sórbico a distintos niveles de pH y temperatura. Los resultados mostraron la gran influencia de estos parámetros en la eficacia de la acción antibiótica. Más recientemente, Rufián-Henares and Morales (2008) han encontrado que las melanoidinas presentes en alimentos como la cerveza y galletas pero sobre todo las melanoidinas del café, tienen acción bacteriostática y bactericida, en función de la concentración que se utilicen. Esta acción antimicrobiana se ha puesto de manifiesto con distintos tipos de bacterias, ya sean *Gram +* o *Gram -* como por ejemplo las especies *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El mecanismo de acción por el que las melanoidinas ejercen acción bactericida se debe a que estas melanoidinas son capaces de quelar iones  $Mg^{+2}$  presentes en la membrana de las bacterias, éstas se desestabilizan y mueren (Rufián-Henares and Morales, 2008). En el caso de la acción bacteriostática existen dos mecanismos de acción: por un lado, las melanoidinas son capaces de quelar el hierro necesario para el metabolismo bioquímico de las bacterias y por otro lado, las melanoidinas son capaces de quelar

los sideróforos que sintetizan algunas bacterias ante la falta de hierro. De esta forma, en ambos casos se detiene el crecimiento bacteriano (de la Cueva and Rufián-Henares, 2009).

#### **B.4. Carácter antialérgico**

Algunos productos intermediarios de la reacción de Maillard tienen acción antialérgica, tal es el caso de la base de Schiff formada durante el primer escalón de la reacción y que es biológicamente disponible. Esto se apoya en que unas condiciones suaves de calentamiento de los alimentos ricos en proteínas y carbohidratos pueden reducir la antigenicidad y posiblemente modificar la respuesta alérgica (Friedman, 1996) aunque debe también apuntarse que tales reacciones son capaces de introducir nuevos determinantes antigénicos dentro de la proteína alimentaria (Laligant et al., 1995).

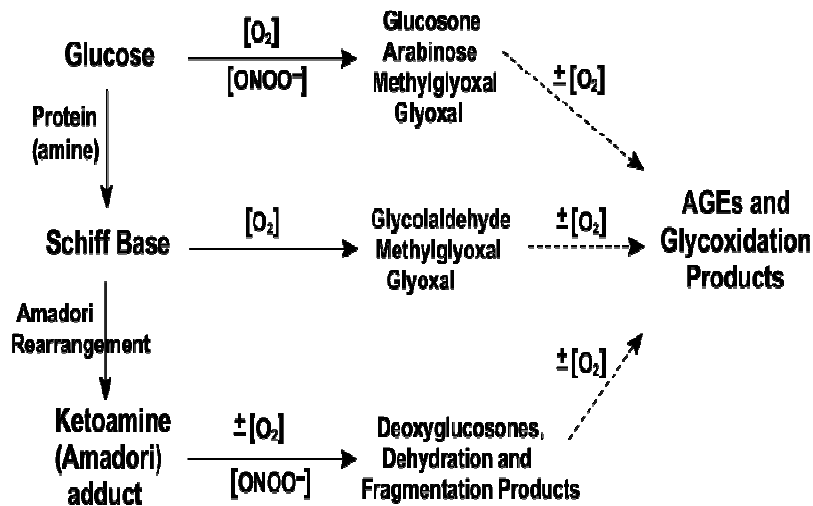
Queda patente que la mayor parte de los efectos se refieren a alimentos aislados pero poco se sabe de la ingesta total de estos compuestos en la población ni de los efectos nutritivos y fisiológicos globales de su consumo. Esta situación debería investigarse para tratar de conocer mejor los aspectos positivos y negativos de su ingesta sobretodo porque en la actualidad los hábitos de consumo, especialmente en jóvenes que se alimentan de snacks y fast-food, se basa en el consumo de alimentos con gran contenido en estos compuestos, en detrimento de los alimentos tradicionales (Amorin, 2000; Serra-Majem et al., 2002).

#### 2.1.4. COMPUESTOS AVANZADOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD-AGEs

Los **compuestos avanzados de la reacción de Maillard** son aquellos que se forman durante el procesado térmico y almacenamiento de los alimentos, pero que también se conocen con el nombre de compuestos avanzados de glicosilación (**AGEs**) cuando se forman en el organismo humano. Los AGEs que se forman en el organismo por el estrés oxidativo fueron descritos en la literatura científica a principio de los años 80 del pasado siglo en pacientes diabéticos (Brownlee et al., 1984) encontrando una relación entre el contenido de AGEs en plasma y tejidos y el avance de patologías asociadas con el desarrollo de la diabetes como cataratas, nefropatía diabética, inflamación crónica, enfermedad de Alzheimer o cáncer (Ishiguro et al., 2005; Ramasamy et al., 2005a, 2005b; Thornalley, 1999; Valente et al., 2010; Abraham et al., 1989; Makita et al., 1991). Estos efectos se deben a la interacción de los AGEs con un receptor específico para ellos conocido como **RAGE** (Chavakis et al., 2003). Por ejemplo, la CML (carboximetilisina) y CEL (carboxietilisina) presentes en tejidos y plasma sanguíneo son dos de los ligandos fisiológicos del RAGE.

La **formación** de estos compuestos avanzados de la reacción de Maillard o AGEs se produce por la reacción entre las cadenas laterales de los aminoácidos esenciales lisina y arginina y los grupos 1,2-dicarbonilos (glioxal, metilglioxal, etc.) procedentes bien de la oxidación de los productos de Amadori (Hodge, 1953) como de la base de Schiff

(Hayashi and Namiki, 1986) o directamente de la autooxidación de hidratos de carbono como la glucosa (Wolff and Dean, 1987) tal y como se observa en la *figura 2*.



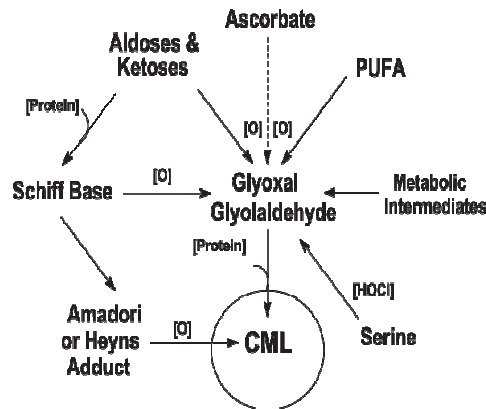
**Figura 2.** Rutas metabólicas de formación de AGEs a partir de glucosa

Existe una gran cantidad de publicaciones sobre los AGEs pero en realidad son pocos los compuestos que se han podido identificar y cuantificar, señalando entre ellos la carboximetilisina, pirralina, pronillisina y pentosidina.

#### 2.1.4.1. Carboximetilisina y otros AGEs

El primer compuesto avanzado de la reacción de Maillard detectado en los alimentos fue la **N-ε-carboximetilisina** (Hartkopf and Erbersdobler, 1994; Drusch et al., 1999). La **CML** se forma en su mayor parte por la oxidación de los productos de Amadori (entre un 3 - 10% de

ellos se oxida hasta CML) aunque también es posible por otros mecanismos (Ahmed et al., 1986; Fu et al., 1996) como la oxidación de compuestos dicarbonílicos (glioxal, metilglioxal) provenientes de la oxidación de las bases de Schiff, de la oxidación de monosacáridos (aldosas, cetosas), de la oxidación del ácido ascórbico, de la peroxidación lipídica e incluso de la degradación de aminoácidos como la serina (figura 3).



**Figura 3.** Rutas metabólicas de formación de CML in vivo.

La **pirralina** es otro AGE y se forma por la reacción del grupo amino de la lisina y la 3-deoxigluculosa. La pirralina se ha identificado y cuantificado en productos de panadería, leche y pasta (Henle and klostermeyer, 1993; Henle et al., 1994; Resmini and Pellegrino, 1994; Rufián-Henares et al., 2004). Se ha encontrado en concentraciones de 150 mg/Kg en leche esterilizada y 3700 mg/Kg en productos de panadería, por lo que la pirralina es uno de los AGEs que más predomina en los alimentos. La **pronillisina** es otro producto avanzado

de la reacción de Maillard que se forma al reaccionar las cadenas laterales de la lisina y el acetilformol en cantidades de 60 y 6 mg/Kg en la corteza y en la miga del pan, respectivamente (Lindenmeier et al., 2002; Lindenmeier and Hofmann, 2004). La **pentosidina** es otro AGE que ha sido identificado en hidrolizados de colágeno humano, aunque también se forma en alimentos sometidos a un tratamiento térmico severo por el entrecruzamiento entre los aminoácidos lisina y arginina (Henle et al., 1997)

En general, se puede decir que la presencia de compuestos de la reacción de Maillard en nuestra dieta oscila entre 1000-2000  $\mu$ moles de productos de Amadori y de 100-150  $\mu$ moles productos avanzados de la reacción de Maillard, concretamente CML y pirralina (Henle and Miyata, 2003). Así, la ingesta de CML diaria oscila entre los 80 y 250  $\mu$ g/Kg peso/día para dietas poco o muy procesadas térmicamente (Tessier and Birlouez-Aragón, 2012) lo que supone una ingesta entre 5 y 11 mg/día para adolescentes (Delgado-Andrade et al., 2012). Los alimentos que más aportarían dichos compuestos a la dieta habitual de los países industrializados serían los productos de panadería y el café. Recientemente se ha demostrado que los AGEs son parcialmente absorbidos e incorporados en la circulación sanguínea (Sebeková and Somoza, 2007; Delgado-Andrade et al., 2012).

Existen evidencias a favor del concepto de que una ingesta exagerada de alimentos procesados térmicamente podrían inducir rutas patogénicas o agravar unas patologías preexistentes "in vivo". Esta

hipótesis la avalan estudios experimentales realizados con ratas, humanos sanos o aquellos que presentan determinadas patologías como diabetes mellitus e insuficiencia renal crónica, en los que se ha llegado a la conclusión de que una ingesta exagerada de alimentos sometidos a un tratamiento térmico severo ejerce un efecto diabotogénico y nefrotóxico (Peppas et al., 2003), induce inflamación de bajo nivel (Vlassara et al., 2002), estrés oxidativo (Uribarri et al., 2005) y aterosclerosis (Peppas et al., 2004). Sin embargo, estos datos solo se pueden confirmar para alimentos sometidos a un tratamiento térmico pero no para un compuesto químico en concreto como los AGEs, por lo que sería importante determinar el contenido de AGEs en dichos alimentos.

Hay grupos de investigación que avalan que los AGEs tienen efectos beneficiosos para la salud, éstos se basan en que la biodisponibilidad de los AGEs es baja. Prácticamente el 80% de los productos de Amadori no se absorben y además, son degradados por la microbiota intestinal (Hultsch et al., 2006). Así, la mayor parte de los AGEs que se forman en los alimentos procesados térmicamente se absorberían y excretarían rápidamente por el riñón (Faist et al., 2000) y por las heces (Delgado-Andrade et al., 2012). En numerosas publicaciones se ha puesto de manifiesto que los productos de la reacción de Maillard no son perjudiciales, sino incluso beneficiosos para la salud ya que presentan actividad antioxidante *in vitro* (Borrelli et al., 2002; Dittrich et al., 2003; Shizuuchi and Hayase, 2003; Daglia et al.,



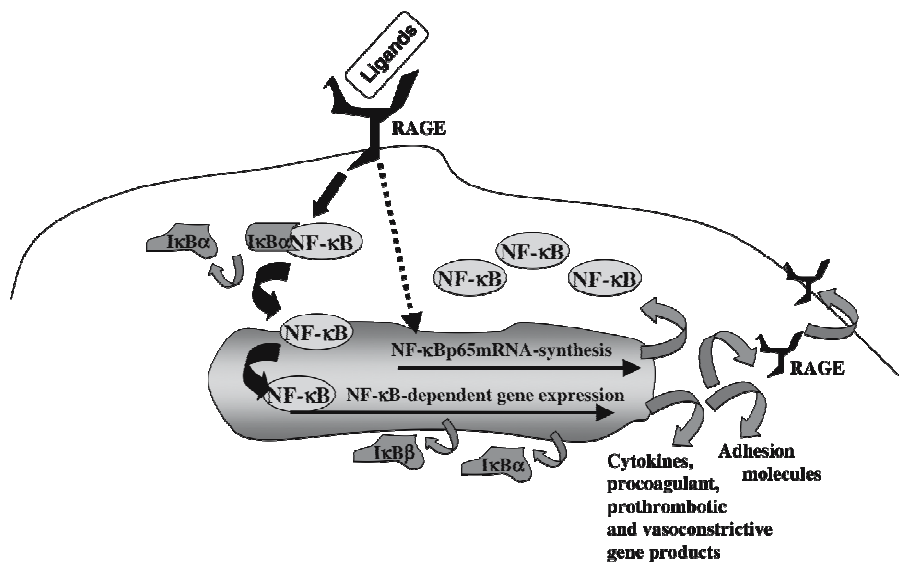
2004) e *in vivo* (Lindenmeier et al., 2002). De esta forma, en un estudio con 312 pacientes sometidos a hemodiálisis se observó que los niveles de AGEs no incrementaban su mortalidad (Schwedler et al., 2002).

#### **2.1.4.2. Carboximetilisina-receptor RAGE**

La **carboximetilisina (CML)** es un producto avanzado de la reacción de Maillard que se forma tras el tratamiento térmico y almacenamiento de los alimentos y en el cuerpo humano por el estrés oxidativo. Esta CML es capaz de unirse a un receptor específico conocido con el nombre de RAGE. Este receptor para los compuestos avanzados de la reacción de Maillard (cuando el AGE se forma en los alimentos) o de glicosilación (cuando el AGE se forma en el cuerpo humano) se trata de una proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuyo gen está localizado en el cromosoma 6 cerca del locus HLA y próximo al MHC III (Thornalley, 1998). Está compuesto por tres regiones: dominio V y dos dominios C, donde uno de ellos es un dominio transmembrana y el otro un tallo citoplasmático de 43 aminoácidos. Es el dominio V el principal área donde se une los ligandos (Xie et al., 2008) siendo la parte citoplasmática crítica para la señalización celular. Este receptor se expresa durante las primeras etapas embrionarias y sus niveles descienden en la edad adulta.

La interacción AGE-RAGE produce una respuesta proinflamatoria en diferentes tipos de células ya sean endoteliales, musculares o fagocitos mononucleares (Kambham et al., 1999). Esta respuesta está

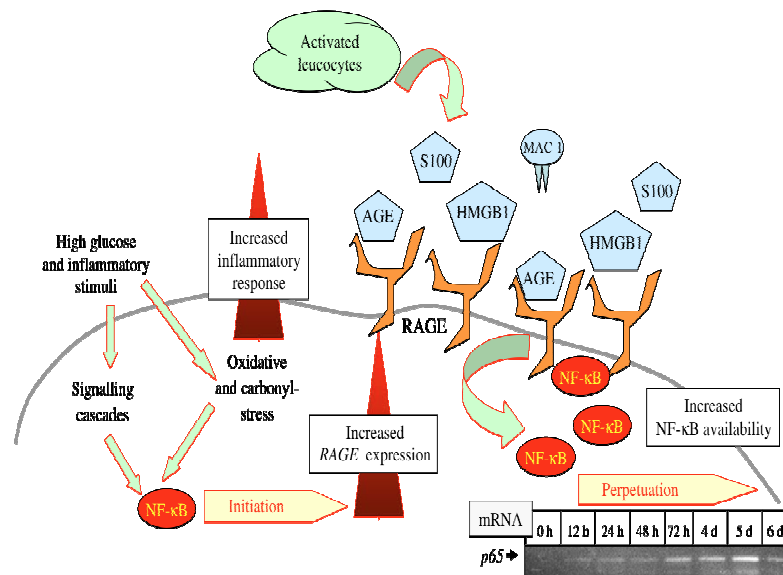
mediada por el factor nuclear NF $\kappa$ B con la consecuente expresión de citoquinas como primera línea de la defensa celular (Bierhaus et al., 2001). En las células en reposo, el factor nuclear NF $\kappa$ B está en el citoplasma en su forma inactiva, ya que se encuentra unido a una molécula inhibitoria llamada IK $\beta$  $\alpha$  (Barnes and Karin, 1997). Al activarse el factor nuclear NF $\kappa$ B la molécula IK $\beta$  $\alpha$  se fosforila, degradándose rápidamente y originando la liberación y translocación del factor nuclear NF $\kappa$ B. Una vez en interior del núcleo, el factor nuclear NF $\kappa$ B se une al ADN y activa la transcripción de aquellos genes que regula, tales como la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL6 o el TNF $\alpha$ , moléculas de adhesión, el IK $\beta$  $\alpha$  y el propio RAGE (Barnes and Karin, 1997; Bierhaus et al., 2000) como se observa en la *figura 4*.



**Figura 4.** Inducción del RAGE mediante activación.

Una de las características principales de la activación del RAGE es que se prolonga a lo largo del tiempo, lo que sobrepasa las vías endógenas autorregulatorias de inhibición (Bierhaus et al., 2005). Esto tiene lugar por un lado, porque los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  sintetizada no son suficientes para desactivar todo el factor nuclear NF $\kappa$ B que se está produciendo y por otro lado, se produce una mayor expresión del receptor RAGE que hace que se perpetúe su activación por otras moléculas extracelulares.

En cuanto al papel del receptor RAGE en la EII, se ha observado que esta inflamación está mediada, en parte, por la activación sostenida de la transcripción del NF $\kappa$ B (Ellis et al., 1997; Thiele et al., 1999). Sin embargo, lo que es menos conocido es el mecanismo por el cual las citoquinas proinflamatorias, ROS y metabolitos del ácido araquidónico producen un estímulo inflamatorio sostenido en el tiempo y que da lugar a la activación duradera del NF $\kappa$ B (Bierhaus and Nawroth, 2003; Mercurio and Manning, 1999). Las citoquinas y la activación del NF $\kappa$ B mediada por citoquinas juegan un papel crucial tanto en la iniciación como en la terminación de la inflamación (Lawrence et al., 2001). Esto implica la existencia de otras rutas adicionales capaces de convertir la activación de corta duración del NF $\kappa$ B mediante especies reactivas del oxígeno o citoquinas en una inflamación sostenida en el tiempo (*figura 5*).



**Figura 5.** Perpetuación de la activación del NFκB.

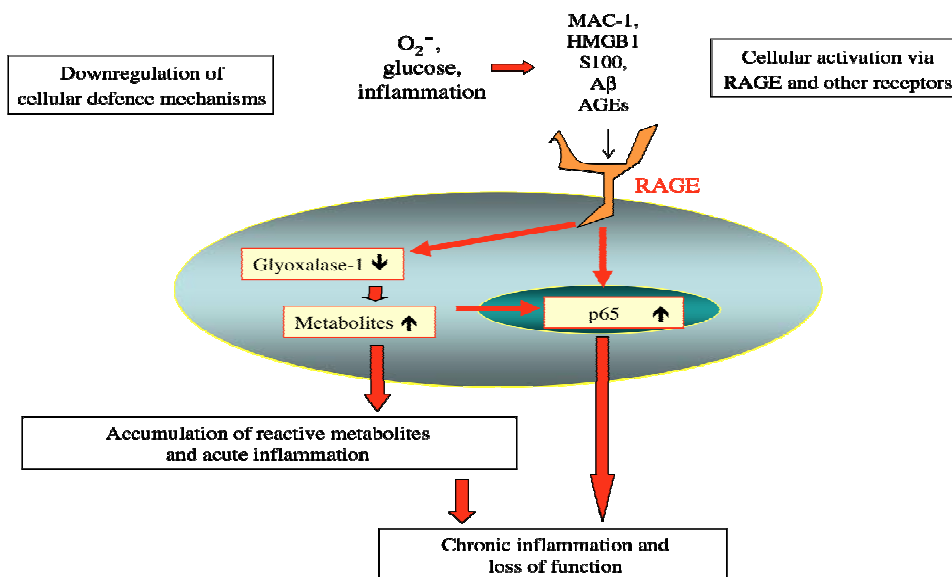
Un mecanismo que podría explicar este hecho podría ser las modificaciones postranslacionales de las proteínas, las cuales originarían la formación de ligandos que se degradan lentamente y que a su vez darían lugar a una activación duradera en el tiempo. Una de estas modificaciones postranslacionales de las proteínas sería la formación de CML ya que se conoce que ésta se forma en lesiones inflamatorias y donde existe un estrés oxidativo (Baynes and Thorpe, 1999; Schleicher et al., 1997). La activación del NFκB mediada por el RAGE al prolongarse en el tiempo, es capaz de saturar los mecanismos feedback inhibitorios que posee el organismo y de esta forma producir una activación del NFκB duradera en el tiempo (Bierhaus et al., 2001). Como la expresión

del RAGE está inducida por el NFκB, la activación sostenida de éste en el tiempo produce una sobrerregulación de su receptor, lo que asegura el mantenimiento y amplificación de la señal proinflamatoria (Li and Schmidt, 1997). Un estudio de Bierhaus y colaboradores pone de manifiesto que las proteínas modificadas con CML contribuyen en la perpetuación de la respuesta proinflamatoria. Estas modificaciones ocurrirían principalmente en medio ambiente caracterizado por un estrés oxidativo. En casos de inflamación como la EII se ha encontrado gran cantidad de neutrófilos, los cuales producen glicolaldehidos y otros reactivos aldehídos, por la acción de la mieloperoxidasa, responsables de la formación de CML en lugares de inflamación (Anderson et al., 1999). A su vez estos autores observaron que la eliminación del RAGE en ratones solo atenuaba parcialmente la respuesta que desencadenaba la producción de proteínas modificadas con CML (Kislinger et al., 1999). Esto indica que deben existir otros receptores celulares capaces de reconocer estas modificaciones postranslacionales de las proteínas con CML y que participen en los efectos de la CML. Así, estos autores proponen un modelo de inflamación crónica en dos etapas:

- En primer lugar, se produciría una acumulación de CML y otro tipo de modificaciones postranslacionales en las proteínas. Estas modificaciones se producirían por el estrés oxidativo que se produce debido a unos mecanismos proinflamatorios
- En segundo lugar, la inflamación se dispararía cuando los receptores celulares como el RAGE interactúan con las

modificaciones postranslacionales de las proteínas (Kislinger et al., 1999; Hofmann et al., 1999; Schmidt et al., 2000; Morcos et al., 2002; Stern et al., 2002; Nawroth et al., 2005; Haslbeck et al., 2005).

Esta teoría extiende el concepto de inflamación, que clásicamente consiste en la síntesis de novo de citoquinas y la liberación de metabolitos del ácido araquidónico hacia la generación de modificaciones postranslacionales de proteínas tal y como se observa en la *figura 6*.



**Figura 6.** Relación del RAGE con rutas proinflamatorias.

## 2.2. PATOLOGÍA INTESTINAL

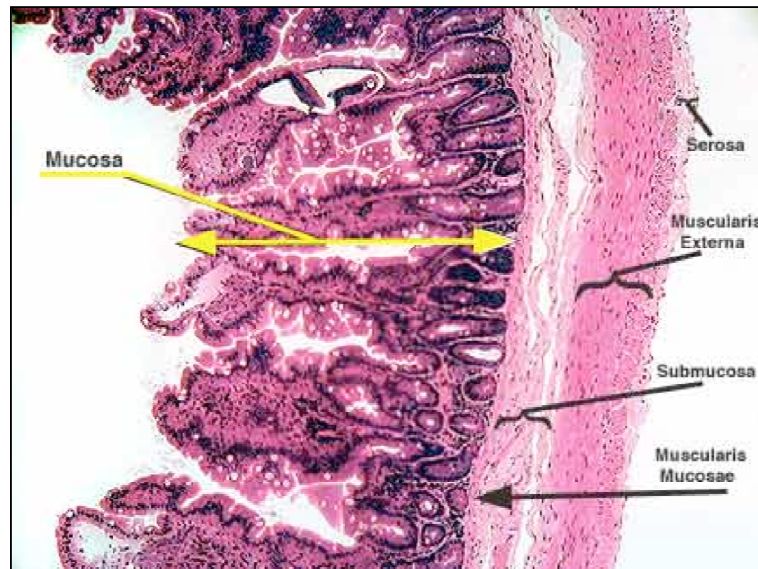
### 2.2.1. INTESTINO

El intestino humano es un órgano complejo de longitud variable, oscila entre 3 y 8 m, dependiendo de características individuales y de las técnicas empleadas en su medida (radiológicas, quirúrgicas, post-mortem), con una especialización bien definida desde el punto de vista morfológico y funcional en intestino delgado y grueso. La función principal del intestino es conseguir una adecuada incorporación de nutrientes al organismo y esto se lleva a cabo a través de los procesos de digestión y absorción de los nutrientes, que se producen básicamente en el intestino delgado y con una absorción específica según nutrientes y tramo intestinal. Una característica fundamental de este órgano es la morfología del epitelio intestinal con el aumento de la superficie de absorción gracias a la especialización de la mucosa en pliegues circulares, éstos en vellosidades intestinales y la membrana apical del enterocito en microvellosidades, multiplicándose de esta manera la superficie de absorción hasta llegar a los 200 m<sup>2</sup>.

#### 2.2.1.1. Anatomía y funciones del intestino

El intestino maduro consiste en un conducto muscular revestido de membrana mucosa. Se divide longitudinalmente en duodeno, yeyuno, íleon (formando el **intestino delgado**), ciego, colon, recto y conducto anal (formando el **intestino grueso**). En el tubo digestivo se distinguen cuatro capas: **capa mucosa, capa submucosa, capa muscular**

y **capa adventicia o serosa**. Todas ellas son semejantes en toda su extensión excepto la capa mucosa, que varía mucho según las zonas (*figura 7*).



**Figura 7.** Sección transversal del intestino

La **capa mucosa** tiene una alta proporción de tejido linfoide que se localiza en tres compartimentos diferenciados: estructuras organizadas (placas de Peyer y folículos linfoides), lámina propia y epitelio superficial. La **capa submucosa** está constituida por colágeno laxo y sirve de sostén a la mucosa, alojando los vasos sanguíneos y linfáticos y un plexo nervioso. La **capa muscular** está formada por músculo liso organizado a su vez en dos capas, una interna circular y otra externa longitudinal. La **capa adventicia o serosa** es la capa más

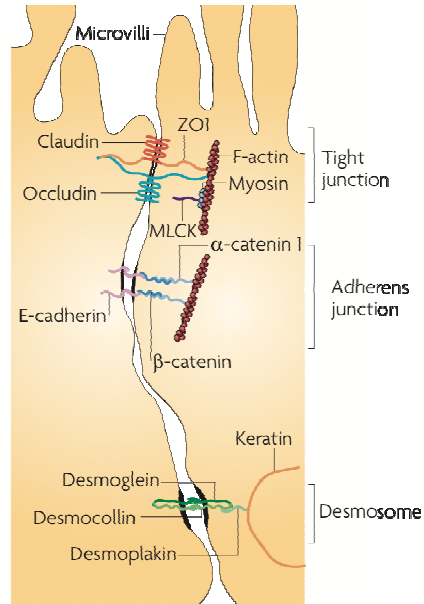


externa, sirve de sostén y donde se alojan los vasos sanguíneos principales y nervios.

Las células intestinales se diferencian principalmente en tres tipos: **enterocitos, células de Goblet y células enteroendocrinas**. En el intestino delgado existen también las **células de Paneth** y en algunas criptas se forman además las **células M** (Marhman et al., 2002).

Los **enterocitos** son las células mayoritarias de la mucosa. Son células polarizadas cuya membrana apical presenta pequeñas proyecciones llamadas microvellosidades (borde en cepillo) y están unidas por fuertes uniones intercelulares. Su principal función es la absorción de nutrientes y el transporte de agua y electrolitos, especialmente en el colon, aunque también están implicadas en la presentación de antígenos y en la producción de citoquinas (Mayer, 2000). También producen enzimas hidrolíticas como la lactasa y la sacaraisomaltasa. La unión entre los enterocitos se realiza a través de las *tight junctions*, espacios intercelulares por donde pueden difundir el agua y solutos como nutrientes, citoquinas y productos bacterianos. Estas *tight junctions* se localizan por debajo de las microvellosidades y están compuestas por proteínas transmembrana (como son las claudinas y ocludinas) y proteínas intercelulares como las zona-occludens 1 (ZO1), F-actinas y miosinas (Turner, 2009). Por debajo de estas *tight junctions* y unidas a través de la Myosin Light Chain Kinase (MLCK) se localiza las adherens junctions, formadas por las proteínas E-caderina,  $\alpha$ -catenina 1 y  $\beta$ -catenina. Finalmente, por debajo de las

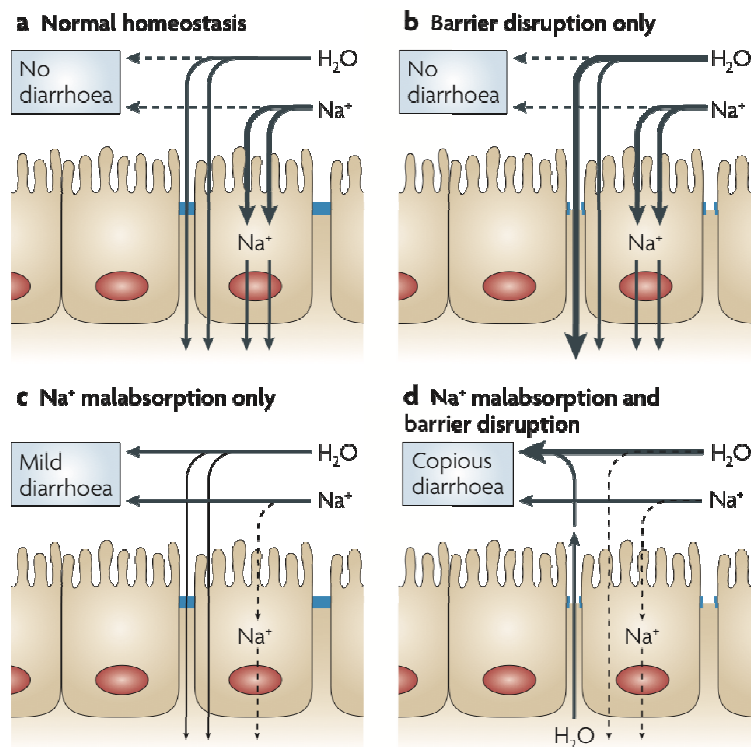
adherens junctions se localizan los desmosomas, estructuras formadas por las proteínas desmogleina, desmocolina, desmoplaquina y diversos filamentos de queratina (*figura 8*).



**Figura 8.** Tipo de uniones del epitelio intestinal

Las *tight junctions* tienen como papel principal la regulación de la permeabilidad de la barrera intestinal. Al menos existen dos rutas que permiten el transporte a través de las *tight junctions*, una la ruta paracelular, que es la que determina la permeabilidad de la mucosa y otra, la ruta transcelular (*figura 9*), estando cada una de ellas regulada de forma independiente (Fihn et al., 2000; Van Itallie et al., 2008; Watson et al., 2005). La ruta paracelular permite el transporte paracelular de grandes solutos incluyendo el flujo limitado de proteínas y lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Van Itallie et al., 2008; Watson et al.,

2005). Esta ruta no tiene selectividad de carga y el flujo a través de ella se incrementa *in vitro* mediante citoquinas como el interferon gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral ( $\text{TNF}\alpha$ ) *in vitro* e *in vivo* (Watson et al., 2005; Clayburgh et al., 2006). La ruta transcelular está caracterizada por pequeños poros definidos por las claudinas. Estos poros excluyen moléculas mayores de 4 amstron y sí presentan selectividad de carga (Amasheh et al., 2002; Simon et al., 1999).



**Figura 9.** Coordinación entre el transporte paracelular y transcelular.

Las **células de Goblet** o también llamadas **caliciformes** se encargan de producir las mucinas que recubren todo el epitelio intestinal y forman un gel que constituye un mecanismo de barrera frente a antígenos patógenos (Johansson et al., 2008). La MUC2 es la mucina más abundante del mucus intestinal. En modelos con ratas mutaciones en MUC2 desarrollan inflamación crónica en el intestino distal similar a la colitis ulcerosa en humanos. En éstos, las células de Goblet sufren una mucodeplección a nivel histopatológico (Gersemann et al., 2009). Esta mucodeplección parece estar asociada a la microbiota intestinal ya que los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y los productos de la fermentación microbiana modulan la expresión del gen MUC2 (Burger-van Paassen et al., 2009). El número de células varía gradualmente, desde un 5% en el intestino delgado hasta un 50% en el colon.

Las **células de Paneth** se encuentran en las criptas. Tienen un papel muy destacado en la defensa bacteriana por su producción de zinc y numerosas moléculas antimicrobianas como las lisozimas o las defensinas. La activación de estas células de Paneth se produce a través de los receptores TLRs impidiendo así la entrada de bacterias y patógenos (Vaishnava et al., 2008). Las defensinas son los péptidos antimicrobianos más abundantes y presentes en la patogénesis de la EII (Ramasundara et al., 2009), concretamente las células alpha defensinas y beta defensinas se han encontrado en niveles altos en pacientes con

enfermedad de Crohn (Wehkamp et al., 2005) y colitis ulcerosa, respectivamente (Fellermann et al., 2006).

**Las células M y células enteroendocrinas** son células epiteliales importantes como sensores del contenido luminal. Las **células M** están presentes en el intestino delgado sobre las placas de Peyer y poseen micropliegues en la superficie luminal, similares a las microvellosidades. Estas células carecen de glicocalix y están adaptadas para interactuar directamente con moléculas del lumen. Las células M expresan receptores TLR para las moléculas  $\alpha 5\beta 1$  integrinas y galactin-9 lo que facilita la captación y transporte de organismos infecciosos incluidos priones, virus y bacterias patógenas (Kyd and Cripps, 2008). Las **células enteroendocrinas** también están estratégicamente posicionadas para recibir señales, incluidos productos del metabolismo microbiano (factores que regulan la secreción de mucus, metabolismo energético y regulación de la motilidad intestinal). Así, en modelos de ratas con enteritis y colitis se han observado alteraciones en las células enteroendocrinas (Linden et al., 2005; O'Hara et al., 2006; Rubin et al., 2000) y también en pacientes con EII (El-Salhy et al., 1997). Aunque la células enteroendocrinas expresan receptores TLR (Bogunovic et al., 2007) su participación en el proceso inflamatorio, además de por la dieta y la estimulación microbiana, se debe a la secreción de citoquinas (Palazzo et al., 2007).

### 2.2.1.2. Intestino y sistema inmune

La principal función del intestino es la **digestión de los alimentos y absorción de nutrientes** pero también juega un papel muy importante en la **regulación inmune** tanto innata como adaptativa.

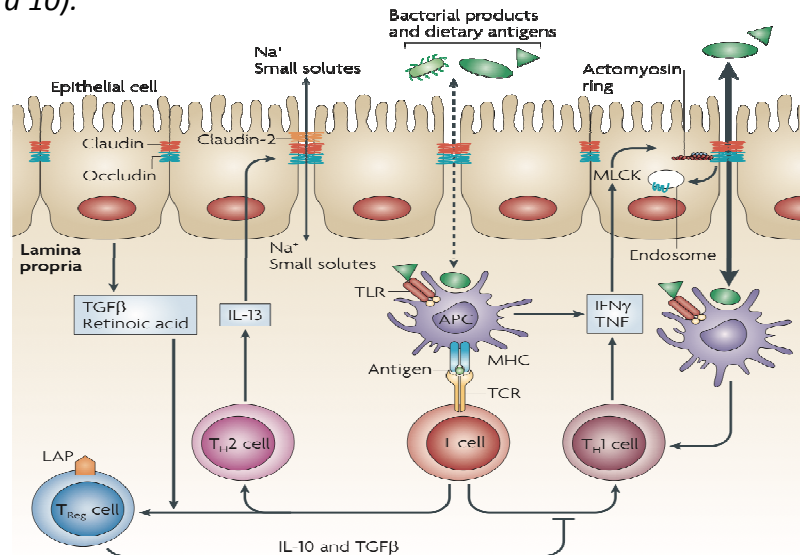
Las superficies mucosas del organismo son especialmente vulnerables a infecciones. Son barreras delgadas y permeables debido a sus funciones fisiológicas, como el intercambio de gases (pulmones), absorción de nutrientes (intestino), funciones secretoras (ojos) etc. La necesidad de que exista esta permeabilidad hace que sean muy susceptibles a infecciones. De hecho, la mayoría de los agentes infecciosos invaden al organismo a través de las mucosas (Bergelson, 2009; O'Hara and Buret, 2008). El intestino, además de estar expuesto a agentes externos, es extremadamente rico en bacterias comensales y está adaptado para funcionar bajo esa presión antigénica permanente. Estos estímulos ponen en marcha el MALT llamado tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*). El MALT está formado por tejido linfoide difuso (linfocitos intraepiteliales y células mononucleares de la lámina propia) y tejido nodular (placas de Peyer y nódulos linfáticos) y está implicado en el procesamiento de antígenos que interactúan con la mucosa intestinal, en la diseminación de la respuesta inmune, así como el mantenimiento de la función barrera que desempeña el epitelio intestinal.

La pérdida de la función barrera está asociada al riesgo de desarrollar patologías inflamatorias a nivel intestinal. Existen muchas

evidencias circunstanciales que sugieren que la disfunción de la barrera intestinal está asociada a la patogénesis de la EII. Se ha observado que muchos parientes de primer grado de pacientes con enfermedad de Crohn tienen aumentada la permeabilidad intestinal, aunque están completamente sanos (Hollander et al., 1986). Esta alteración puede deberse a cambios subclínicos del sistema inmune de la mucosa intestinal, posiblemente mediada por un incremento en la producción de TNF $\alpha$  y una disminución de la IL10 (Madsen et al., 1999; Olson et al., 2006). En este sentido, Irvine y Marshall (2000) documentaron el incremento de la permeabilidad intestinal 8 años antes del desarrollo de la patología en un pariente sano de un paciente con enfermedad de Crohn.

Existe otro estudio (Hollander, 1988) en el que se utilizaron ratones con una disfunción en la MALT, en el que se observaba que estos ratones desarrollan un incremento en la permeabilidad de las *tight junctions*, por lo que se sugiere que dicho incremento sería insuficiente para causar una patología intestinal en ausencia de una disfunción epitelial más extensa. Sin embargo, sí se observó la activación de las células inmunitarias de la mucosa epitelial, por lo que una disfunción de la barrera a nivel de las *tight junctions* podría ser un factor que contribuyera al desarrollo de la EII. Así, y en conexión con lo comentado anteriormente, un tanto por ciento de los parientes de primer grado de pacientes con enfermedad de Crohn desarrollaban la enfermedad. Ese mismo tanto por ciento es similar a la fracción de pacientes sanos que

tienen incrementada la permeabilidad intestinal. Finalmente, hay evidencias que sugieren que el incremento de la permeabilidad paracelular aumenta la actividad inmunológica de la mucosa dando lugar a una progresión de la patología e incrementando su severidad (figura 10).



**Figura 10.** Papel de las tight junctions y de la barrera epitelial sobre la homeostasis de la mucosa intestinal.

Todos los datos disponibles parecen indicar que la función barrera, a través de las *tight junctions*, integra la relación existente entre el material luminal y la función inmune de la mucosa. En muchos individuos existe una relación saludable que regula el incremento de la permeabilidad de las *tight junctions*, la cual dispara la liberación de citoquinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$  e IF $\gamma$  así como la respuesta inmunosupresora mediada por el TGF $\beta$  y el ácido retinoico (Coombes et



al., 2007; Mucida et al., 2007). Este balance precario entre respuesta proinflamatoria e inmunosupresora puede fallar si existe una respuesta exagerada a las citoquinas proinflamatorias, la cual se puede producir en pacientes que por diversas mutaciones tengan una insuficiente producción de IL10 o una inadecuada tolerancia inmunológica a los antígenos luminales y productos microbianos (Sartor, 2008). Como resultado, la activación inmunológica de la mucosa no se puede controlar, de forma que la liberación de citoquinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$  incrementan la pérdida de la función barrera, lo que hace que entre en contacto con más material luminal y de esta manera se perpetúe el ciclo proinflamatorio. Este modelo subraya que, el ser un paciente susceptible y el tener una función barrera defectuosa, son los componentes principales de la patogénesis de la EII y todo ello explica el papel crucial que tiene la barrera epitelial para modular la respuesta inmune de la mucosa intestinal.

## **2.2.2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

### **2.2.2.1. Aspectos generales**

La **enfermedad inflamatoria intestinal (EII)** es un grupo de enfermedades que cursan con inflamación crónica del tubo digestivo donde se incluyen la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). El curso clínico de estas patologías se caracteriza por periodos de actividad o brotes que se alternan con fases de remisión. La patogénesis es muy compleja y no del todo conocida, aunque se sabe que

intervienen tres elementos: susceptibilidad genética, microbiota intestinal y daño tisular mediado por una desregulación inmune. Se piensa que lo que ocurre es una pérdida de la tolerancia oral a los microorganismos comensales de la microbiota intestinal normal, es decir, microorganismos que en principio son inofensivos son los que desencadenarían la respuesta inmune descontrolada en personas con predisposición genética (Gassull, M.A et al., 2002).

#### **2.2.2.2. Epidemiología y calidad de vida**

La incidencia de la EII parece ir en aumento en países desarrollados. En España se estiman unas tasas en torno a 2 casos/año/105 habitantes en la EC y de 4 casos/año/105 habitantes para la CU, aunque con una importante variabilidad geográfica (García-Paredes and Mendoza, 2003; López San Román et al., 2004 ). Sin embargo, al ser estudios retrospectivos, es probable que esas tasas sean incluso mayores, y en total, se estiman que existen más de 100.000 casos de EII. Este incremento se asocia a una mejora en las condiciones de vida en los últimos años, lo cual pone de manifiesto que, no solo los factores genéticos sino que, los factores ambientales tienen un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad. La edad de inicio de la enfermedad suele estar entre los 15 y 40 años, con un segundo pico entre los 55 y 75 años y la frecuencia parece ser similar entre hombres y mujeres. La mortalidad asociada a la EII ha disminuido durante los últimos años, gracias a la aparición de nuevos tratamientos. En 1950, la

mortalidad de un brote grave en la CU oscilaba entre el 31 y el 61%, en 1960 disminuyó al 5-9% y en la actualidad se asume una mortalidad del 3%.

La calidad de vida de estos pacientes se ve gravemente afectada debido a las recaídas, síntomas impredecibles y hospitalizaciones frecuentes. Una de las complicaciones más serias de la EII, sobre todo de la CU es el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, que parece estar relacionado con la extensión y la duración de la enfermedad. La malnutrición es también frecuente debido sobre todo a una ingesta inadecuada, ya que el comer agrava los síntomas de la diarrea y el dolor abdominal. En niños y adolescentes es especialmente importante ya que puede causar alteraciones en el crecimiento. Además, aparte de los síntomas característicos de la EC y CU, alrededor del 25% de los pacientes presentan manifestaciones extraintestinales en diversos órganos, piel, articulaciones, ojos...

#### **2.2.2.3. Enfermedad de Crohn**

La EC es una enfermedad transmural que puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal, desde la cavidad bucal hasta el ano. Se diferencia de la CU principalmente en la distribución de las lesiones y en la presencia de inflamación en todo el espesor de la pared intestinal. Es una enfermedad segmentaria y afecta sobre todo al colon proximal e íleon. Los pacientes presentan dolor abdominal, diarrea, malnutrición y anemia. Las lesiones que se produce consisten

en erosiones superficiales y úlceras longitudinales y transversales que le dan a la mucosa un aspecto de “empedrado”. Pueden producirse úlceras profundas en forma de fisuras que pueden ocasionar abscesos o fístulas entre segmentos intestinales. Gran parte de los enfermos presentan estenosis que consiste en el estrechamiento de la luz, a menudo circular y el engrosamiento de la pared intestinal. En las estenosis graves el diámetro de la luz rara vez supera los 5 mm. La superficie de la serosa muestra vasos prominentes y dilatados (hiperemia).

La presencia de granulomas en secciones histológicas del intestino es una característica clave de la EC. Los granulomas consisten en acúmulos de macrófagos y otras células inflamatorias. También aparece necrosis epitelial parcheada, microulceraciones mucosas y úlceras en la base de las criptas que conducen a la formación de úlceras en “pico de montaña”. Son frecuentes las lesiones en el sistema nervioso entérico que consisten en hipertrofia e hiperplasia de las fibras nerviosas y alteraciones en los ganglios nerviosos de la submucosa y del plexo mientérico.

#### **2.2.2.4. Colitis ulcerosa**

La CU, a diferencia de la EC, es una enfermedad exclusivamente colónica en la que las lesiones están confinadas a la mucosa. Esto posiblemente esté relacionado con la microbiota intestinal, ya que el colon es la zona del intestino con mayor concentración de bacterias. Su forma aguda se caracteriza por la presencia de moco y sangre y úlceras

de distintos tamaños que cuando cicatrizan forman nódulos conocidos como pseudopólipos. En los estadios más avanzados el colon se vuelve fibrótico, estrecho y acortado. Durante los periodos de remisión, la mucosa puede tener un aspecto prácticamente normal. En los casos más graves, la inflamación puede extenderse a la submucosa y en ocasiones puede producirse una perforación.

En cuanto a las características microscópicas, destaca el infiltrado celular que se produce, compuesto principalmente de neutrófilos. También aparecen alteraciones en las criptas (acortamiento de las mismas, ramificación y bifurcación o su desaparición), erosiones de la mucosa, engrosamiento de la *muscularis mucosae* y metaplasia de las células de Paneth. Salvo en el ciego, el colon no tiene habitualmente células de Paneth y su presencia es muy indicativa de EI, especialmente de CU.

### **2.2.3. FACTORES QUE AFECTAN A LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

Existen diversos factores que regulan la inflamación a nivel intestinal y por lo tanto, predisponen al desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. Entre ellos destacar los **factores genéticos**, los **factores medioambientales** como dieta, industrialización, tabaco, edad, infección, estrés fisiológico, medicamentos, isquemia-cirugía, la **composición de la microbiota intestinal** y los **defectos en la barrera mucosa**.

### **2.2.3.1. Factores genéticos**

Tras la identificación en el año 2001 del primer gen de susceptibilidad para la EC (Ogura et al., 2001; Hugot et al., 2001) ha crecido mucho el interés en la identificación de otros genes que predispongan a la enfermedad. La susceptibilidad de un individuo de padecer una enfermedad está determinada en muchos casos por la combinación de factores genéticos y ambientales. La identificación de estos factores de riesgo genéticos es uno de los objetivos más importantes de la medicina moderna ya que conduce a una medicina más individualizada y a la identificación de dianas terapéuticas. Estudios epidemiológicos y familiares han demostrado que la EII es una enfermedad genéticamente muy compleja que no puede explicarse con la alteración en un único gen, sino que se trata de desórdenes poligénicos que siguen una distribución no Mendeliana y donde los factores ambientales son fundamentales ya que la presencia de dichas alteraciones genéticas no garantiza que se desarrolle la enfermedad.

Los estudios de agregación familiar indican una elevada incidencia de familiares con ambas formas de EII. El riesgo para familiares consanguíneos es 30 veces mayor. Entre el 10-20% de los enfermos tiene antecedentes de EII entre sus familiares (Gassull et al., 2002). Estudios en gemelos monocigotos muestran una concordancia del 6-17% para la CU y del 37-58% para la EC (Hanauer, 2006), lo cual indica que los factores medioambientales son más importantes en la CU. En familias con una elevada incidencia de EII se ha observado que en el

75% de los casos, existe concordancia para EC o CU mientras que en el 25% no, es decir, que algunos familiares presentan EC mientras que otros CU. Esto sugiere que existen factores genéticos que son compartidos por ambas enfermedades (Hanauer, 2006) y que el tipo concreto (EC o CU) que finalmente se manifiesta podría depender de otros factores como son los factores ambientales y también el tipo de microbiota que presente cada individuo.

### **2.2.3.2. Factores medioambientales**

#### **A. Dieta**

Los estudios que relacionan diferentes alimentos o dietas con la enfermedad inflamatoria intestinal presentan algunas dificultades puesto que no se puede establecer una relación causa-efecto con determinados tipos de dietas (ej. Dieta Mediterránea) ya que la incidencia es muy baja.

La población actual tiene un riesgo creciente de padecer enfermedades relacionadas con una alimentación deficiente, tales como diabetes, cáncer de colon, hipertensión y otros desórdenes metabólicos. En la última década se le ha dado una mayor importancia al consumo de **fibra dietética** ya que diversos estudios relacionados con este tema afirman que la fibra dietética juega un papel preventivo y terapéutico importante sobre estas patologías (Jacobasch et al., 1999; Wollowski et al., 2001; Bauer-Marinovic et al., 2006). Los mecanismos por los que la fibra dietética aporta efectos beneficiosos a los individuos que la

incluyen en su dieta se deben tanto a sus propiedades físico-químicas (capacidad de retención de agua y formación de geles) como su fermentabilidad. Esta fermentabilidad es uno de los factores más importantes, ya que los **ácidos grasos de cadena corta (SCFA)**, resultantes de la fermentación de los carbohidratos indigeribles, son la principal fuente de energía de los colonocitos (Sakata, 1995). Éstos tienen una gran influencia en el flujo sanguíneo del colon (Mortensen et al., 1995), regulan la motilidad intestinal (Ono et al., 2004), promueven el intercambio de iones y desempeñan un papel de prevención, protección y tratamiento del cáncer de colon (Fu et al., 2004). El butirato ejerce efectos antiinflamatorios en el intestino ya que suprime la activación del  $\text{NF}\kappa\beta$ , el cual regula la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, así como quimioquinas y prostaglandinas (Andoh et al., 1999).

En dos estudios diferentes, la preincubación de colonocitos de rata (Abrahamse et al., 1999) o humanos (Rosignoli et al., 2001) con butirato mostraron una significativa reducción del daño del DNA inducido por peróxido de hidrógeno. Así, en el caso del butirato se ha observado que afecta positivamente a varios componentes de la barrera intestinal, resultando en una protección mejorada contra antígenos lumbinales. En otro estudio (Peng et al., 2007) se demostró que a concentraciones bajas de butirato (2mM) se induce un descenso en la permeabilidad de las líneas celulares Caco-2 y HT29, mientras que a

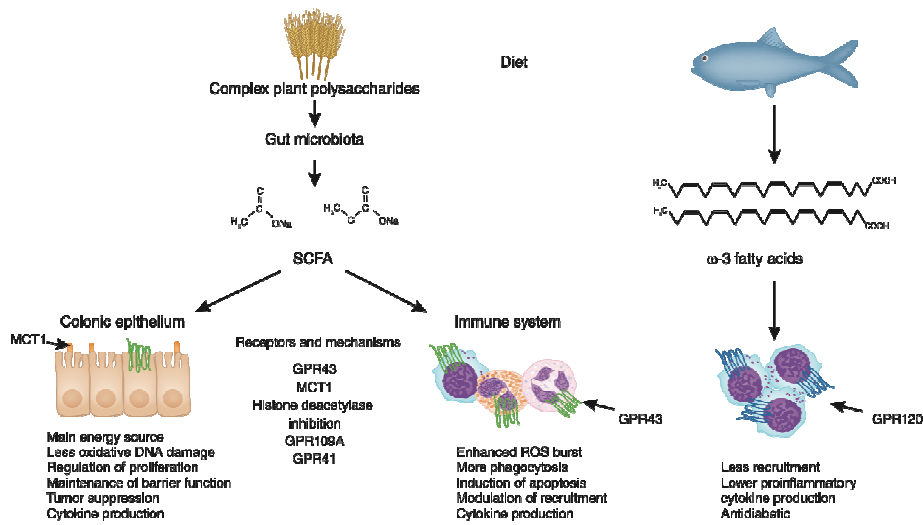


concentraciones altas (8mM) se incrementaba la permeabilidad de dichas células (*figura 11*).

Además los SCFA provenientes de la fermentación de la fibra dietética son capaces de unirse a un receptor conocido como GPR43. El receptor GPR43 es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G y se activa a partir de ácidos grasos de cadena corta con 6 o menos átomos de carbono, tales como el acetato, propionato y en menor medida el butirato (Schmidt et al., 2011). Sin embargo, la potencia de los SCFA para activar al receptor GPR43 es baja, en el orden de concentraciones que van desde altos valores micromolares a milimolares (Stoddart et al., 2008). Mediante difracción por rayos X se ha descubierto que dicho receptor posee un lugar de unión para el grupo ácido de los SCFA localizado entre los residuos de arginina 180 y 255 (Lee et al., 2008). Así, el grupo carboxílico, que se encuentra cargado negativamente, interacciona con ambas argininas formando un complejo bi-dentado. La cadena alifática se orienta a través de un bolsillo hidrofóbico de la serina 241, tirosina 238, lisina 250 y arginina 255.

El receptor GPR43 se expresa en los islotes de Langerhans del páncreas, células inmunitarias como los neutrófilos, adipocitos y células intestinales como los enterocitos (Brown et al., 2003). Así mismo, su expresión está modulada por la presencia de SCFA (Corte et al., 2011). Así, cuando se da a ratas una dieta enriquecida en fibra, su

fermentación produce un incremento de la presencia de SCFA en el colon, dando lugar a una sobreexpresión del GPR43.



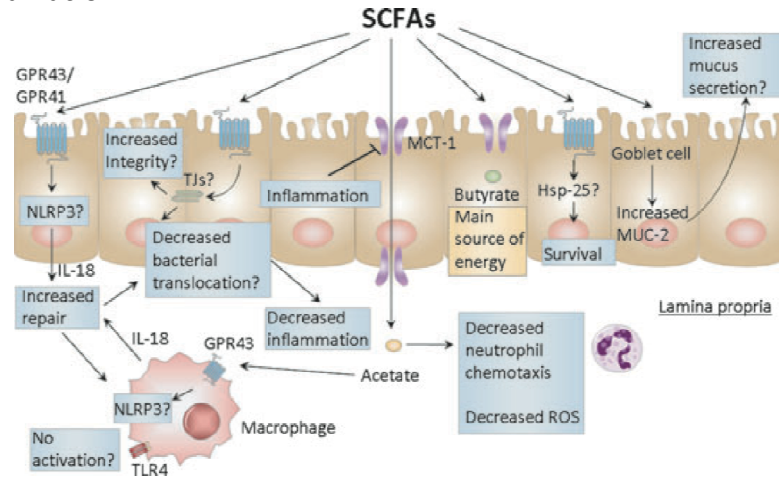
**Figura 11.** Relación entre componentes de la dieta y el sistema inmune.

La activación del GPR43 da lugar a la migración de los neutrófilos (Le Poul et al., 2003). Fisiológicamente las células fagocíticas, incluidos los neutrófilos, están considerados como la primera línea de defensa frente a microorganismos patógenos. Cuando genéticamente existe una deficiencia de neutrófilos aparecen infecciones fúngicas y bacterianas de tipo agudo (Segal et al., 2000; Lekstrom-Himes et al., 2000) y por el contrario, cuando existe una respuesta exacerbada de neutrófilos, puede llegar a dañar los tejidos como es el caso de la inflamación crónica que supone la EII en humanos o la colitis experimental inducida en animales (Nikolaus et al., 1998; Kühn et al., 2007).

La migración de neutrófilos normalmente se debe a varios factores, entre ellos la presencia de citoquinas, integrinas y células del citoesqueleto (Parkos et al., 1997). Recientemente se ha descrito que los SCFA, provenientes de la fermentación de la fibra por la microbiota intestinal, son potentes activadores de neutrófilos tras su unión al receptor GPR43 (Brown et al., 2003; Wong et al., 2006). Experimentos *in vitro* ponen de manifiesto que la inducción SCFA-neutrófilos es dosis dependiente (Le Poul et al., 2003). Así mismo, la migración de los neutrófilos se produce por un gradiente de concentración de SCFA (Sina et al., 2009; Vinolo et al., 2009) tal y como se observa en la *figura 12*.

Para estudiar el efecto del papel del receptor GPR43 en la EII, se han hecho estudios experimentales con ratones a los que se les inducía una colitis con DSS (Maslowski et al., 2009; Sina et al., 2009). Los animales utilizados eran ratones normales como ratones transgénicos que no expresan el receptor GPR43. Ambos trabajos mostraron que los ratones que expresan el receptor GPR43, en casos de colitis aguda, no se morían ya que los neutrófilos podían ser activados mediante la interacción SCFA-GPR43, conteniendo de esta forma la traslocación bacteriana. Sin embargo, los ratones que no expresaban el GPR43 si morían, ya que no se producía la activación de los neutrófilos. Los trabajos citados anteriormente muestran resultados controvertidos respecto al efecto protector-perjudicial del GPR43 en el modelo de colitis crónica. El grupo de Sina encontró que la deficiencia del receptor GPR43 protegía frente al daño que origina la inflamación de tipo crónico

debido a una menor actividad neutrofílica. Por el contrario, el grupo de Maslowski encontró unos resultados opuestos, ya que los ratones que no expresaban el receptor GPR43 tenían un mayor daño tisular debido a la inflamación.



**Figura 12.** Relación de los SCFAs con el receptor GPR43.

Además de la fibra dietética, se han tenido en cuenta el efecto de otros componentes de la dieta, como son los azúcares, frutas y vegetales y grasas sobre la EII. En cuanto a las **frutas y vegetales**, al igual que la fibra dietética, parecen que mejoran la sintomatología de la EII. Sin embargo en el caso de las **grasas y azúcares** parece que son factores de riesgo que empeoran la sintomatología de la EII (Molodecky et al., 2011). Puesto que la dieta de los países desarrollados está repleta de alimentos ricos en grasas y azúcares refinados y son precisamente éstos los que presentan mayores concentraciones de AGEs debido al procesado térmico, todo esto parece llevar a la conclusión de que

existen indicios suficientes para pensar que AGEs como la CML puedan tener una relación directa con la EII.

## **B. Industrialización**

La incidencia de la EII sufrió un fuerte incremento durante el siglo XX en países del norte de Europa y EEUU, frente a los países no desarrollados, un hecho que se denominó gradiente Norte-Sur (Hanauer, 2006). Sin embargo, en los últimos años, en países del sur de Europa, incluyendo España, estas diferencias son cada vez más discretas ya que la incidencia ha aumentado, de forma paralela a la mejora del nivel de vida. Por ello, hoy se habla más bien de un gradiente Este-Oeste, relacionado con el desarrollo tecnológico, un mejor acceso de la población a la medicina de calidad, modificaciones dietéticas, diferente tratamiento de aguas, condiciones higiénicas, etc. La incidencia de EII es mayor en áreas urbanas que en áreas rurales, por lo que algunos investigadores sugieren que empleos que se realizan al aire libre y que implican actividad física podrían proteger frente a la EII.

## **C. Tabaco**

El consumo de tabaco es el factor de riesgo externo asociado a la EII mejor estudiado aunque con los conocimientos actuales es difícil explicar el papel que desempeña el tabaco en la fisiopatología de la EII. Cuando se estudian parejas de gemelos se observa que el hecho de ser fumador al diagnóstico se asocia a un mayor riesgo de desarrollar EC en

todos los familiares a diferencia de los pacientes fumadores con CU; es más, en parejas de gemelos con diferente comportamiento para la variable fumar, casi siempre, el diagnóstico es EC en el fumador y CU en el no fumador, traduciendo una potente influencia del tabaco en una predisposición genética existente (Molodecky et al., 2011).

#### **D. Infección**

Se conoce que existen patógenos severos que actúan a nivel mitocondrial de las células epiteliales, produciendo toxinas como es la toxina A, que activa la disgregación de los filamentos de actina del ATP (He et al., 2002) afectando así de forma negativa a la barrera epitelial. Entre estos patógenos se encuentran *Clostridium difficile*, *Campilobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* o *Salmonella typhimurium* (Jesenberger et al., 2000; Maki et al., 1980).

#### **E. Estrés fisiológico**

Hay estudios que relacionan el estrés fisiológico con la potenciación de la EII (Berstein et al., 2010; Mawdsley and Rampton, 2005) y hay otros estudios que dicen que no existe tal relación (Goodhand et al., 2009). En estudios animales y observaciones en humanos se ha revelado que el estrés fisiológico crónico aumenta la permeabilidad intestinal (Soderholm and Perdue., 2001). En concordancia con esto se ha podido observar que en pacientes con EII

sometidos a estrés fisiológico sufren cambios en la estructura mitocondrial si se compara con individuos sanos (Farhadi et al., 2005).

#### **F. Medicamentos**

Ciertos medicamentos como los antiinflamatorios no esteroideos que producen cambios a nivel mitocondrial y estrés oxidativo, aumentado así la permeabilidad intestinal (Soderholm et al., 1999; Higuchi et al., 2009). Otros fármacos como los inmunosupresores (Tacrolimus) inhiben la activación de las células T y la actividad mitocondrial, aumentando así la permeabilidad intestinal (Gabe et al., 1998; Madsen et al., 1995). En el caso de los antibióticos como las tetraciclinas pueden inhibir la función mitocondrial y modificar la composición de la microbiota intestinal (De Jonge, 1973).

#### **G. Isquemia-Cirugía**

En pacientes con EII, la cirugía y el estrés oxidativo aumentan la permeabilidad intestinal. Así, el 70% de los pacientes con EII sufren algún tipo de cirugía intestinal y prácticamente el 100% de éstos sufren una recidiva en la enfermedad en el lugar de la resección en los 2-5 años siguientes (Schoultz et al., 2011). La cirugía siempre origina una isquemia localizada, lo que da lugar a un incremento del estrés oxidativo que conduce finalmente a un incremento en la permeabilidad intestinal (Willoughby et al., 1996).

### 2.2.3.3. Composición de la microbiota intestinal

La población microbiana del tracto digestivo del ser humano constituye un ecosistema enormemente complejo que incluye numerosos tipos de microorganismos. La microbiota de un individuo cualquiera está formada por más de 500 especies diferentes y en cantidad, suponen unas diez veces el número de células eucariotas que forman el cuerpo humano. Por ello, se le conoce como el “órgano” más grande del cuerpo humano y supone una defensa natural para el hospedador. No es de extrañar, por tanto, que cambios en la microbiota intestinal puedan tener repercusiones importantes sobre la salud del individuo.

El intestino fetal es estéril pero la colonización comienza inmediatamente tras el nacimiento y está influenciada por el tipo de parto (natural o cesárea), el tipo de alimentación (leche materna), condiciones higiénicas, infecciones, ingesta de medicamentos y sobre todo, factores genéticos (O’Hara and Shanahan, 2006). Está compuesta por bacterias anaerobias (*Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Eubacterium spp.*) y aerobias (*Escherichia spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*). La microbiota intestinal ejerce **funciones protectoras** (competición con patógenos, producción de bacteriocinas), **funciones estructurales** (fortificación de la barrera, desarrollo del sistema inmune, inducción de IgA) y **funciones metabólicas**



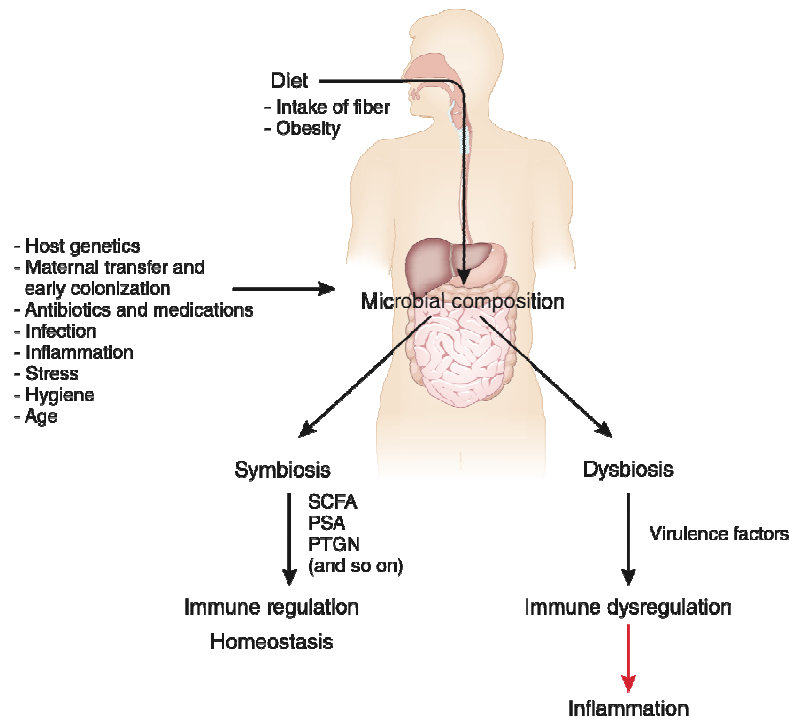
(producción de ácidos grasos de cadena corta, síntesis de vitamina K, control de proliferación y diferenciación).

Existe una relación muy importante entre la dieta, la microbiota intestinal y el sistema inmune. Existen estudios recientes que muestran el efecto considerable que tiene la dieta sobre la composición de la microbiota intestinal y ésta a su vez sobre la respuesta inmune (Turnbaugh et al., 2009; De Filippo et al., 2010). En dichos estudios se observa que al cambiar la dieta a diferentes poblaciones humanas cambia también la composición de la microbiota intestinal. Así, cuando la dieta es rica en fibra existe un predominio de bacterias del phylum Bacteroidetes sobre el phylum Firmicutes y se produce una situación de simbiosis y de inmunoregulación. Sin embargo, cuando existe un predominio de bacterias Firmicutes frente Bacteroidetes se produce una disbiosis y en consecuencia un proceso inflamatorio (Wu et al., 2010; Frank et al., 2007). Por todo ello, se puede decir que la composición de la microbiota intestinal es muy importante porque influye en la respuesta inmune (*figura 13*).

#### **2.2.3.4. Defectos en la barrera mucosa**

En el tracto gastrointestinal los receptores del sistema inmune innato funcionan como un mecanismo inmediato de defensa frente a patógenos invasores. En 2004, Rakoff-Nahoum et al., descubrieron que los **receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, Pattern Recognition Receptors)**, los cuales “sienten” las bacterias comensales,

mantienen la homeostasis intestinal y la resistencia al daño tisular. Esto no es extraño ya que los PRRs dan lugar a una respuesta del sistema inmune a través de rutas inflamatorias (NFkB y MAPK). Los PRRs no solo controlan la infección y colonización bacteriana, sino que también regulan la función barrera del epitelio intestinal, su reparación y la homeostasis inmunológica (Rakoff-Nahoum et al., 2004; Chen et al., 2008; Bouskra et al., 2008; Fukata et al., 2007; Saleh and Trinchieri, 2011). Así, cuando el tracto gastrointestinal sufre una alteración en los PRRs, se producen patologías como la colitis infecciosa, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer.



**Figura 13.** Dieta, microbiota intestinal y regulación del sistema inmune.

Existen cuatro grandes clases de PRRs involucrados en el reconocimiento de patógenos: los **receptores Toll-like (TLRs)**, los **receptores Nod-like (NLRs)**, los **receptores RIG-1-like** y los **receptores de lectina tipo C**. De forma general, estos PRRs sienten motivos estructurales conservados en los microorganismos, también conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como son el LPS o el peptidoglicano, los cuales se encuentran en la pared bacteriana (Chen and Núñez, 2011). Así mismo, los PRRs también son capaces de sentir patrones moleculares endógenos asociados a daños en el hospedador (DAMPs), los cuales se generan normalmente durante el daño celular o daño a tejidos (Chen and Núñez, 2011). Al contrario que los TLRs, que se encuentran en la superficie de las células, los NLRs se localizan en el citoplasma y reconocen tanto a los PAMPs como a los DAMPs que acceden al interior celular.

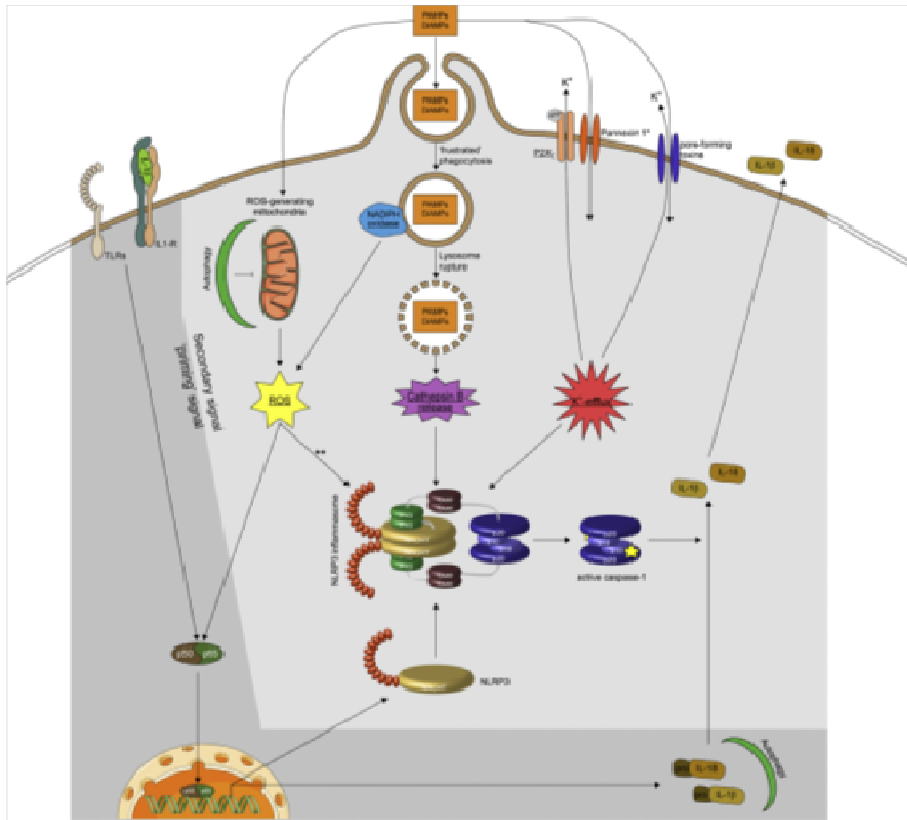
Los **inflammasomas** son un **tipo de NLRs** formados por un complejo multiprotéico capaz de activar la pro-caspasa 1 a caspasa 1, la cual modifica la pro-IL1 $\beta$  y la pro-IL18 hasta su forma madura y activa (Martinon et al., 2002). Los inflammasomas se clasifican atendiendo al tipo de PRR que regulan su actividad y dicta la naturaleza del estímulo que los activa. Hasta ahora, los más conocidos son el NLRP1, NLRP3, NLRC4 y el AIM2, aunque otros como el NLRP6 y NLRP12 están centrando la atención en la inflamación intestinal (Chen and Nuñez, 2010). Estos inflammasomas son capaces de sentir PAMPs, aunque el NLRP3 es capaz de sentir también DAMPs. Así, los eventos celulares que

necesitan la producción de IL1 $\beta$  e IL18 se regulan a partir de la activación de los inflamasomas.

### Tipos de inflamasomas

El **inflamasoma NLRP3** de los macrófagos se activa siempre que exista ATP extracelular a través de un gran número de estímulos microbianos como pueden ser diversos agonistas de los TLRs (como el LPS) y el muramil dipéptido (MDP), agonista del NOD2 (Mariathasan et al., 2006; Sutterwala et al., 2006; Franchi et al., 2007). Además, el Nlrp3 también se activa en fagocitos pre-estimulados con LPS a partir de diversas toxinas bacterianas y algunas partículas sólidas como los cristales de urato, sílice, asbestos, hidróxido de aluminio o el péptido  $\beta$ -amiloide. (Martinon, et al., 2006; Hornung et al., 2008; Dostert et al., 2008; Franchi et al., 2009a). La capacidad de los distintos PAMPs para activar el NLRP3 es compleja, ya que la mayor parte de estas moléculas no están estructuralmente relacionadas. Así, resultados recientes (Bauernfeind et al., 2009; Franchi et al., 2009b) sugieren que los estímulos microbianos, en vez de activar directamente al inflamasoma, lo que hacen es inducir su producción vía NF $\kappa$ B, mientras que la señal directa de activación es dada por el ATP tal y como se observa en la *figura 14*. De forma similar, las toxinas bacterianas y las partículas sólidas activan al NLRP3 tal y como hace el ATP, aunque necesitan de la estimulación previa con ligandos para los TLRs, los cuales inducen la

expresión del NLRP3 (Martinon et al., 2006; Hornung et al., 2008; Dostert et al., 2008; Franchi et al., 2009a).



**Figura 14.** Esquema del priming y activación del NLRP3.

Así, tanto el TNF $\alpha$  como la IL1 (los cuales activan la vía del NF $\kappa$ B) son tan efectivos como los agonistas de los TLRs para promover la activación de la caspasa-1 en respuesta al ATP o los cristales de sílice (Franchi et al., 2009a; Franchi et al., 2009b). De esta forma, la activación del NLRP3 requiere dos tipos de señales. La primera consiste en

moléculas microbianas (como los ligandos de los TLRs) o ciertas citoquinas que dan lugar a la inducción del NLRP3 vía NFκB. La segunda señal que dispara directamente la activación de la caspasa 1, está mediada por diversos estímulos como el ATP extracelular, partículas cristalinas o algunas toxinas bacterianas.

El **NLRP6** es un inflamasoma mal caracterizado en la actualidad y aún no se conoce qué tipo de señal lo activa (Grenier et al., 2002). El NLRP6 se expresa fundamentalmente en células intestinales y en células hematopoyéticas (Grenier et al., 2002; Chen et al., 2011; Lech et al., 2010; Normand et al., 2011) aunque en el caso de éstas se expresa diferencialmente: mayores niveles en granulocitos y linfocitos y menores niveles en macrófagos y células dendríticas (Grenier et al., 2002). En el caso de las células intestinales, el NLRP6 está muy expresado en miofibroblastos, los cuales tienen una función importante en la reparación del epitelio intestinal (Normand et al., 2011; Andoh et al., 2007).

En cuanto al **NLRP12** es un inflamasoma aún peor caracterizado que el NLRP6, aunque en este caso se sabe que actúa como un regulador negativo de la inflamación, regulando la vía del NFκB. En este sentido, las patologías inflamatorias crónicas a nivel intestinal se inician por una interacción aberrante del sistema inmune del hospedador con la microbiota intestinal (Zaki, et al. 2011). Los receptores del sistema inmune innato, como los TLRs, inician estos procesos activando la vía del NFκB, el cual es un mediador central para la producción de citoquinas y

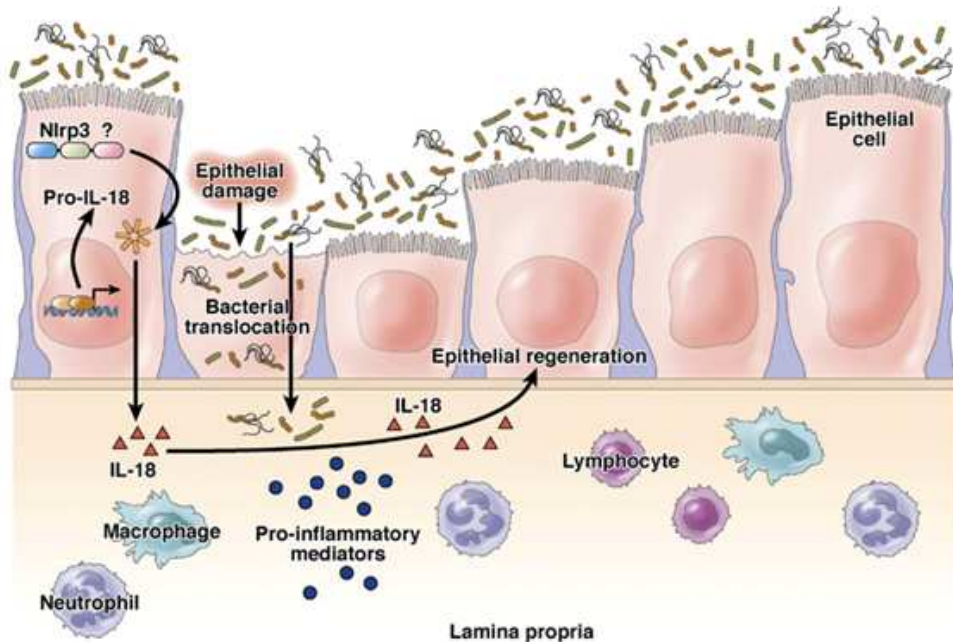
quimioquinas proinflamatorias. Sin embargo, una regulación cuidadosa de la señalización vía NFκB es esencial para mantener un nivel beneficioso de interacciones homeostáticas con la microbiota intestinal. Así, las señales que de-regulan la vía del NFκB representan un mecanismo clave que contribuye a la inflamación intestinal y a la colitis (Yu et al., 2009), jugando de esta forma un papel clave la activación del NLRP12.

#### Inflamasomas y homeostasis gastrointestinal

El papel de los inflamasomas en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal proviene de trabajos previos en los que se observaron que los polimorfismos de los genes que codifican la IL18 están asociados a una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad de Crohn (Tamura et al., 2002; Zhernakova et al., 2008). De igual forma, los polimorfismos en el NLRP3 dan lugar a una producción alterada de IL1β en monocitos estimulados con LPS (Villani et al., 2009). La IL18 ha sido considerada tradicionalmente como una citoquina proinflamatoria, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual promueve la reparación temprana de los tejidos. La extensión en el nivel de producción de IL18 determina el nivel de inflamación y reparación. Así, cualquier desregulación en la producción de IL18 puede alterar la homeostasis a nivel intestinal (Chen and Núñez, 2011).

Diversos autores han mostrado que la deficiencia de NLRP3 incrementa la susceptibilidad a la colitis inducida por DSS, con una mayor mortalidad y pérdida de peso (Zaki et al., 2010, Allen et al., 2010;

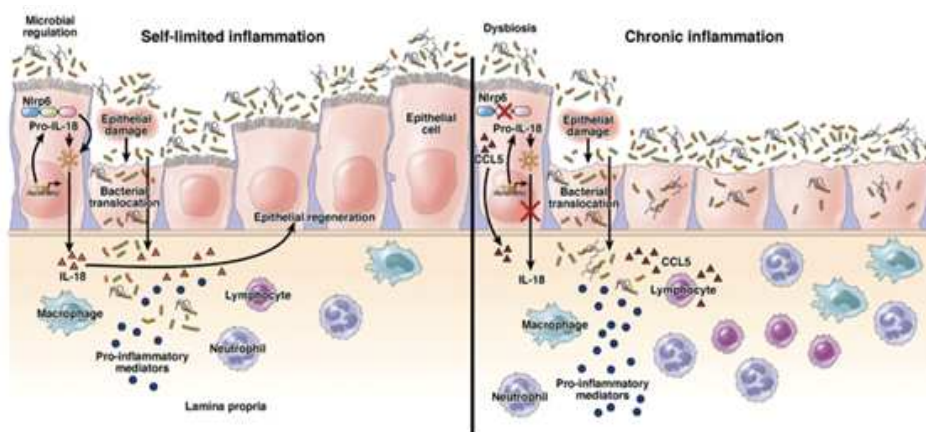
Hirota et al., 2011). La mayor inflamación intestinal en ratones deficientes en NLRP3 se asocia con una mayor permeabilidad intestinal y traslocación bacteriana, lo que empeora la patología. Así mismo, estos ratones tienen alterada la reparación intestinal, lo que agrava los síntomas (Zaki et al., 2010) (Figura 15). Esto podría deberse a una deficiencia en la producción de IL18 en el epitelio intestinal. De igual forma, los ratones deficientes en Nlrp3 tienen una menor producción de  $\alpha$ -Defensina (Hirota et al., 2011), lo que da lugar a una microbiota más colitogénica. Así, la deficiencia del NLRP3 alteraría los mecanismos antimicrobianos, dando lugar a una disbiosis que incrementa la susceptibilidad a la colitis por DSS.



**Figura 15.** Papel del inflammasoma NLRP3 en la regulación de la homeostasis intestinal.



En cuanto al NLRP6, varios grupos han mostrado que los ratones deficientes en NLRP6 tienen una mayor susceptibilidad a la colitis inducida por DSS (Elinav et al., 2011; Chen et al., 2011; Normand et al., 2011). El mecanismo de protección mediada por este inflamasoma ha sido propuesto por Elinav et al. (2011) y se muestra en la *figura 16*. La microbiota de los ratones deficientes en NLRP6 es más colitogénica que la de los ratones normales, con una mayor presencia de bacterias del género *Prevotellaceae*. Esta microbiota alterada origina una mayor producción de CCL5, citoquina que aumenta la inflamación tras el daño epitelial subsecuente a la exposición a DSS. Así mismo, al no expresarse el NLRP6 existe una menor producción de IL18 a nivel epitelial, lo que da lugar a una menor reparación tisular.



**Figura 16.** Papel del inflamasoma NLRP6 en la regulación de la homeostasis intestinal.

Por otro lado, tal y como se comentó en el apartado anterior, las moléculas que regulan de forma negativa la activación del NFκB son claves para la homeostasis intestinal. En este sentido, el inflamasoma NLRP12 regula de forma negativa la señalización vía NFκB, haciendo que las quinasas IRAK1 y NIK sean degradadas por los proteosomas, lo que evita la traslocación nuclear del NFκB (Arthur et al., 2007). En este sentido, el NLRP12 se expresa principalmente en células hematopoyéticas, con una mayor expresión en neutrófilos que en macrófagos. También se encuentra este inflamasoma en el intestino, pero a niveles hasta 100 veces menores (Zaki et al., 2011). El grupo de Zaki ha observado que los ratones deficientes en NLRP12 a los cuales se les induce una colitis aguda mediante DSS no tienen una patología diferente a la de los ratones control, pero tras la retirada del DSS del agua de bebida los ratones control se recuperan mientras que los ratones deficientes en NLRP12 continúan con la inflamación intestinal. Esto indica que el inflamasoma NLRP12 es necesario para resolver la inflamación subsecuente a la administración de DSS, ya que estos ratones tienen unos niveles de citoquinas inflamatorias más elevados. A nivel molecular se ha observado que los ratones deficientes en NLRP12 tienen una mayor activación del NFκB y MAPK, lo que da lugar a ese incremento en el proceso inflamatorio. Este efecto es más marcado en macrófagos, donde el NLRP12 inhibe la señalización mediada por los TLRs 2, 3 y 4. De esta forma, la ausencia de este inflamasoma desregula la señalización de los TLRs, por lo que se incrementa la activación del

NFkB en células mieloides. Así, la actividad del NLRP12 en el compartimento hematopoyético es crítica para proteger de la inflamación, ya que evita la hiper-respuesta de los macrófagos ante los ligandos de distintos TLRs inhibiendo parcialmente las vías NFkB y MAPK (Allen et al., 2012).

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo principal de la presente tesis doctoral consiste en estudiar el efecto que tiene la ingesta de compuestos avanzados de la reacción de Maillard sobre la inflamación a nivel intestinal. Para ello, se proponen 3 objetivos parciales:

1. Estudiar el efecto de los AGEs dietéticos sobre los receptores RAGE y GPR43.
2. Estudiar el efecto de la activación de los receptores RAGE y GPR43 sobre la inflamación intestinal.
3. Tratar de conocer si el consumo de AGEs de forma aguda o crónica es un factor causal o agravante de la enfermedad inflamatoria intestinal.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. PREPARACIÓN CML**

Para obtener una proteína glicosilada rica en CML se siguió la técnica descrita por Valencia et al. (2004). De forma breve, se disuelve albúmina sérica bovina (BSA) en tampón fosfato 150mM, pH 7.4 que contiene ácido glioxílico (25mM) y NaBH<sub>3</sub>CN (75mM). A continuación, esta solución se filtra de forma estéril y se incuba a 50°C durante 48 horas para dar lugar a la BSA glicosilada (BSA-G). Como muestra control se utilizó la BSA calentada sin ácido glioxílico ni NaBH<sub>3</sub>CN (BSA-C). Tras la incubación, la BSA se ultrafiltra con una membrana de 5kDa para eliminar los restos de ácido glioxílico que no reaccionaron y las sales del tampón y finalmente se liofiliza.

### **4.2. CONTENIDO CML EN ALIMENTOS Y TEJIDOS**

El análisis del contenido de CML en la BSA-G, alimentos y tejidos estudiados se realizó mediante una combinación de las técnicas de Drusch et al. (1999) Thormalley et al. (2003). De forma abreviada, a una cantidad de muestra que aporte 10 mg de proteína se le adiciona 1 ml de tampón borato 0,2 M pH 9,5 y 1 ml de borohidruro sódico 1 M y se dejan reducir durante 4 horas a temperatura ambiente en tubos pyrex. Posteriormente la muestra se hidroliza con 3 ml de HCl 12,06 M (concentración final 6 M) durante 20 horas a 110°C. Finalmente, 1 ml de hidrolizado se deseca en rotavapor a 70°C y se redisuelve en 1 ml de fase móvil, filtrándose con un filtro de nylon de 0,25 µm.

El análisis de CML se realizó mediante LC-MS/MS (Xevo TQS, Waters). La columna cromatográfica fue una Hypercarb (Thermo Scientific) de 2,1 x 100 mm y 5µm. La fase móvil fue formiato amónico 26 mM a pH 3,8 con un gradiente de acetonitrilo (17-25 min., 0-31% acetonitrilo; 25-30 min., 31% acetonitrilo; 30-35 min., 31-50% acetonitrilo) a un flujo 0,2 ml/min. La CML se detectó en modo de ionización positiva, utilizando como patrón D<sub>2</sub>-CML (Cambridge Isotopes Laboratories).

#### **4.3. DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS**

Se estudió la actividad antioxidante de 27 alimentos crudos y cocinados con diferentes composiciones: pan, pan integral, cereales de desayuno integrales, espaguetis y arroz cocido como derivados de cereales; tomate, zanahoria, kiwi, manzana y espinacas cocidas como frutas y verduras, respectivamente y merluza y ternera a la plancha, salchichas salteadas, salchichón y jamón de york como pescados y carnes, respectivamente; yogur y queso semi-curado como productos lácteos; chocolate negro y tiramisú como postres; cacahuets y almendras tostadas como frutos secos; aceitunas y patatas fritas tipo chip como snacks y huevo duro. Las muestras se homogeneizaron y congelaron a -80°C hasta su análisis mediante el método GAR (Pastoriza et al., 2011).

Digestión *in vitro*: las muestras se sometieron a un proceso de digestión *in vitro* que incluía la digestión oral de 1,000 g de muestra con 250  $\mu$ l de  $\alpha$ -amilasa (37°C/30 min), ajuste del pH a 2, digestión gástrica con 300  $\mu$ l de pepsina (37°C/120 min), ajuste del pH a 6 y digestión intestinal con 2,5 ml de una solución de pancreatina y sales biliares (37°C/120 min).

Actividad antioxidante: la actividad antioxidante se determinó mediante el método ABTS aplicado a la fracción soluble e insoluble de las muestras digeridas. En el caso de la fracción soluble, 200  $\mu$ l de extracto se mezclaron con 280  $\mu$ l de una solución de ABTS 3,5 mM diluída hasta una absorbancia de 0,700 con etanol:agua (50:50), tomando la lectura de absorbancia a 730 nm a los 20 minutos. En el caso de la fracción insoluble, 20 mg se mezclaron con 2 ml de ABTS y se tomó la lectura a los 20 minutos utilizando un lector de placas (Fluostar Omega, BMG).

#### **4.4. ENSAYOS CELULARES**

Para evaluar el efecto de la CML sobre el receptor GPR43 y su actividad en los neutrófilos, se utilizaron dos modelos celulares: CHOK1 y neutrófilos obtenidos de ratones *WT* (ver apartado 4.5. Ensayos animales).



#### 4.4.1. ACTIVACIÓN GPR43

Para evaluar la activación del receptor GPR43 mediante distintas sustancias (ácido propiónico, CML o BSA-G) se utilizó el método de la aequorina en células CHOK1. Estas células provienen del ovario de hámster chino y se escogieron, en primer lugar, porque no expresaban los receptores RAGE ni GPR43 y en segundo lugar porque estas células son las más empleadas a nivel internacional para expresar proteínas recombinantes, como puede ser la aequorina. Ésta es una fotoproteína que en contacto con calcio emite una luz azulada a 469 nm. Por ello, esta proteína se utiliza en biología molecular para estudiar las rutas bioquímicas que dan a la movilización de calcio intracelular, como es la activación del receptor GPR43.

El ensayo de la aequorina se realizó siguiendo la técnica descrita por Swaminath et al., (2010). De forma resumida, las células CHOK1 se sembraron en placas de 145 mm y se cultivaron con un medio que contenía DMEM-F12 y 10% suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37°C con un 5% CO<sub>2</sub> durante 12 horas y posteriormente se realizó la transfección con 5 µg de los vectores pcDNA3.1 para el GPR43 (Sigma-Aldrich) y pcDNA3.1 para la aequorina (invitrogen). Pasadas 24 horas de la transfección, las células se resuspendieron en tampón fosfato con CaCl<sub>2</sub> 1mM y 5µM de coelentarazina a una densidad celular de 2x10<sup>6</sup> células/ml. La activación celular mediante el receptor GPR43 supone la liberación de calcio intracelular que al unirse al complejo aequorina-

coelentarazina emite luz azulada cuya intensidad se midió a 469 nm en un luminómetro (Fluostar Omega, BMG).

#### **4.4.2. ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA**

Para determinar el efecto de la CML y BSA-G sobre la quimiotáxis neutrofílica inducida por el ácido propiónico, se utilizaron neutrófilos obtenidos a partir del lavado peritoneal de ratones *WT* (ver apartado 4.5. Ensayos animales) tras 4 horas de una inyección intraperitoneal de 1 ml de tioglicolato sódico (3%). La actividad quimiotáctica se determinó siguiendo el método de Suire et al. (2006). Brevemente, 200  $\mu$ l de la suspensión de neutrófilos se adicionaron a una cámara de policarbonato tipo transwell (Millipore) y posteriormente insertado en una placa de 24 pocillos (Costar) que contenía 300  $\mu$ l de HBSS con la(s) sustancia(s) a estudiar. La microplaca se incubó durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se sustituyó el HBSS por una solución de EDTA 5mM y se incubaron 30 minutos en hielo, tras lo cual se contó el número de células en ambas cámaras tras tinción de Meyer-Hemalaun. Los resultados se expresaron como índice quimiotáctico, el cual refleja la fracción de células que se mueven en función del gradiente de ácido propiónico.

#### **4.4.3. ACTIVIDAD FAGOCÍTICA**

La actividad fagocítica de los neutrófilos se estudió mediante la técnica de Alexis et al. (2006). Como sustrato para la fagocitosis se utilizaron biopartículas de zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae*

(Sigma-Aldrich) opsonizadas con IgG y conjugadas con fluoresceína isotiocianato (FITC). Así, 100  $\mu$ l de la solución de partículas ( $2 \times 10^6$ /ml) se adicionaron a 900  $\mu$ l de la suspensión de neutrófilos ( $2 \times 10^6$ /ml) y se incubaron durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y la células se resuspendieron en HBSS para determinar la intensidad de fluorescencia con un lector de microplacas (Fluostar Omega, BMG). Los resultados se expresaron cambios en las unidades de fluorescencia emitida.

#### **4.4.4. PRODUCCIÓN DE ROS**

La actividad oxidativa de los neutrófilos en presencia de los compuestos ensayados se realizó siguiendo el método de Conliffe et al. (2005) determinando la quimioluminiscencia dependiente del luminol. Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml) se incubaron en HBSS con TNF $\alpha$  durante 25 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó luminol (concentración final 1  $\mu$ M) y se leyó la producción de luminiscencia en microplacas de 96 pocillos (Fluostar Omega, BMG) tras 3 minutos de estimulación. Los resultados se expresaron como número de veces que cambia la intensidad de luminiscencia asociada a la producción de ROS.

### **4.5. ENSAYOS ANIMALES**

#### **4.5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Los estudios con animales 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) y fueron aprobados por el comité de bioética de la Fundación Jiménez Díaz y de la Universidad de Granada. Se emplearon tres grupos de animales que cubrían la expresión de los dos receptores a estudiar: ratones homocigotos control *WT* (*Gpr43*<sup>+/+</sup> y *Rage*<sup>+/+</sup>; Deltagen) y ratones transgénicos que sufren la delección del gen que codifica dichos receptores, ratones *Gpr43*<sup>-/-</sup> (129SvEvBrd, Deltagen) y ratones *Rage*<sup>-/-</sup> C57Bl/6 (Lexicon Genetics Inc.). Los animales se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas y tuvieron acceso libre a una dieta estándar de laboratorio y agua. El sacrificio se realizó mediante sobredosis con halotano.

En el **experimento A**, a tres grupos de ratones (*WT*, *Gpr43*<sup>+/+</sup> y *Rage*<sup>-/-</sup>; n = 10) se les indujo una *colitis aguda* con dextrano sulfato sódico (DSS) tras haber ingerido durante 3 días una dieta enriquecida al 3% con la BSA-C o BSA-G (3 grupos x 2 dietas = 6 grupos experimentales). Tras este periodo, a los ratones se les administró el DSS al 4% por medio del agua de bebida durante 7 días y se les monitorizó diariamente el tipo de deposiciones y el sangrado presente en ellas. El día 7 se sacrificaron los animales, se extrajo el colon y se analizó histológicamente siguiendo procedimientos estándar (Maslowski et al., 2009). Como control se utilizaron 3 animales de cada grupo a los que no se les indujo la colitis mediante DSS.

En el **experimento B**, a tres grupos de ratones (WT, *Gpr43*<sup>+/+</sup> y *Rage*<sup>-/-</sup>; n = 10) se les indujo una *colitis crónica* con DSS (Sina et al., 2009) tras haber ingerido durante 3 días una dieta enriquecida al 3% con la BSA-G o BSA-C (3 grupos x 2 dietas = 6 grupos experimentales). Tras este periodo, a los ratones se les administró DSS al 2% durante 5 días, seguidos de 5 días donde se les suministraba agua normal. Este ciclo se repitió dos veces más y los animales fueron sacrificados en el día 30. El avance de la colitis se monitorizó de igual forma que en el caso de la colitis aguda. Como control se utilizaron 3 animales de cada grupo a los que no se les indujo la colitis mediante DSS.

En el **experimento C** se estudió el *efecto de la ingesta de AGEs durante un periodo largo* (90 días), usando los tres grupos de ratones comentados anteriormente (WT, *Gpr43*<sup>+/+</sup> y *Rage*<sup>-/-</sup>; n = 10) y suministrándoles una dieta enriquecida al 3% con BSA-G.

#### 4.5.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Para evaluar el efecto de la ingesta de los AGEs sobre la orquestación de la respuesta inmune mediada por los receptores GPR43 y RAGE, se evaluaron diversos signos clínicos, cambios histológicos y producción de citoquinas.

##### 4.5.2.1. Índice de actividad diaria

Se midió de forma diaria el peso de los animales, la consistencia de las heces y el contenido de sangre fecal. Las deposiciones de los

animales se puntuaron de 0 a 4, siendo 0 las deposiciones normales y 4 las diarreicas. En cuanto al contenido de sangre fecal se analizó mediante el test Hemocult (Beckman Coulter). El índice de actividad diaria (DAI) se calculó teniendo en cuenta de forma combinada los parámetros anteriormente descritos (Siegmund et al., 2001).

#### **4.5.2.2. Infiltración de neutrófilos**

Una sección del colon distal, obtenido tras el sacrificio del animal, se fijó en formaldehído al 4% y se insertó en parafina. Secciones de 5  $\mu\text{m}$  se tiñeron con hematoxilina-eosina, tomando microfotografías con un microscopio equipado con cámara de 600 aumentos. El grado de infiltración de los neutrófilos se obtuvo contando todos los neutrófilos extrabasales por microfotografía. La puntuación obtenida representa la media del contenido de neutrófilos en 4 zonas aleatorias de mucosa y submucosa que proceden de tres secciones diferentes del colon descendente (Sina et al., 2009).

#### **4.5.2.3. Mieloperoxidasa**

La mieloperoxidasa (MPO) es un enzima utilizado como marcador de la infiltración de neutrófilos, aunque no es un enzima estrictamente específico de estos fagocitos (Vinolo et al., 2011). El análisis de la MPO se analizó en tres segmentos colónicos de cada animal siguiendo la técnica de Vieira et al. (2005). Los tejidos se homogeneizaron y centrifugaron, realizando el ensayo de la MPO

usando un kit comercial (Cayman Chemical). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

#### **4.5.2.4. Permeabilidad de la mucosa intestinal**

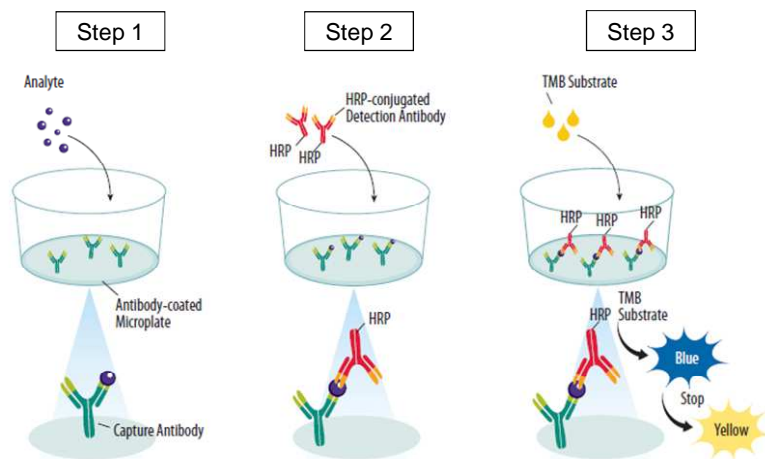
El incremento de la permeabilidad en la mucosa intestinal de los distintos grupos de animales se realizó según el método de Mutlu et al. (2011) usando como sonda fluorescente la fluoresceína isotiocianato-dextrano (FD-4; Sigma-Aldrich). Brevemente, el día del sacrificio, una hora antes se les suministró a los ratones la FD-4 (125 mg/ml) mediante sonda gástrica. Tras el sacrificio, 120 µl de sangre se centrifugaron y el plasma resultante se diluyó con tampón fosfato pH 7,4 midiendo la intensidad de fluorescencia con un lector de microplacas (Fluostar Omega, BMG). Los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia/ml de plasma.

#### **4.5.2.5. Determinación de citoquinas**

El análisis de las citoquinas se realizó mediante diversos kits comerciales (Sigma-Aldrich, R&D Systems, eBiosciences) siguiendo el protocolo descrito. El tejido colónico se lavó con tampón fosfato frío 0,02M pH 7,2. Tras homogeneización con una Ultra Turrax (IKA) las células se lisaron durante 45 segundos en un baño de ultrasonidos. Tras centrifugación, el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su análisis.

Los kits usados son kit ELISA para la detección cuantitativa y específica de las siguientes citoquinas murinas: IL1 $\beta$ , IL6, IL10, IL18, CCL5

y  $\text{TNF}\alpha$ . Así mismo, aunque el inflamasoma NLRP6 no es una citoquina, se utilizó un ELISA competitivo (R&D Systems) para determinar su concentración en colon. El principio del funcionamiento de estos ELISAs se muestra en la *figura 18*. El kit contiene una placa de 96 pocillos recubiertos de un anticuerpo específico para la citoquina de interés. Tras adicionar la muestra, la citoquina se une al anticuerpo y queda inmobilizada. Así, tras lavar con agua destilada, se adiciona un anticuerpo frente a la citoquina estudiada que porta una peroxidasa que, en contacto con la tetrametilbencidina, cambia el color de éste de azul a amarillo. Así, la intensidad de la absorbancia medida a 450 nm en un lector de microplacas (Fluostar Omega, BMG) se corresponde con el contenido de la citoquina estudiada. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$  de citoquina/100 mg de colon.



**Figura 17.** Esquema determinaciones ELISA.



#### 4.5.2.6. Expresión receptores RAGE y GPR43

El estudio de la expresión de los receptores RAGE y GPR43 durante el experimento C se realizó determinando la presencia de RNAm específico de cada receptor mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Corte-Osorio et al., 2011). De forma resumida, a partir de la homogeneización del colon, el RNAm se extrajo con Trizol, se obtuvo el cDNA correspondiente a cada uno de los receptores y se amplificó. La expresión de los receptores se realizó frente al gen constitutivo de la  $\beta$ -actina, usado como control positivo. Los primers utilizados fueron 5'-TTCAGCTGTTGGTTGAGCCTGAA-3' para el RAGE, 5'-ACCATCGTCATCATCGTT-3' para el GPR43 y 5'-AGCGCTTCCGGTGTCCA-3' para la  $\beta$ -actina. Los resultados se expresaron como número de veces que se incrementó/disminuyó la expresión del correspondiente receptor.

#### 4.5.2.7. Determinación de $\beta$ -defensinas

El análisis del contenido de la  $\beta$ -defensina murina 3 (mBD-3) se realizó mediante un kit ELISA (EIAab) específico a partir de los extractos obtenidos para la determinación de citoquinas. Los resultados se expresaron en pg de mBD-3/100 mg de colon.

#### 4.5.2.8. Estudio de la microbiota intestinal

Para evaluar el impacto de la mBD-3 sobre la microbiota intestinal, se analizó el contenido de *Faecalibacterium prausnitzii* y la

familia *Prevotellaceae*. Para ello se estudió el contenido del gen 16srRNA mediante rtPCR. Este gen se utiliza para estudios filogenéticos, ya que está altamente conservado entre diferentes especies de bacterias. Así mismo, puesto que tiene secuencias hipervariables, esto origina huellas específicas de cada especie que permite identificarlas (Kolbert and Persing, 1999). El método utilizado para la determinación de estos dos tipos bacterianos se basó en el de Maukonen et al. (2006). Así, el ADN bacteriano se extrajo y purificó de las heces de los ratones a partir de un kit comercial (QIAmp Stool Mini Kit, Qiagen) y se almacenó a -80°C hasta su análisis. El gen 16S rRNA fue parcialmente amplificado con los primers U968-f1GC y U1401-r (Qiagen) y posteriormente analizados mediante rtPCR mediante un kit comercial (Qiagen One Spte RT-PCR kit, Qiagen). La identificación y cuantificación de cada grupo bacteriano se realizó utilizando primers específicos: G-Prevo-F para *Prevotellas* y 5'-GGACTGAGAGGTTGACA-3' para *F. prausnitzii* (Matsuki et al., 2004). Los resultados se expresaron como el logaritmo decimal del número de bacterias.

#### **4.5.2.9. Contenido de sulfatasas intestinales**

Para la determinación de la presencia de sulfatasas a nivel intestinal se utilizó el ensayo colorimétrico de Clinch et al. (2002). El sustrato 4-nitrofenil-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosido-6-sulfato sódico es degradado por las sulfatasas provenientes de bacterias de cierto géneros de la familia *Prevotellaceae* hasta 4-nitrofenol, cuya

coloración amarilla permite su cuantificación. Para realizar la determinación es necesaria la utilización de una hexosaminidasa externa, proveniente de un extracto de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich). Brevemente, para la realización del ensayo, un extracto obtenido a partir de las heces de los ratones (tampón TRIS/maleato 0,05M pH 7,4) se incubó durante 20 minutos a 37°C con una solución del compuesto cromogénico (1mM),  $\beta$ -mercaptoetanol (3 mM) y el extracto de hexosaminidasa. La reacción se detiene adicionando un tampón de glicina 0,5M pH 9,6 y la liberación de nitrofenol se lee en un lector de microplacas a 410 nm (Fluostar Omega, BMG). Los resultados se expresaron como unidades de sulfatasas/g de heces secas.

#### **4.5.2.10. Determinación de ocludina**

La ocludina es una proteína que pertenece al grupo de las tight junctions intestinales, de forma que permite mantener la función barrera del epitelio intestinal (Finn et al., 2000). El contenido de ocludina a nivel colónico se realizó con un kit ELISA comercial (USCN) a partir de los extractos obtenidos para el análisis de citoquinas. Los resultados se expresaron en pg de ocludina/100 mg de colon.

#### **4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para realizar el estudio estadístico se utilizó el programa Statgraphics Plus. Las medidas se realizaron al menos por triplicado y la normalidad de los datos se comprobó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Los valores P se calcularon utilizando un test de ANOVA multifactorial y el test de la t de student. Los valores de  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

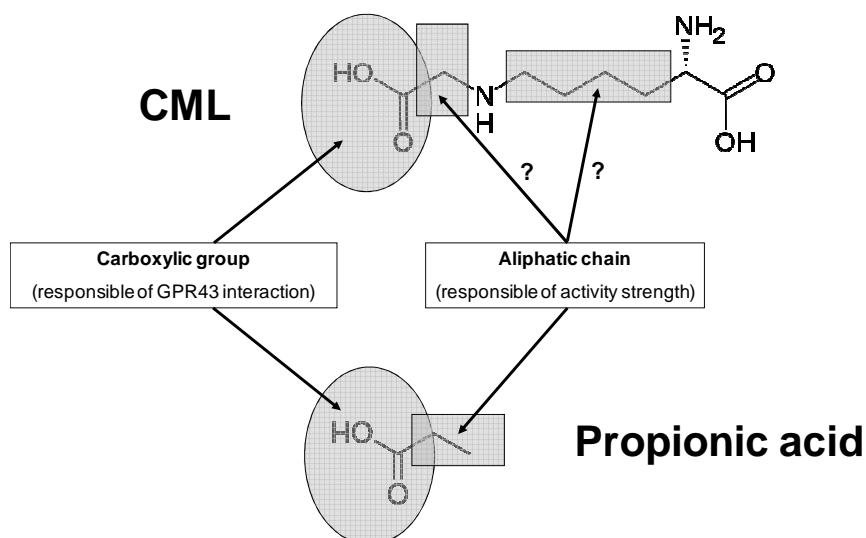


## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. EFECTO DE LA CML SOBRE EL RECEPTOR GPR43

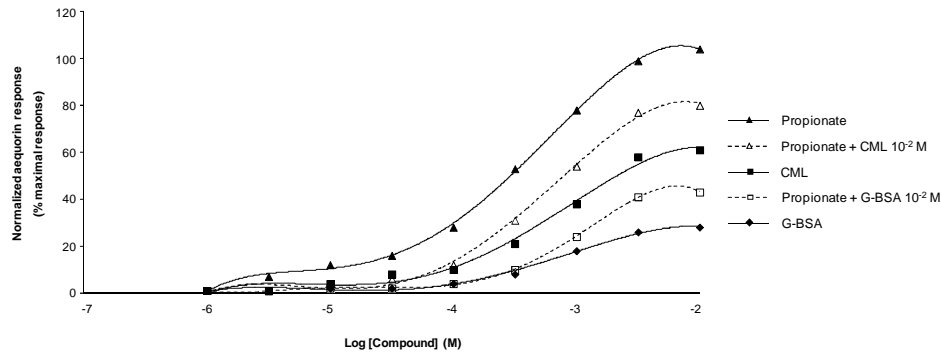
La dieta es uno de los factores principales que contribuyen a la regulación de la respuesta inmune (Maslowski and Mackay, 2011). Por un lado, están los AGEs formados durante el procesado térmico de los alimentos o en los lugares de inflamación o incluso en las úlceras intestinales producidas durante el shock hemorrágico (Raman et al., 2006) que dan lugar a una inflamación sistémica de bajo nivel (Vlassara et al., 2002). Este efecto proinflamatorio está mediado por la activación del receptor RAGE por la CML presente en las proteínas glicosiladas.

Por otro lado, están los SCFAs resultantes de la fermentación fibra dietética que, a nivel colónico, son capaces de unirse al receptor GPR43, inhibiendo en gran medida la respuesta inflamatoria ante diversos estímulos (Maslowski et al., 2009). Los SCFAs como el ácido propiónico interaccionan a través de su grupo ácido con los residuos polares TM5 y TM7 del receptor GPR43 (Xue et al., 2011). Puesto que la CML (*Figura 18*), presenta un grupo carboxílico en posición  $\epsilon$  de este aminoácido, esto podría permitir su interacción con el receptor GPR43 tal y como lo hacen los SCFAs (Lee et al., 2008).



**Figura 18.** Estructura química de la CML y ácido propiónico.

Para identificar si existe este tipo de interacción CML-GPR43 se midió la respuesta de las células CHOK1 que expresan el receptor GPR43 a través de la determinación de la intensidad lumínica a 469nm emitida por la aequorina (*Figura 19*). Tomando el ácido propiónico como referencia, se observó que la CML cristalina solo presenta la mitad de la potencia del ácido propiónico a la máxima concentración ensayada, mientras que la BSA glicosilada mostró menos del 25% de la actividad de éste. Interesantemente, la mezcla de propionato con CML o BSA-G dio lugar a una menor respuesta de la aequorina que con el propionato solo, lo que indica que la CML, al contrario que otros agonistas sintéticos del GPR43 (Wang et al., 2010; Schmidt et al., 2011) se une a mismo lugar de activación de dicho receptor, lo que resulta en una unión competitiva propionato-GPR43 ó CML-GPR43.



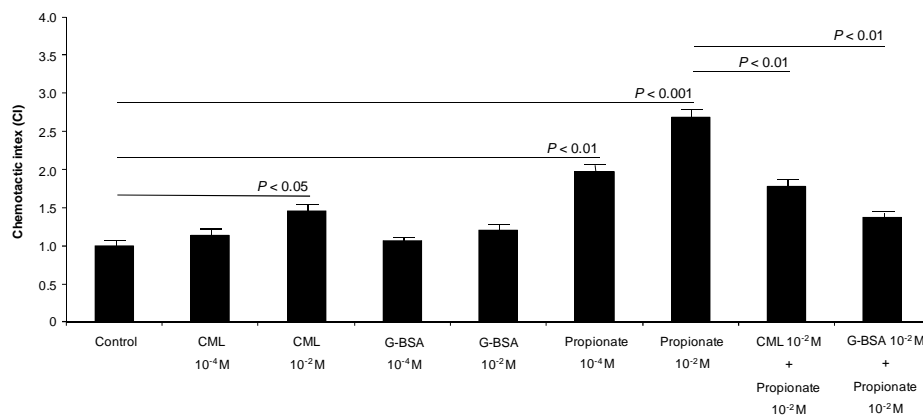
**Figura 19.** Activación del receptor GPR43 mediante propionato, CML y BSA-G.

La BSA-G, después de su digestión *in vitro*, está compuesta por una gran cantidad de péptidos de diferentes longitudes. Puesto que la cadena alifática de los SCFAs se orienta hacia un bolsillo hidrofóbico superficial formado por los residuos TM6 y TM7 (Swaminath et al., 2010) se podría pensar que la cadena alifática de la CML también se une a dicho residuo y que el resto de estructura peptídica se encuentra rodeando el sitio activo del receptor. Por ello, cuanto mayor sea la longitud del péptido, mayor será el impedimento estérico que dificulte la unión de otras moléculas de CML o SCFAs, lo que explicaría por qué la actividad de la BSA-G es menor que la de la CML cristalina y por qué ésta última tiene una menor actividad antagonista que la BSA-G.

Existen publicaciones que demuestran que el acetato (Maslowski et al., 2009), propionato (Vinolo et al., 2009) y el butirato (Sina et al., 2009) actúan como moléculas quimioattractoras de neutrófilos a través de su interacción con el receptor GPR43. Para abordar de forma



funcional el efecto de la CML y BSA-G sobre el efecto quimiotáctico inducido por el propionato, se indujo la migración de neutrófilos obtenidos de ratones control sobre filtros de policarbonato de tipo transwell. Como se puede observar (*Figura 20*) el propionato dio lugar a una potente actividad quimiotáctica a altas concentraciones, tal como han descrito otros autores (Vinolo et al., 2009). Por otro lado, la CML cristalina presentó una ligera actividad quimiotáctica sólo a altas concentraciones, mientras que la BSA-G no demostró ninguna actividad. Tal y como se esperaba, la CML y la BSA-G disminuyeron significativamente la actividad quimiotáctica de los neutrófilos en respuesta al propionato debido a la unión competitiva por el receptor GPR43.



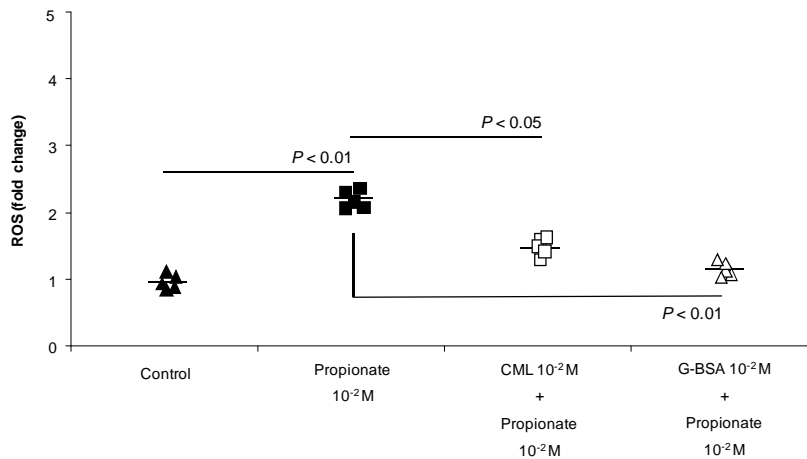
**Figura 20.** Actividad quimiotáctica de propionato, CML y BSA-G.

Posteriormente se evaluó el efecto de una serie de alimentos seleccionados por su diversa capacidad antioxidante y procesado térmico sobre la actividad quimiotáctica de los neutrófilos (Tabla 1). Como se puede observar, la actividad quimiotáctica varió en función del tipo de alimento, aunque encontramos que aquellos alimentos con un mayor contenido en CML inducían una menor quimiotaxis. Entre ellos encontramos a tubérculos muy procesados, como las patatas fritas, carne y derivados como la ternera, salchichas, salchichón o jamón de york y derivados de cereales como el pan. Por otro lado, los alimentos vegetales produjeron una menor inhibición del efecto del propionato debido a su bajo contenido en CML. Sin embargo, este efecto podría cambiar si se incluyera el efecto de la fermentación microbiana, ya que podría liberarse una mayor cantidad de SCFAs que compitieran con la CML.

**Tabla 1:** Efecto de diversos alimentos sobre la actividad quimiotáctica inducida por propionato

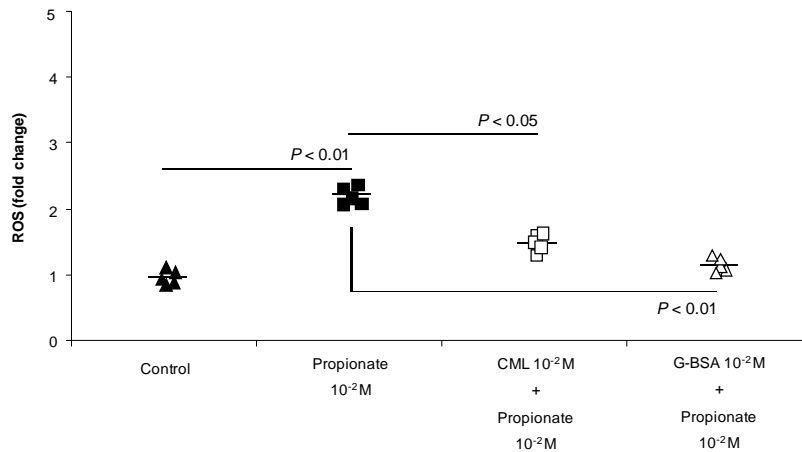
<b>Sample</b>	<b>GAR</b> (mmol trolox/Kg)	<b>CML</b> (mg/Kg)	<b>Chemotactic index</b> (fold change)
Control	-	-	1.0
Propionate 10 <sup>-2</sup> M	-	-	2.7
Wheat bread	84.5	17.4	1.7
Wheat-bran bread	108.7	24.9	1.5
Whole-grain breakfast cereals	106.3	0.6	2.7
Boiled spaghetti	72.5	1.8	2.6
Boiled rice	8.8	0.1	2.7
Fresh tomatoes	98.8	0.4	2.7
Fresh carrots	55.8	0.2	2.7
Steamed spinaches	87.8	0.1	2.7
Kiwifruit	88.9	0.2	2.7
Apples	71.6	0.2	2.7
Grilled hake	66.2	9.5	2.1
Grilled beef steak	34.8	20.5	1.5
Fried sausages	123.7	55.5	1.0
Salami-type sausage	76.4	18.3	1.6
Boiled ham	35.7	17.2	1.7
Yoghurt	64.8	0.1	2.7
Semi-cured sliced cheese	79.7	9.5	2.3
Dark chocolate	140.6	8.2	2.1
Tiramisu	48.8	37.5	1.2
Boiled lentils	105.2	4.2	2.5
Boiled red beans	163.8	4.8	2.4
Boiled chickpeas	107.4	4.6	2.4
Roasted almonds	51.1	106.0	1.1
Fried peanuts	100.2	92.9	1.0
Olives	67.2	2.7	2.6
Potato chips	51.3	46.6	1.1
Boiled egg	51.0	2.9	2.5

Para que los neutrófilos puedan ejercer su actividad fisiológica en sitios de inflamación o infección, no solo es necesario que sean atraídos quimiotácticamente, sino que también es necesario que sean capaces de fagocitar restos celulares y/o microbianos así como poder degradar estos restos a través de la actividad de las especies radicalarias de oxígeno (ROS) formadas en los peroxisomas. En este sentido, tal y como se puede observar en la *figura 21*, el propionato no solo induce la quimiotaxis de los neutrófilos sino que también induce la fagocitosis. De igual forma y coincidiendo con los resultados anteriores, tanto la CML como la BSA-G disminuyen esta actividad fagocítica, llegando incluso a suprimirla en el caso de la BSA-G.



**Figura 21.** Efecto sobre la fagocitosis de propionato, CML y BSA-G.

Unos resultados similares los encontramos cuando determinamos el efecto del propionato, CML y BSA-G sobre la formación de ROS (*Figura 22*). Así, la CML y especialmente la BSA-G disminuyeron la formación de estas especies radicalarias.



**Figura 22.** Efecto sobre la formación de ROS de propionato, CML y BSA-G.

Como conclusión de este apartado, podemos decir que los datos demuestran que la CML, ya sea libre o en forma de una proteína glicosilada, es capaz de interferir con la actividad biológica de los neutrófilos. Así mismo, aquellas actividades que impliquen la activación del receptor GPR43, como su actividad antiinflamatoria, podrían verse disminuidas a nivel fisiológico en presencia de CML proveniente de la dieta.

## 5.2. EFECTO DE LA CML SOBRE LA INFLAMACIÓN INTESTINAL AGUDA

Hay diversos estudios que indican que las proteínas glicosiladas del organismo, con una alta proporción de CML, son mediadores que sostienen la inflamación intestinal (Andrassy et al., 2006) y juegan un papel importante en la patogénesis de la disfunción de la barrera epitelial tras un shock hemorrágico (Raman et al., 2006) o sepsis severa (Lutterloh et al., 2007) a través de su unión al receptor RAGE. Así mismo, los datos obtenidos por medio de los cultivos celulares parecen indicar que la CML podría jugar un papel importante en la biología de la inflamación a través de diferentes rutas bioquímicas, por medio de la activación del receptor GPR43, a parte de la ruta clásica de la activación del receptor RAGE.

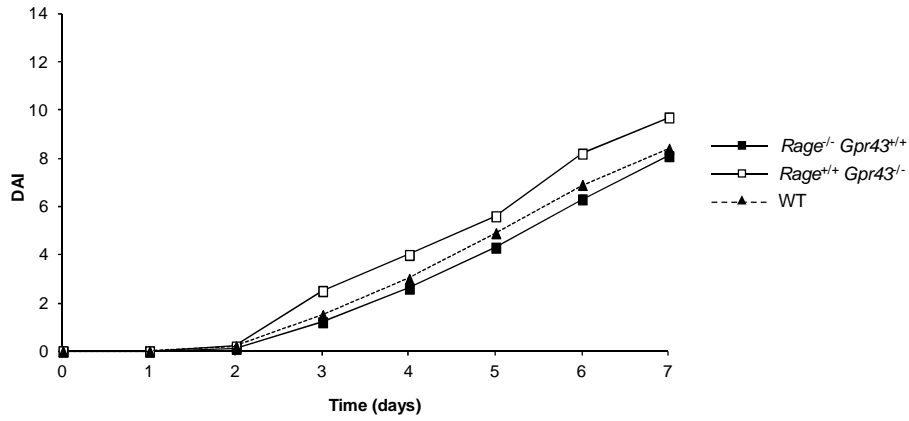
El siguiente conjunto de experimentos se realizaron induciendo una colitis aguda añadiendo DSS al 4% durante 7 días en el agua de bebida de distintos grupos de ratones. El DSS es un compuesto tóxico para el epitelio intestinal, de forma que los ratones expuestos a este reactivo desarrollan una inflamación intestinal similar a la colitis ulcerosa humana (Sina et al., 2009). Los ratones control (*WT*), *Gpr43*<sup>-/-</sup> y *Rage*<sup>-/-</sup> usados se alimentaron con una dieta enriquecida al 3% en BSA sin calentar (BSA-C) o glicosilada (BSA-G), que contenía 59 mg CML/g proteína. Teniendo en cuenta la ingesta de comida diaria de los ratones y su peso, se estimó que la ingesta diaria de CML fue de 125 mg/día, 500 veces superior a la ingesta en humanos que siguen una dieta rica en

alimentos con un elevado procesamiento térmico (Tessier and Birlouez-Aragon, 2012).

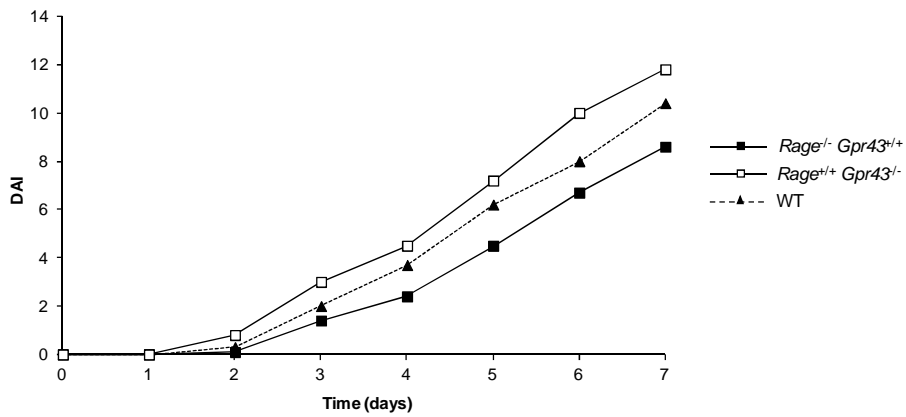
El **índice de actividad diaria (DAI)** es un marcador indirecto de la evolución de la colitis y comprende la determinación de la pérdida de peso, consistencia de las heces y presencia de sangrado fecal. Tal y como se observa en la *figura 23*, el DAI se incrementa a lo largo del desarrollo del experimento, ya que se correlaciona con una mayor inflamación, tal y como se mostrará posteriormente. Los ratones *Gpr43*<sup>-/-</sup> alimentados con BSA-C mostraron un DAI mayor que los ratones WT mientras que los ratones *Rage*<sup>-/-</sup> tuvieron un DAI menor, aunque no de forma estadísticamente significativa. Los resultados correspondientes a los ratones carentes del receptor GPR43 están en línea con los encontrados por otros autores (Maslowski et al., 2009; Sina et al., 2009) y pueden ser interpretados si se tiene en cuenta que el receptor GPR43 desarrolla una actividad antiinflamatoria a nivel intestinal; por ello, su deficiencia agravaría la inflamación inducida por el DSS. En el caso de los ratones carentes de RAGE, al ser éste un receptor proinflamatorio, desarrollarían una menor inflamación.

Cuando el experimento se hizo con ratones alimentados con BSA-G (*Figura 24*) se observó un DAI mayor en los grupos WT y *Gpr43*<sup>-/-</sup>, con diferencias estadísticamente significativas en el último día de ensayo ( $P < 0,05$ ). El mayor DAI encontrado en estos grupos podría explicarse si tenemos en cuenta el efecto de la CML. En el grupo control, la CML activaría al RAGE, produciendo un efecto proinflamatorio, y a su

vez inhibirían en cierto grado la actividad antiinflamatoria del GPR43, con el consiguiente incremento de la inflamación. En el grupo carente de GPR43, la ausencia total de actividad de este receptor, unida a la activación del RAGE daría lugar a un mayor efecto del DSS.



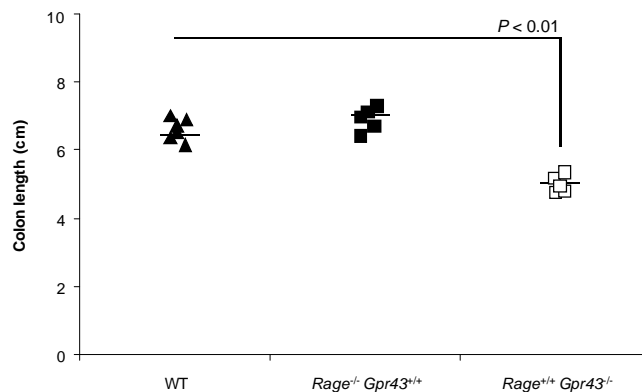
**Figura 23.** Evolución del DAI en ratones con colitis aguda inducida y alimentados con BSA-C.



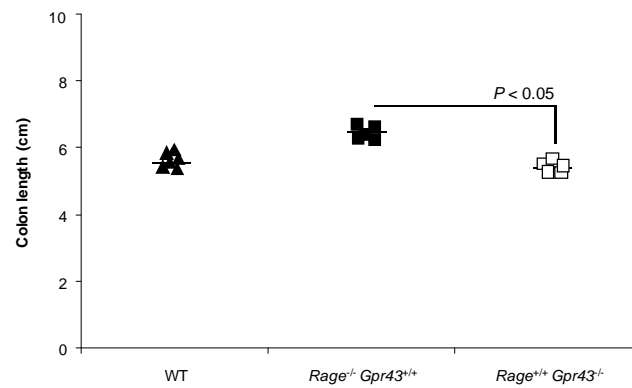
**Figura 24.** Evolución del DAI en ratones con colitis aguda inducida y alimentados con BSA-G.



Otro marcador inespecífico de inflamación intestinal es la **longitud del colon**, ya que durante el proceso inflamatorio el colon se contrae. Tal y como se observa en la *figura 25*, la longitud del colon de los ratones carentes del receptor GPR43 alimentados con BSA-C fue menor ( $P < 0,01$ ) que la de los ratones control o los ratones carentes de RAGE. Estos resultados son similares a los encontrados por Sina et al. (2009). Cuando el experimento se repitió con ratones alimentados con BSA-G (*Figura 26*), encontramos que tanto la longitud del colon de los ratones *WT* como de los *Gpr43*<sup>-/-</sup> fue menor que la de los ratones alimentados con BSA-C. Este es un resultado en línea con el DAI, ya que la CML contenida por la BSA-G activaría al receptor RAGE mientras que inhibiría la actividad beneficiosa del GPR43. Las diferencias entre todos los grupos alimentados con BSA-G fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ), teniendo una mayor longitud los ratones *Rage*<sup>-/-</sup> por ausencia de activación del receptor RAGE y sus efectos adversos.



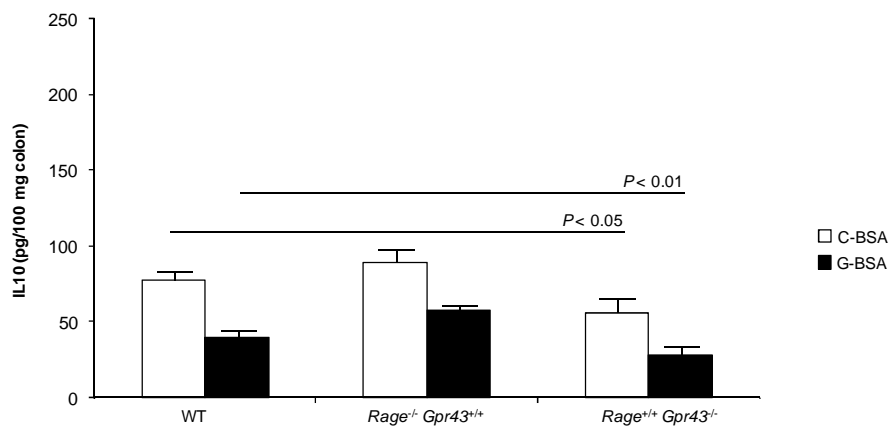
**Figura 25.** Longitud del colon en ratones con colitis aguda inducida y alimentados con BSA-C.



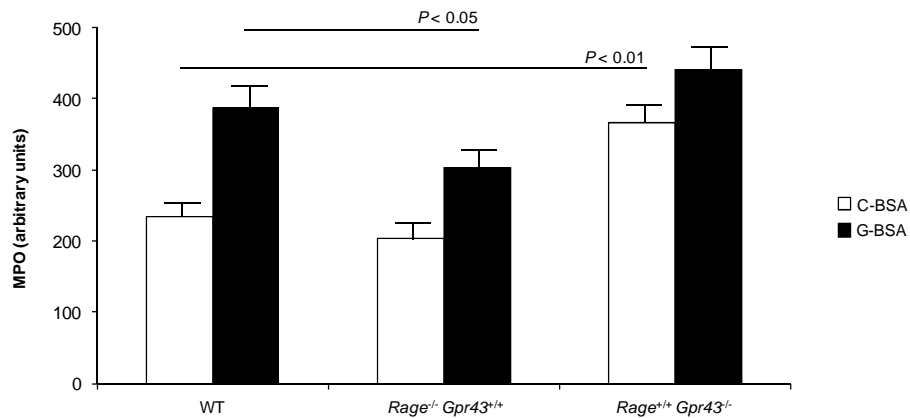
**Figura 26.** Longitud del colon en ratones con colitis aguda inducida y alimentados con BSA-G.

La inflamación intestinal se produce como respuesta del sistema inmunológico ante un daño exógeno, como es el inducido por el DSS (Yan et al., 2009). Ante este daño los neutrófilos son las primeras células que acuden al lugar afectado para producir una inflamación localizada (extensible a todo el colon en el modelo utilizado para nuestro estudio). En este estudio evaluamos el **grado de infiltración neutrofílica** mediante dos parámetros distintos: el conteo directo del número de neutrófilos en una sección definida de tejido y mediante la determinación del nivel de mieloperoxidasa, enzima ampliamente expresada en los neutrófilos para poder realizar su actividad detoxificante.

Tal y como se muestra en las *figuras 27 y 28*, los ratones alimentados con BSA-C y carentes del receptor GPR43 mostraron un mayor grado de infiltración neutrofílica ( $P < 0,01$ ) lo que indica que presentan una mayor inflamación intestinal. Así mismo, cuando los ratones se alimentaron con BSA-G el grado de infiltración de neutrófilos fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en todos los grupos cuando se compararon con los ratones alimentados con BSA-C. Estos resultados están en línea con los encontrados en los ensayos previos y pueden explicarse atendiendo a la activación del RAGE e inhibición del receptor GPR43. Esta hipótesis también permite explicar el por qué los ratones  $Rage^{-/-}$  presentan una menor infiltración de neutrófilos.



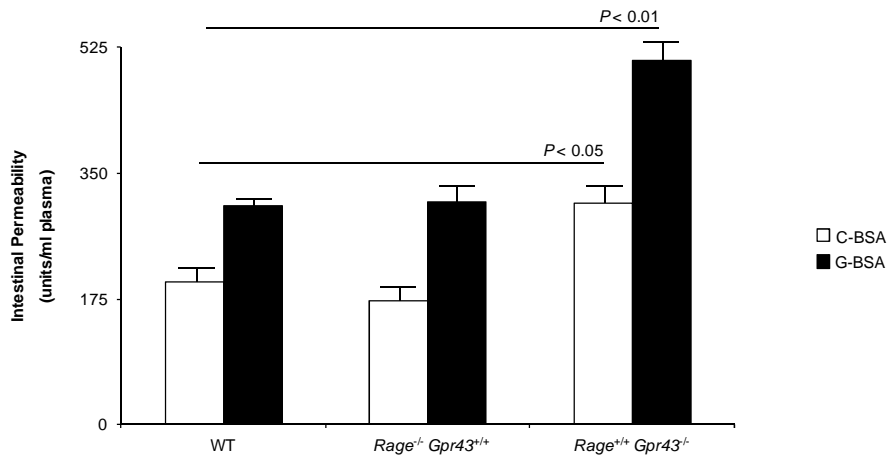
**Figura 27.** Infiltración neutrofílica en ratones con colitis aguda inducida.



**Figura 28.** Actividad de la mieloperoxidasa en ratones con colitis aguda inducida.

La acción tóxica del DSS sobre el epitelio intestinal, aparte de producir una inflamación colónica, también origina un incremento de la permeabilidad intestinal, lo que incrementa tanto la traslocación bacteriana como los niveles plasmáticos de antígenos bacterianos y la consiguiente respuesta inflamatoria a nivel sistémico (Maslowski et al., 2009; Sina et al., 2009). En nuestro caso, evaluamos la **permeabilidad intestinal** utilizando como marcador el dextrano, polisacárido no digerible cuyos niveles plasmáticos se incrementan en presencia de deficiencias en la barrera epitelial. Para poder evaluar la presencia de dextrano plasmático, se utiliza su versión conjugada con fluoresceína, molécula fluorescente con longitudes de excitación y emisión bien definidos (Yan et al., 2009).

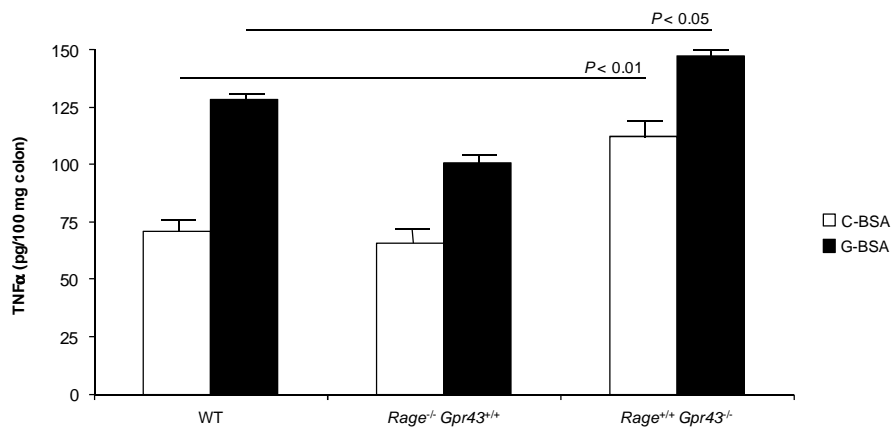
Los resultados obtenidos para la determinación de la permeabilidad intestinal (*Figura 29*) de nuevo muestran que los ratones carentes del receptor GPR43, debido a su mayor daño epitelial, presentan una mayor permeabilidad intestinal ( $P < 0,05$ ) datos que concuerdan con los encontrados por otros autores (Sina et al., 2009). De igual forma, la administración de CML a partir de la dieta incrementó significativamente la permeabilidad intestinal ( $P < 0,05$ ) en todos los grupos, debido a que este AGE potencia la acción tóxica del DSS mediante la activación del RAGE y el bloqueo parcial de la actividad del GPR43.



**Figura 29.** Permeabilidad intestinal en ratones con colitis aguda inducida.

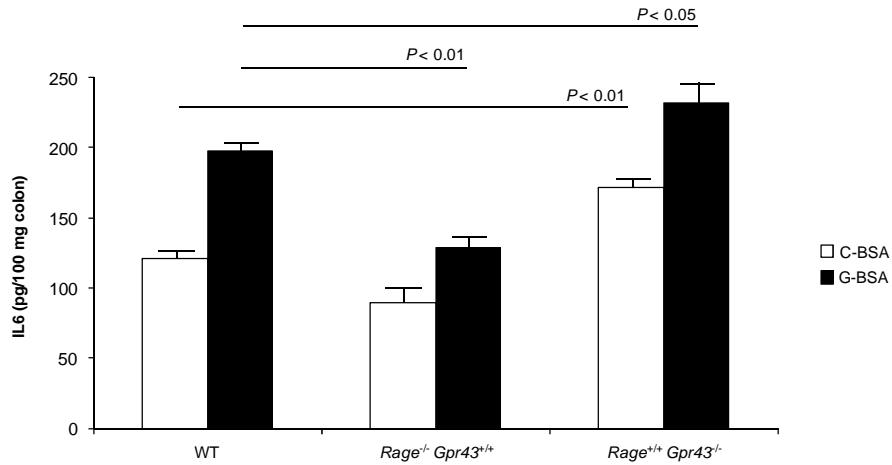
Las **citoquinas** son proteínas de bajo peso molecular producidas por varios tipos celulares, principalmente por el sistema inmune, esenciales para la comunicación intercelular. Estos mediadores solubles

controlan muchas funciones fisiológicas críticas como la inflamación y respuesta inmune local y sistémica o la reparación tisular. Así, durante la inflamación intestinal la proporción de diversas citoquinas se ve alterada. El factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) es una citoquina proinflamatoria secretada por los macrófagos cuyas concentraciones se incrementan durante la fase aguda de los procesos inflamatorios. Como se puede observar en la *figura 30*, al igual que ocurría con los demás marcadores estudiados en la inflamación aguda, los ratones carentes de GPR43 presentaron mayores concentraciones de TNF $\alpha$  colónico ( $P < 0,05$ ), debido a una mayor inflamación derivada de la ausencia de actividad antiinflamatoria derivada de dicho receptor. Así mismo, todos los grupos estudiados mostraron un incremento en las concentraciones de esta citoquina proinflamatoria cuando se alimentaron con BSA-G.



**Figura 30.** Secreción de TNF $\alpha$  en ratones con colitis aguda inducida.

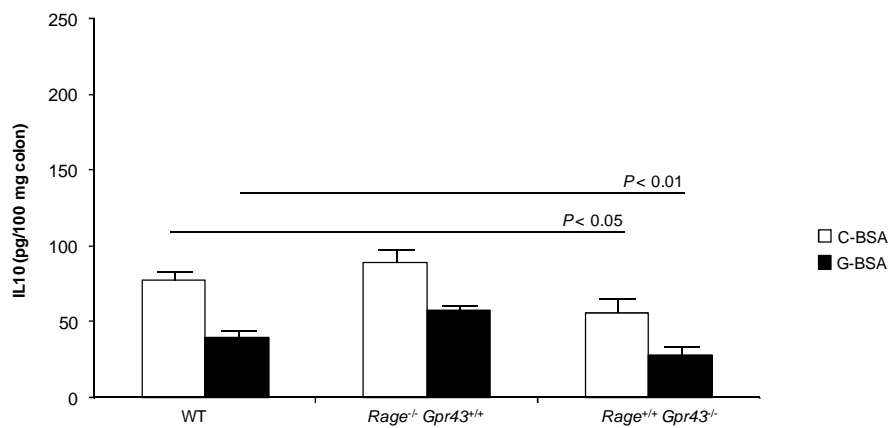
Otra citoquina proinflamatoria que se vio incrementada de la misma manera fue la IL6 (Figura 31). Esta citoquina es liberada por los macrófagos activados y mostró un comportamiento similar al TNF $\alpha$ .



**Figura 31.** Secreción de IL6 en ratones con colitis aguda inducida.

En cuanto a las citoquinas antiinflamatorias, la IL10 es producida principalmente por los monocitos y presenta una actividad esencialmente inmunoreguladora, ya que bloquea la actividad del NF $\kappa$ B (Braat et al., 2006). En el caso de esta citoquina, al ser su actividad antiinflamatoria, sus niveles fueron menores en los ratones *Gpr43*<sup>-/-</sup> tal y como muestran los resultados de otros grupos de investigación (Sina et al., 2009). La alimentación de los ratones con BSA-G, tal y como era de esperar, disminuyó de forma significativa ( $P < 0,05$ ) las concentraciones colónicas de IL10 en todos los grupos estudiados (figura 32).

Como conclusión al efecto de la BSA-G sobre un modelo murino de inflamación intestinal aguda, se puede proponer un **mecanismo de dos vías** que explicaría la actividad de la CML dietética: por un lado, **la CML activaría al receptor RAGE**, dando lugar a la transcripción del NFkB lo que originaría una mayor migración de células inmunes hasta el lugar de daño epitelial. Así, la consiguiente liberación de citoquinas proinflamatorias originaría una inflamación que cursaría con un incremento de la permeabilidad intestinal. Por otro lado, **la CML bloquearía al receptor GPR43**, de forma que disminuiría el efecto antiinflamatorio inducido por los SCFAs provenientes de la fibra dietética.



**Figura 32.** Secreción de IL10 en ratones con colitis aguda inducida.

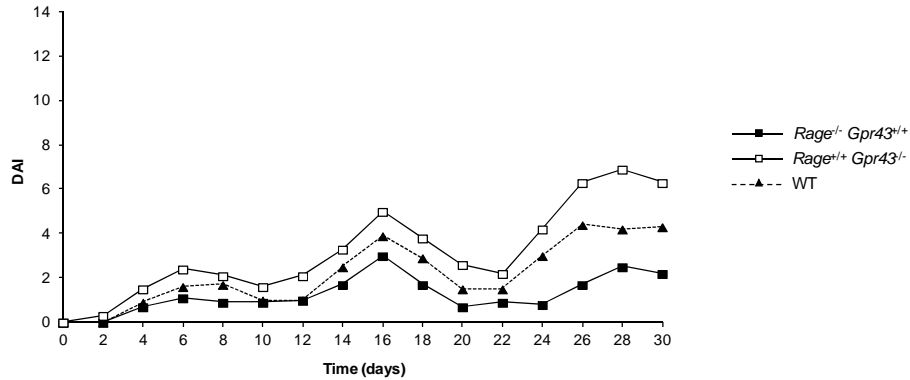


### 5.3. EFECTO DE LA CML SOBRE LA INFLAMACIÓN INTESTINAL CRÓNICA

Como se ha observado en los apartados anteriores, la migración y actividad de los neutrófilos se ve alterada por la presencia de CML, ya que ésta bloquea la acción mediada por el receptor GPR43 en presencia de ácidos grasos de cadena corta. Así, en los procesos inflamatorios los neutrófilos desempeñan un papel fisiopatológico paradójico, ya que son necesarios para evitar la traslocación microbiana tras una alteración de la barrera intestinal, pero a su vez tienen un papel perjudicial en procesos de tipo crónico, ya que la liberación de ROS y citoquinas proinflamatorias impiden la resolución de dicha inflamación (Sina et al., 2009).

Para evaluar el efecto de la CML en un modelo de inflamación crónica, administramos DSS al 2% durante 30 días, alternando ciclos de 5 días de exposición con 5 días de recuperación. Como se puede observar en la *figura 33*, todos los grupos de ratones sufrían episodios de incremento del **DAI**, seguidos de episodios de recuperación, los cuales se correlacionaban con la exposición o no al DSS. Al igual que ocurría con la colitis aguda, los ratones *Gpr43*<sup>-/-</sup> presentaron más diarrea, pérdida de peso y sangrado fecal, que se fue incrementando con la sucesión de episodios inflamatorios. Por el contrario, los ratones *Rage*<sup>-/-</sup> mostraron un DAI menor. Tanto estos ratones como los ratones *WT* conseguían recuperarse parcialmente del daño epitelial inducido por el DSS a partir del segundo ciclo, mientras que los ratones carentes del

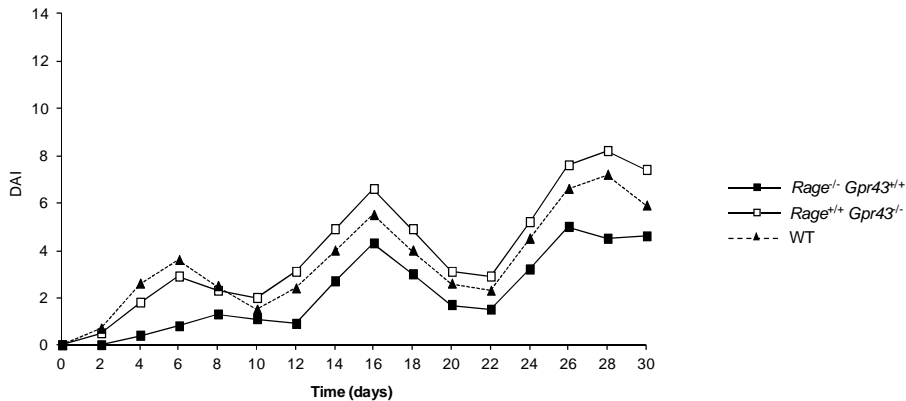
GPR43 no solo no se recuperaron tan bien sino que desarrollaban un mayor daño en posteriores ciclos. Esto podría deberse a la ausencia del efecto antiinflamatorio inducido por el receptor GPR43.



**Figura 33.** Evolución del DAI en ratones con colitis crónica inducida y alimentados con BSA-C.

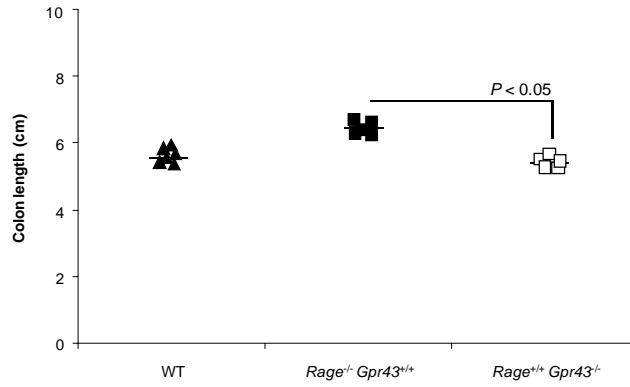
Cuando los ratones se alimentaron con BSA-G, todos los grupos mostraron un mayor DAI cuando se compararon con los ratones alimentados con BSA-C (*Figura 34*). Esto puede explicarse atendiendo al efecto que desempeña la CML en los receptores RAGE y GPR43. Por un lado, los ratones carentes del GPR43 desarrollan una mayor inflamación, debido tanto a la ausencia del efecto antiinflamatorio de este receptor como a un efecto proinflamatorio mediado por la activación del receptor RAGE. Debido a la conjunción de estos dos factores, estos ratones alimentados con BSA-G pierden más peso, tienen más diarrea y sangrado fecal. En el caso de los ratones *WT*, el mayor DAI encontrado en la última semana de tratamiento se puede explicar atendiendo a la

activación del receptor RAGE y al bloqueo parcial del GPR43 mediada por la CML presente en la BSA-G. Finalmente, los ratones *Rage*<sup>-/-</sup>, aunque carecen de dicho receptor, presentan un DAI mayor que el de sus congéneres alimentados con BSA-C debido a la menor actividad del GPR43 por competencia entre la CML y los SCFAs.

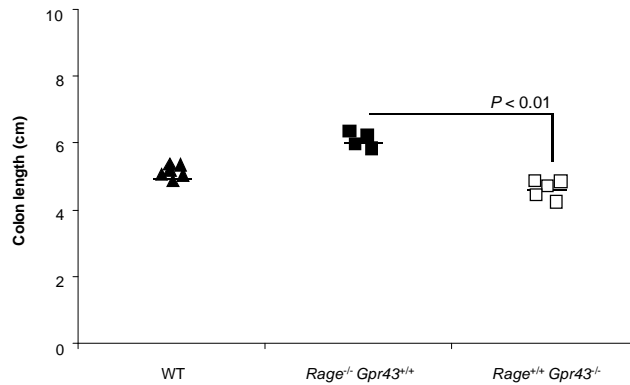


**Figura 34.** Evolución del DAI en ratones con colitis crónica inducida y alimentados con BSA-G.

Respecto a la **longitud del colon**, los resultados obtenidos fueron los esperados (*Figura 35*), ya que los ratones *Gpr43*<sup>-/-</sup> mostraron una menor longitud colónica ( $P < 0,05$ ) cuando se compararon con los ratones *Rage*<sup>-/-</sup>. Esto puede explicarse atendiendo al efecto protector de la ausencia del receptor RAGE y al efecto perjudicial de la ausencia del GPR43. Cuando los ratones se alimentaron con BSA-G todos los grupos mostraron una longitud del colon menor (*Figura 36*) debido al efecto de la CML sobre los distintos receptores estudiados.



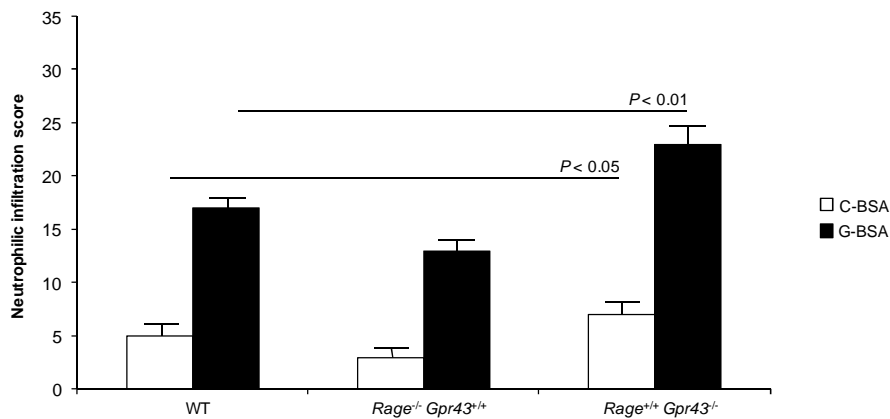
**Figura 35.** Longitud del colon en ratones con colitis crónica inducida y alimentados con BSA-C.



**Figura 36.** Longitud del colon en ratones con colitis crónica inducida y alimentados con BSA-G.

Una vez estudiados los signos macroscópicos derivados de la inflamación intestinal crónica, se procedió a estudiar el **grado de infiltración de los neutrófilos** en la mucosa. Como se puede observar (*Figura 37*) el número de neutrófilos infiltrados en la mucosa era mayor

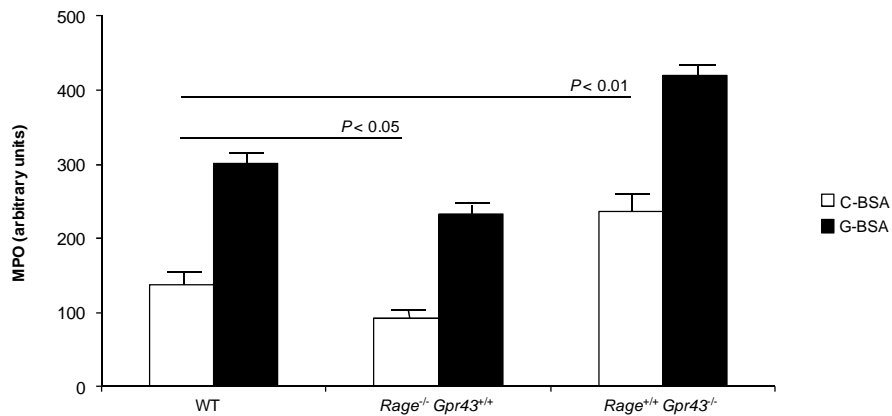
en los ratones carentes del receptor GPR43 ( $P < 0,05$ ). Cuando éstos se alimentaron con BSA-G, el grado de infiltración fue mayor ( $P < 0,01$ ) de acuerdo a una mayor activación del receptor RAGE. Así mismo, un resultado a tener en cuenta es que en el modelo de inflamación crónica existe una mayor diferencia en el grado de infiltración entre los ratones que tomaban la dieta enriquecida con BSA-C y los que tomaban la BSA-G. Esto podría deberse al mayor tiempo de exposición al DSS y a la CML dietética, lo que daría lugar a una mayor migración de neutrófilos al foco inflamatorio cuando se comparan con los ratones que toman una dieta con una menor ingesta de CML.



**Figura 37.** Infiltración neutrofílica en ratones con colitis crónica.

Tal y como se comentó para la colitis aguda, la determinación del nivel de MPO evalúa de forma indirecta el número de neutrófilos activos que se encuentran presente en la mucosa intestinal. Así, los resultados

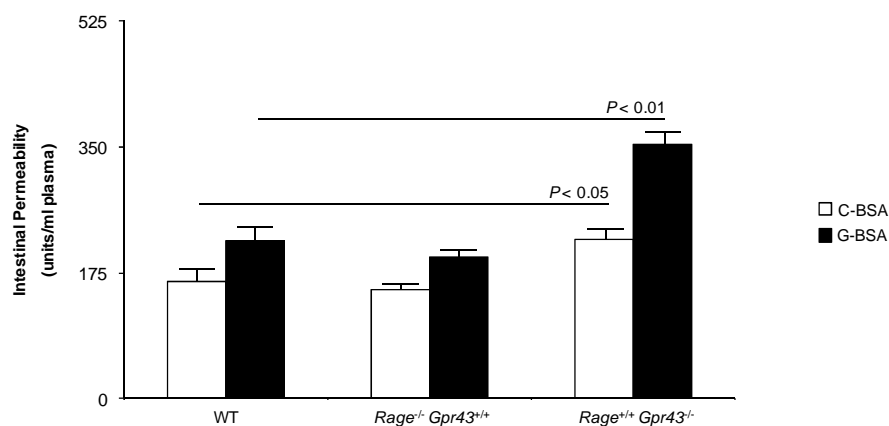
encontrados (*Figura 38*) son concordantes con el conteaje de neutrófilos mediante técnicas microscópicas (*Figura 37*).



**Figura 38.** Actividad de la mieloperoxidasa en ratones con colitis crónica inducida.

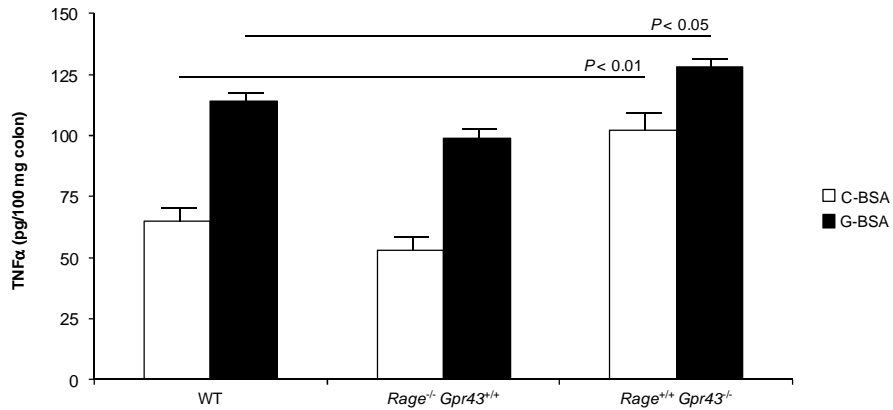
Cuando se evaluó el grado de alteración de la **permeabilidad intestinal** (*Figura 39*) se observó que ésta era menor que en el caso de la colitis aguda (*Figura 29*). Esto es un resultado esperable y coincidente con los datos publicados por otros autores (Maslowski et al., 2009; Sina et al., 2009) ya que en el modelo agudo el daño epitelial es mayor debido a que existe una mayor concentración del DSS y a su administración de forma ininterrumpida. Aunque la administración de BSA-G incrementaba la permeabilidad intestinal, este incremento sólo fue estadísticamente significativo para los ratones carentes del receptor GPR43. Por otro lado, aunque los ratones carentes del RAGE presentaron una permeabilidad menor, esta no fue estadísticamente

significativa, lo que indicaría que a nivel de permeabilidad intestinal juega un papel principal el receptor GPR43, mientras que el receptor RAGE juega un papel secundario.



**Figura 39.** Permeabilidad intestinal en ratones con colitis crónica inducida.

Para finalizar el estudio de la colitis crónica, se determinó el contenido colónico de **citoquinas** pro- y antiinflamatorias. Los niveles de TNF $\alpha$  (*figura 40*) e IL6 (*figura 41*), como era de esperar, fueron superiores en los ratones *Gpr43*<sup>-/-</sup> ya estuvieran alimentados con la dieta enriquecida en BSA-C o BSA-G. Sin embargo, aunque los niveles fueron inferiores a los encontrados en la colitis aguda, no fueron significativamente diferentes, especialmente en la dieta con BSA-G, lo que indicaría que la exposición prolongada a la CML da lugar a una mayor liberación de citoquinas proinflamatorias por sobreexpresión de la vía del NF $\kappa$ B.

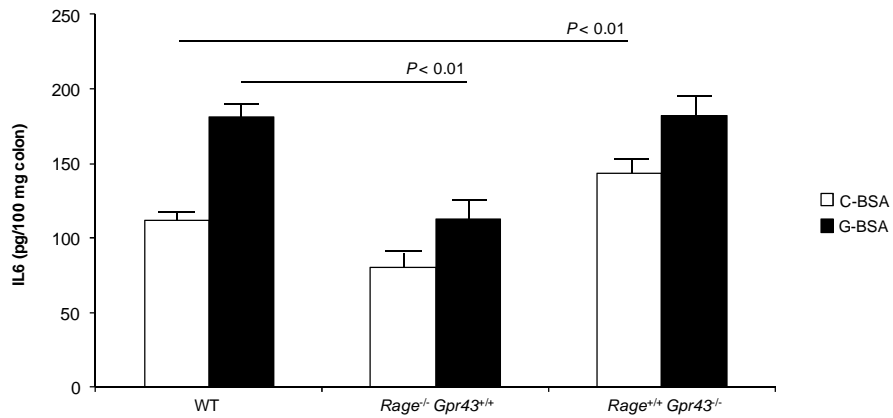


**Figura 40.** Secreción de TNF $\alpha$  en ratones con colitis crónica inducida.

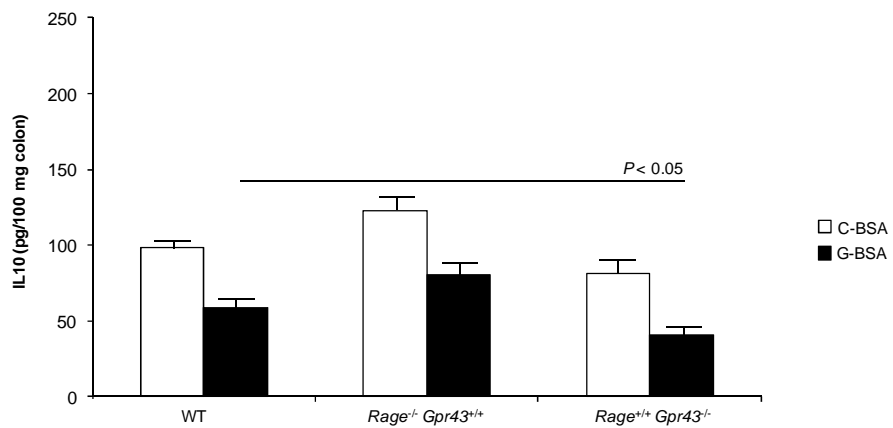
Esta hipótesis relativa al efecto de la exposición prolongada de CML sobre la secreción de citoquinas se confirma con los datos obtenidos para la IL6 (*Figura 41*) la cual tiene un comportamiento similar al TNF $\alpha$ . Sin embargo, los niveles de citoquinas antiinflamatorias como la IL10 (*Figura 42*) disminuyeron en menor proporción que el incremento de las proinflamatorias cuando comparamos colitis aguda y crónica. Este es un resultado muy interesante que podría explicar el por qué, aunque haya una producción de citoquinas proinflamatorias similar a la colitis aguda, sin embargo los signos clínicos de inflamación (DAI, permeabilidad intestinal, etc.) son más leves que en dicha colitis. En la colitis crónica, la presencia continuada de CML produciría una sobreactivación del NF $\kappa$ B, produciendo una mayor liberación de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, puesto que el bloqueo del GPR43 es parcial, se seguirían produciendo cantidades suficientes de



IL10, especialmente durante las fases de no exposición al DSS, que permitirían desarrollar unos signos clínicos leves.



**Figura 41.** Secreción de IL6 en ratones con colitis crónica inducida.



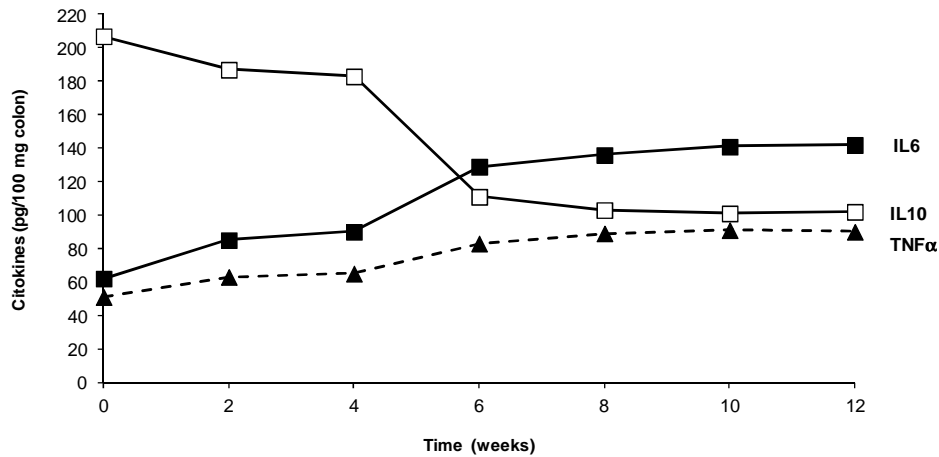
**Figura 42.** Secreción de IL10 en ratones con colitis crónica inducida.

Como conclusión, se podría decir que la CML administrada durante un proceso inflamatorio crónico incrementa el nivel de inflamación y la gravedad de los signos clínicos, aunque sin llegar a los desarrollados durante una inflamación de tipo agudo. Así, la ingesta elevada de CML podría prolongar o incluso agravar las recidivas de la colitis crónica en aquellos pacientes con una dieta muy rica en alimentos procesados térmicamente, ya que se produciría una mayor liberación de citoquinas proinflamatorias que dificultarían alcanzar el periodo de remisión, una característica de la enfermedad inflamatoria intestinal.

#### 5.4. EFECTO DE LA INGESTA DE CML A LARGO PLAZO

Se sabe que la inflamación fisiológica es beneficiosa para el intestino, mientras que la producción exagerada de mediadores inflamatorios contribuye a la patogénesis de la inflamación intestinal (Dupaul-Chioine et al., 2010). Tal y como se ha mostrado en el apartado de la colitis crónica, la ingesta elevada de CML durante 30 días produjo la liberación de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias. Así mismo, en los experimentos realizados sobre la colitis aguda se observó que la CML producía su efecto proinflamatorio mediante dos mecanismos: activación del RAGE y bloqueo parcial del GPR43. Por todo ello, se procedió a estudiar el efecto que tiene la ingesta elevada de CML, suministrada en forma de BSA-G, durante un periodo prolongado de tiempo (3 meses) en ratones *WT* sin colitis inducida.

Tal y como se observa en la *figura 43*, la secreción de citoquinas proinflamatorias, TNF $\alpha$  e IL6, se incrementó a lo largo del tiempo, mostrando dos períodos de producción elevada: durante las primeras 2 semanas y entre la 4<sup>a</sup> y la 6<sup>a</sup> semana. Así mismo, durante esos periodos se produjo un rápido descenso en la secreción de IL10. Estos datos sugieren que la CML dietética debe activar al RAGE, de forma que la señalización vía NF $\kappa$ B produzca la secreción de citoquinas proinflamatorias, mientras que el bloqueo del GPR43 daría lugar a una disminución en la producción de la citoquina antiinflamatoria IL10.



**Figura 43.** Secreción de citoquinas durante ingesta prolongada de CML.

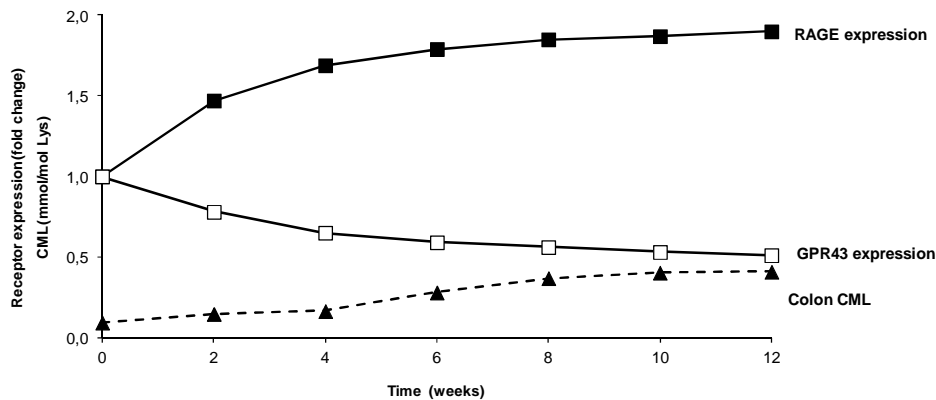
El RAGE es un receptor inducible, lo que significa que su expresión en la superficie celular está regulada a nivel transcripcional (Bierhaus et al., 2005). De hecho, esta inducción es la responsable en parte del prolongado efecto proinflamatorio del RAGE mediado por la activación del NF $\kappa$ B. Efectivamente, este efecto es capaz de sobrepasar los feedback inhibitorios autoreguladores ya que la activación del NF $\kappa$ B da lugar a la transcripción y mayor producción de más RAGE, por lo que la activación sostenida de este receptor da lugar a una amplificación de la señal producida por la CML. Así, las células inmunológicas como los neutrófilos sólo expresan pequeñas cantidades de RAGE en condiciones fisiológicas, pero cuando sus ligandos se acumulan su expresión se induce a nivel transcripcional (Bucciarelli et al., 2002). De igual forma, el receptor GPR43 es un receptor inducible (Corte-Osorio et al., 2011). Así, la ingesta elevada de fibra fermentable o la adición de SCFAs al agua de

bebida de ratas de laboratorio, incrementa la expresión de GPR43 a nivel colónico.

Cuando se realizó el análisis de la expresión de los receptores GPR43 y RAGE en el tejido colónico de los ratones estudiados (*Figura 44*) se observó que los niveles de RAGE se incrementaban con el tiempo, especialmente durante las primeras 6 semanas, mientras que los niveles de GPR43 disminuían. Este es un resultado lógico si se tiene en cuenta que la CML presente en la BSA-G es capaz de activar al RAGE, de forma que se produciría su inducción. Al contrario, el bloqueo parcial del GPR43 hace que éste no pueda ser activado de forma correcta por los SCFAs generados durante la fermentación de la fibra, de forma que se produciría el efecto inverso, una disminución en su expresión. Así mismo, los mayores cambios acontecidos durante las 6 primeras semanas se correlacionan con el periodo en el que más rápido crece la secreción de citoquinas proinflamatorias y la disminución de las antiinflamatorias, lo que nos lleva a pensar en una conexión directa entre la activación de estos receptores y la activación inmunológica.

La glicosilación de proteínas está relacionada con diversos mecanismos patológicos como las complicaciones vasculares derivadas de la diabetes o incluso el envejecimiento (Thornalley et al., 2003). Así, a nivel intestinal una alta proporción de CML parece ser perjudicial para la barrera epitelial tras un shock hemorrágico (Raman et al., 2006) o el desarrollo de sepsis (Lutterloh et al., 2007). En este sentido la *figura 44* muestra que el contenido de CML colónica se incrementaba con el

tiempo, especialmente en la 2ª y entre la 4ª y 6ª semana, tal y como ocurrió con las citoquinas proinflamatorias. Puesto que la glicosilación de las proteínas que se encuentran en los tejidos se produce por un elevado estrés oxidativo, podemos suponer que en este caso es consecuencia de una mayor inflamación a nivel intestinal. Así, estos resultados están en los mismos niveles que los encontrados a nivel renal o en retina de ratas diabéticas (Thornalley et al., 2003).



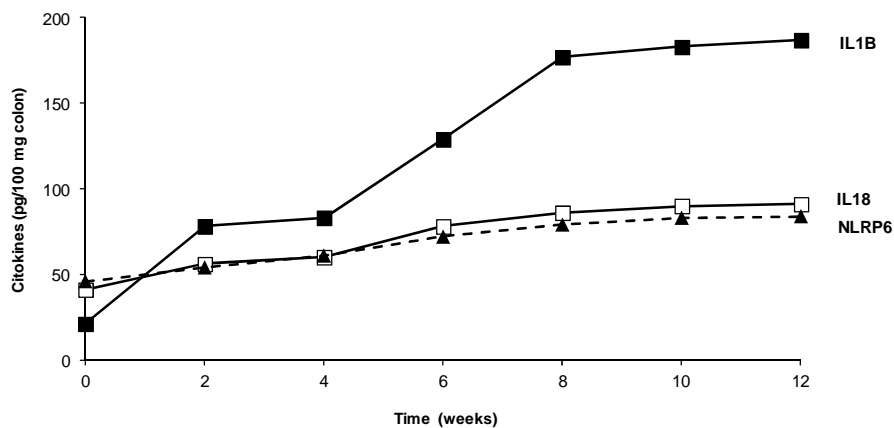
**Figura 44.** Expresión de RAGE, GPR43 y contenido colónico de CML durante ingesta prolongada de CML.

Los inflammasomas son complejos multiproteicos que reconocen distintos tipos de productos microbianos. Por ejemplo, el NLRP6 es un inflammasoma que se asocia con la homeostasis y/o señales moleculares protectoras. La activación de los inflammasomas está bien descrita en células del sistema inmunológico innato, aunque también se activan en células que no pertenecen a este sistema, como son las células del epitelio intestinal (Macia et al., 2012).

El papel de los inflammasomas en la inflamación fisiológica ha sido demostrado en los trabajos de diversos grupos de investigación que indican que la deficiencia de los inflammasomas NLRP3 ó NLRP6 se correlaciona con una patología más severa en un modelo de colitis inducida por DSS (Dupaul-Chicoine, 2010; Elinav et al., 2011; Zaki et al., 2011; Strowig et al., 2012). Sin embargo, la ausencia de activación de algún inflammasoma está relacionada con la mejora de patologías como la gota (Vieira et al., 2011; Macia et al., 2012). Estos autores han encontrado que los ratones carentes del receptor GPR43 no desarrollan gota cuando se les inyecta cristales de ácido úrico en sus articulaciones, aunque estos cristales activan de forma directa al NLRP3 en ratones normales. Como los ratones deficientes en GPR43 son más susceptibles a desarrollar una colitis por DSS (Maslowski et al., 2009), todos estos datos parecen indicar que los SCFAs, al unirse al receptor GPR43 participarían en la activación del inflammasoma en tejidos intestinales, promoviendo la integridad del epitelio, principalmente a través de la secreción de IL18 y la regulación de la IL1 $\beta$  (Elinav et al., 2011).

La *figura 45* muestra el contenido colónico del inflammasoma NLRP6 así como el nivel de citoquinas IL1 $\beta$  e IL18. El contenido de NLRP6 se incrementó ligeramente a lo largo del tiempo, aunque no de forma significativa. Puesto que parece existir una relación entre la activación del GPR43 y la activación de los inflammasomas, el bloqueo de dicho receptor por parte de la CML sería el responsable del pequeño incremento en la concentración de este inflammasoma. Los niveles de

IL18, citoquina responsable de mantener la homeostasis epitelial a nivel intestinal, se incrementaron de forma similar a como lo hizo el NLRP6. Sin embargo, los niveles de IL1 $\beta$ , citoquina proinflamatoria secretada principalmente por los macrófagos activados, se incrementaron notablemente durante las primeras dos semanas y posteriormente entre la 4<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup> semanas. Así, la secuencia temporal indica que la ingesta elevada de CML produciría durante las primeras 2 semanas una sobreactivación del RAGE, con la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias que activarían a los neutrófilos y macrófagos presentes en la mucosa, que serían los encargados de secretar la IL1 $\beta$ . Sin embargo, otro tipo de rutas deben activarse que puedan explicar el posterior incremento producido a partir de la cuarta semana.



**Figura 45.** Contenido de NLRP6 y citoquinas relacionadas durante ingesta prolongada de CML.

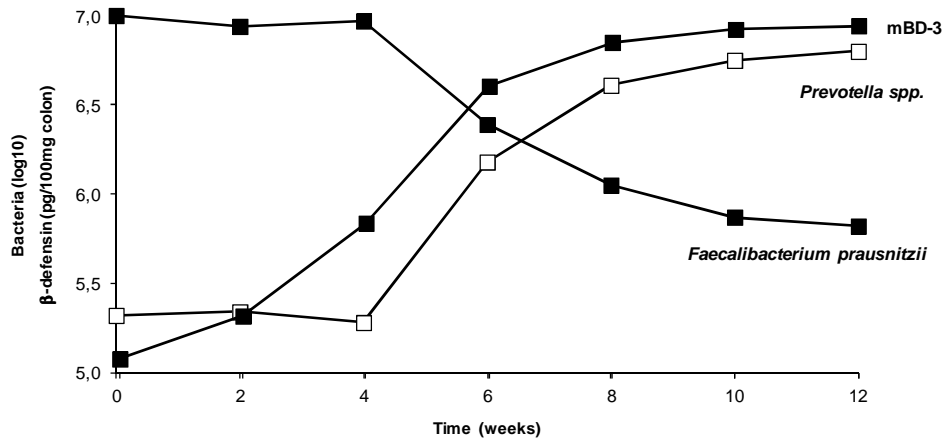


Las defensinas son péptidos antimicrobianos producidos en diferentes epitelios. En el tracto gastrointestinal contribuyen a la inmunidad intestinal y ayudan a mantener el balance entre la protección frente a los patógenos y la tolerancia ante la microbiota normal (Ramasundara et al., 2009). En el colon, las células epiteliales secretan  $\beta$ -defensinas como la mBD1, que se expresa constitutivamente. Sin embargo, otras defensinas como la mBD-3, son inducidas por varios estímulos de tipo inflamatorio o infeccioso. Aunque la ruta responsable de dicha inducción no está totalmente descrita, parece que comprende la activación del NF $\kappa$ B, el cual dispara la transcripción de los genes que regulan la síntesis de  $\beta$ -defensinas (Voss et al., 2006).

Diversos autores sugieren que una producción alterada de defensinas puede ser un elemento importante en la patogénesis de la EII (Ramasundara et al., 2009). Por ejemplo, Fahlgren et al. (2003) encontraron que la HBD-3 (análogo humano de la defensina murina mBD-3) está expresada mínimamente en el epitelio intestinal normal, pero se encuentra sobreexpresada en el tejido colónico de pacientes con colitis ulcerosa. Como las respuestas del sistema inmune intestinal están dirigidas contra las bacterias lumbinales, un defecto en la expresión y/o función de las defensinas podría dar lugar a una desregulación de la microbiota y la homeostasis intestinal.

En la *figura 46* podemos observar que el contenido de de la  $\beta$ -defensina murina 3 (mBD-3) se incrementa desde el comienzo del ensayo y especialmente en las primeras 6 semanas. Tal y como se

destacó en las anteriores figuras, los cambios en el contenido de citoquinas y expresión de receptores también se produjo a mayor velocidad durante este mismo periodo, debido a la acción de la CML sobre los receptores RAGE y GPR43. Así, la inducción de la mBD-3 sería una consecuencia de la activación de del NFkB subsecuente a la activación del RAGE por la CML.



**Figura 46.** Evolución de mBD-3 y especies bacterianas durante la ingesta prolongada de CML.

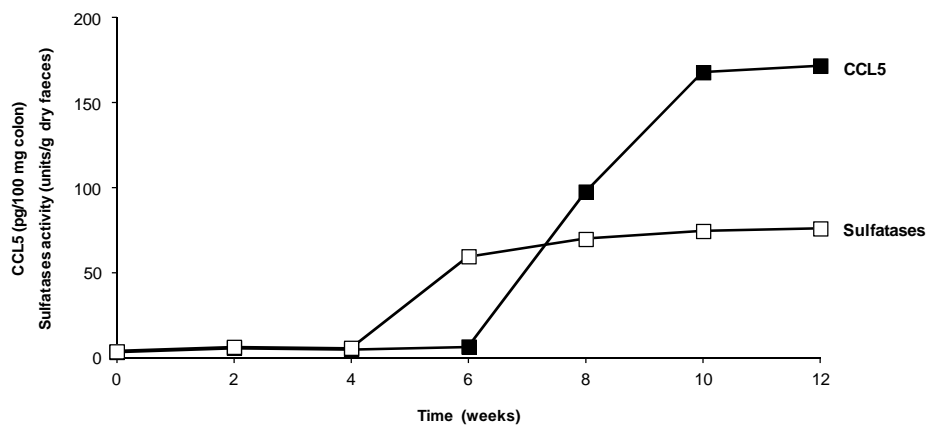
Otros datos importantes que se encuentran en la *figura 46* es que la concentración de algunas especies de la microbiota cambia a lo largo del tiempo. El *Faecalibacterium prausnitzii* es una bacteria tolerogénica con actividad antiinflamatoria que se encuentra disminuida en pacientes con enfermedad de Crohn (Sokol et al., 2008). Por otro lado, algunos géneros de la familia *Prevotellaceae* (como *Prevotella* cepa RS2) son capaces de alterar la función barrera a partir de la producción

de sulfatasas que degradan los oligosacáridos (mucinas) del mucus intestinal (Wright et al., 2000). Estas enzimas se encuentran elevadas en pacientes con EII (Tsai et al., 1995) por lo que sería plausible que el incremento de estas bacterias produjera una degradación del moco protector que permitiría que un mayor número de antígenos bacterianos entraran en contacto con el sistema inmunológico intestinal, produciendo una respuesta inflamatoria exacerbada.

Elinav et al. (2011) encontraron que los ratones deficientes en el inflammasoma NLRP6 no solo eran más susceptibles a desarrollar una inflamación severa tras la administración de DSS, sino que tenían una microbiota alterada, con mayor proporción de bacterias *Prevotellaceae* y del phylum *TM7*, que podía transmitirse de unos ratones a otros. Así mismo, estos autores encontraron que los cambios de la microbiota se debían en parte a una menor secreción de IL18 (relacionada con la ausencia de NLRP6) aunque no descartaban que existieran otros mecanismos adicionales de regulación. Los resultados hallados en el ensayo con CML concuerdan con los hallazgos de estos autores, ya que la concentración de NLRP6 e IL18 prácticamente no cambian a lo largo del experimento. Puesto que el cambio en la composición de las especies analizadas no se produjo hasta que las concentraciones de la defensina mBD-3 no fueron altas, ésta podría ser otra ruta de regulación de la microbiota, tal y como se apunta en el trabajo de Elinav.

Tal y como se muestra en la *figura 47*, el contenido de sulfatasas intestinales se incrementó entre la 4ª y 6ª semanas, periodo de tiempo

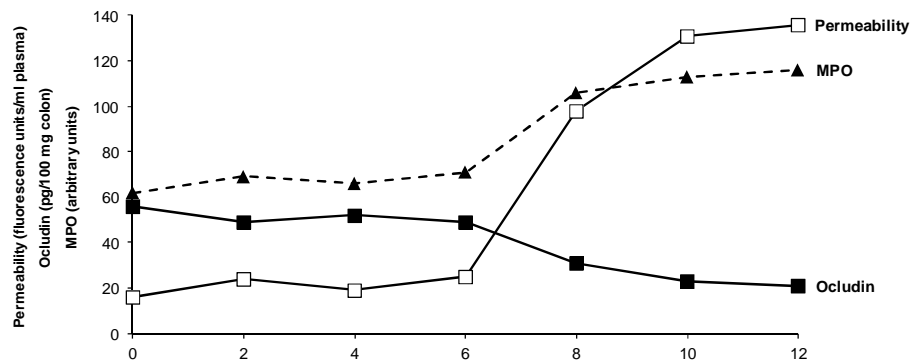
en el que se incrementó el contenido de *Prevotellas*. Así mismo, a partir de la 6ª semana se produjo un incremento sustancial en la producción de CCL5. Ésta es una quimioquina proinflamatoria con actividad quimiotáctica para los leucocitos (Donlon et al., 1990). Así, la CCL5 es una molécula que amplifica la respuesta inmune innata también hacia una respuesta inmune de tipo adquirida. Estos resultados están en línea con los de por Elinav et al. (2011) los cuales encontraron que la microbiota alterada de ratones *Nlrp6*<sup>-/-</sup> producían una elevada cantidad de CCL5 que daba lugar a una respuesta autoinflamatoria exagerada.



**Figura 47.** Evolución de sulfatasas y CCL5 durante la ingesta prolongada de CML.

Finalmente se estudió la evolución de la infiltración neutrofílica (como MPO) en la mucosa, así como la permeabilidad intestinal. A partir de la 6ª semana se produjo un incremento en la permeabilidad intestinal, al igual que se incrementaron los niveles de ocludina,

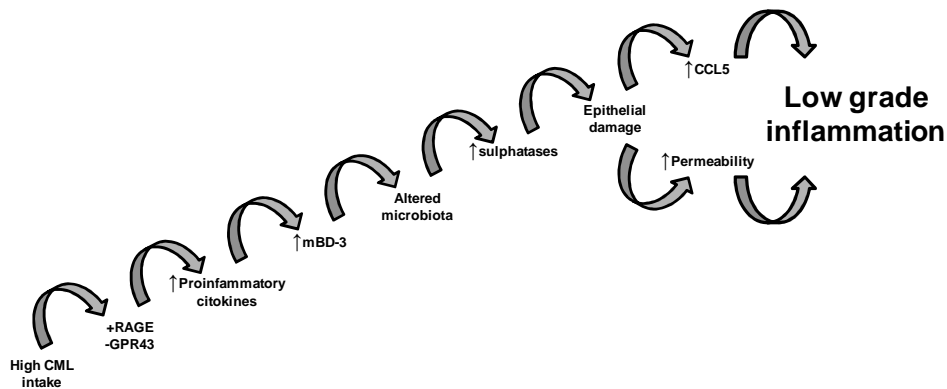
proteína componente de las tight junctions encargadas de mantener la función barrera del epitelio intestinal. Así mismo, se produjo un incremento en los niveles de MPO, lo que indica que se incrementó la infiltración de neutrófilos en la mucosa intestinal. Puesto que estos hechos se produjeron a la vez que el incremento en la CCL5 y con posterioridad al incremento en la secreción de sulfatasas, se puede hipotetizar que las sulfatasas originaron un daño epitelial (descenso en los niveles de ocludina) dando lugar tanto a un incremento de la permeabilidad intestinal como a un reclutamiento de neutrófilos.



**Figura 48.** Evolución de la permeabilidad intestinal, ocludina y MPO durante la ingesta prolongada de CML.

En vista de los resultados encontrados, la sucesión temporal de los cambios acontecidos sería la siguiente: una ingesta excesiva de CML daría lugar a una activación del RAGE y bloqueo del GPR43, lo que originaría una elevada producción de citoquinas proinflamatorias, así

como cambios en la expresión de dichos receptores que perpetuaría este comportamiento. Una de las respuestas a la producción de citoquinas proinflamatorias sería la síntesis de la  $\beta$ -defensina mBD-3, la cual propiciaría un cambio en la microbiota asociado con la destrucción de la capa protectora del epitelio y la integridad de dicha barrera, lo que incrementaría la permeabilidad intestinal. Así, una mayor exposición a los antígenos lumenales provocaría la secreción de grandes cantidades de CCL5 que dispararía la activación inmunológica y con ella el desarrollo de una inflamación de bajo grado a nivel intestinal (*Figura 49*).



**Figura 49.** Evolución temporal de los efectos mediados por la ingesta prolongada de CML.

Como conclusión de este apartado, se puede decir que la ingesta de grandes cantidades de CML durante un periodo prolongado de tiempo da lugar a una inflamación intestinal de bajo grado que, en individuos con predisposición genética, podría desencadenar un brote de EII en situaciones de estrés fisiológico (trauma, infección, etc.).

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente tesis doctoral demuestran que la ingesta de CML, compuesto avanzado de la reacción de Maillard generado durante el procesado térmico de los alimentos, da lugar a un desequilibrio del status inmunológico a nivel intestinal, lo que origina una inflamación de bajo grado. Esta conclusión general se apoya en tres conclusiones parciales:

1. La CML es capaz de activar el receptor RAGE y de bloquear la unión de los SCFAs con el receptor GPR43, por lo que interfiere la actividad biológica de los neutrófilos.
2. La CML ingerida a través de la dieta incrementa el nivel de inflamación y la gravedad de los signos clínicos de la colitis aguda y crónica.
3. En individuos predispuestos genéticamente, la ingesta elevada de alimentos muy procesados térmicamente podría ser uno de los agentes causales de la EII e incluso factor agravante en aquellos individuos que ya la padecen.





---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, E.C, SWAMY, M.S., PERRY, R.E.** Nonenzymatic glycosylation (glycation) of lens crystallins in diabetes and aging. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989, 304, 123–139.
- ABRAHAMSE, S.L., POOL-ZOBEL, B.L., RECHKEMMER, G.** Potential of short-chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis*, 1999, 20, 629-634.
- ADRIAN, J.** The Maillard reaction II. Study of the behavior of six pure amino acids. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1963, 17, 1-35.
- ADRIAN, J.** The Maillard reaction. En: Handbook of nutritive value of processed food. Vol.1. *Food for human use, Rechcigl, M.,* (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982, 679-685.
- ADRIAN, J., FRAGNE, R.** Le reaction de Maillard VIII. Role des pre-melanoidines sur la digestibilite azotée et la proteolyse in vitro. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1973, 27, 111-123.
- ADRIAN, J., FRANGNE R., PETIT, L., GODON, B., BARBIER, J.** Nutritional repercussions of soluble products formed during the Maillard reaction. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1966, 20, 257-277.
- AHMED, M.U., DUNN, J.A., WALLA, M.D., THORPE, S.R., BAYNES, J.W.** Identification of N-epsilon-carboxymethyllysine as a degradation

product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.*, 1986, 263, 8816–8821.

**ALEXIS, N.E., MUHLEBACH, M.S., PEDEN, D.B., NOAH, T.L.** Attenuation of host defense function of lung phagocytes in young cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2006, 5, 17–25.

**ALLEN, I.C., TEKIPPE, E.M., WOODFORD, R.M.** The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J. Exp. Med.*, 2010, 207, 1045–1056.

**ALLEN, I.C., WILSON, J.E., SCHNEIDER, M., LICH, J.D., ROBERTS, R.A., ARTHUR, J.C., WOODFORD, R.T., DAVIS, B.K., URONIS, J.M., HERFARTH, H.H., JOBIN, C., ROGERS, A.B., JENNY, P.** NLRP12 Suppresses Colon Inflammation and Tumorigenesis through the Negative Regulation of Noncanonical NF- $\kappa$ B Signaling. *Y. Ting Immunity*, 2012, 36, 742–754.

**AMASHEH, S., MEIRI, N., GITTER, A.H., SCHÖNEBERG, T., MANKERTZ, J., SCHULZKE, J.D.** Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 2002, 115, 4969–4976.

**AMES, J.M.** Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends Food Sci. Technol.*, 1990, 1, 150-154.

**AMORIN, J.A.** Dietary habits and nutritional status in adolescents over Europe-Souther Europe. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2000, 54, 29-35.

- ANDERSON, M.M, REQUENA, J.R, CROWLEY, J.R, THORPE, S.R., HEINECKE, J.W.** The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N-epsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.* 1999, 104, 103–113.
- ANDOH, A., FUJIYAMA,Y., HATA, K., TAKAYA,H., SHIMADA, M., BAMBA, T.** Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumor necrosis factor-alpha induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immuno.*, 1999, 118, 23-29.
- ANDOH, A., BAMBA, S., BRITTAN, M.** Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacol. Ther.* 2007, 114, 94–106.
- ANDRASSY, M., IGWE, J., AUTSCHBACH, F., VOLZ, C., REMPPIS, A., NEURATH, M.F., SCHLEICHER, E., HUMPERT, P.M., WENDT, T., LILIENSIEK, B., MORCOS, M., SCHIEKOFER, S., THIELE, K., CHEN, J., KIENTSCH-ENGEL, R., SCHMIDT, A.M., STREMMEL, W., STERN, D..M., KATUS, H.A., NAWROTH, P.P., BIERHAUS, A.** Posttranslationally modified proteins as mediators of sustained intestinal inflammation. *Am J Pathol.* 2006, 169, 1223-37.
- ARCHER, M.C., TANNENBAUM, S.R.** Vitamins.En: Nutritional and Safety Aspects of Food Processing, Tannenbaum, S.R., (Ed.), *Food Sci.*, Basilea, 1979, 6, 47-95.

- ARTHUR, J.C., LICH, J.D., AZIZ, R.K., KOTB, M., TING, J.P.** Heat shock protein 90 associates with monarch-1 and regulates its ability to promote degradation of NF-kappaB-inducing kinase. *J. Immunol.*, 2007, 179, 6291–6296.
- ASHOOR, S.H., ZENT, J.B.** Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.*, 1984, 49, 1206-1207.
- BACHMANN, S., MEIER, M., KANZIG, A.** 5-Hydroxymethyl-2-furfural(HMF) in food. *Lebensm. Lebensmittelchem.*, 1997, 51, 49–50.
- BADUI DERGAL, S.** Química de los alimentos, Edition 4, *Publisher, Pearson Educación*, 2006.
- BALTES, W.** Chemical changes in food by the Maillard reaction. *Food Chem.*, 1982, 9, 59-73.
- BARNES, P.J., KARIN, M.** Nuclear factor-κB-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, 1997, 336, 1066–1071.
- BAUER-MARINOVIC, M., FLORIAN, S., MÜLLER-SCHMEHL, K., GLATT,H., JACOBASCH, G.** Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2- dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. *Carcinogenesis*, 2006, 27, 1849-59.
- BAUERNFEIND, F.G., HORVATH, G., STUTZ, A.** Cutting edge: NFkappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression.

---

*J. Immunol.*, 2009, 183, 787–791.

**BAXTER, J.H.** Free amino acid stability in reducing sugar system. *J. Food Sci.*, 1995, 602, 405-408.

**BAYNES, J.W., THORPE, S.R.** Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 1999, 48, 1-9.

**BELLO GUTIÉRREZ.** En: Ciencia Bromatológica. Principios generales de los alimentos. Editorial *Díaz de Santos, S.A.*, 2000, 335-352.

**BENDINGHAUS, A.J., OCKERMAN, H.W.** Antioxidative Maillard reaction products from reducing sugars and free amino acids in cooked ground pork patties. *J. Food Sci.*, 1995, 60, 992-995.

**BERGELSON, J.M.** Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread. *Cell. Host. Microbe*, 2009, 5, 517–521.

**BERNSTEIN, C.N., SINGH, S., GRAFF, L.A., WALKER, J.R., MILLER, N., CHEANG, M.** A prospective population based study of triggers of symptomatic flares in IBD. *Am. J. Gastroenterol.*, 2010, 105, 1994–2002.

**BIERHAUS, A., CHEN, J., LILIENSIEK, B., NAWROTH, P.P.** LPS and cytokine activated endothelium. *Seminars Thromb. Hemostasis*, 2000, 26, 571-588.

**BIERHAUS, A., SCHIEKOFER, S., SCHWANINGER, M., ANDRASSY, M., HUMPERT, P.M., CHEN, J., HONG, M., LUTHER, T., HENLE, T., KLOTING, I., MORCOS, M., HOFMANN, M., TRITSCHLER, H.,**

- WEIGLE, B., KASPER, M., SMITH, M, PERRY, G., SCHMIDT, A.M., STERN, D.M., HARING, H.U., SCHLEICHER, E., NAWROTH, P.P.** Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor kappa B. *Diabetes* 2001, 50, 2792–2808.
- BIERHAUS, A., NAWROTH, P.P.** Modulation of the vascular endothelium during infection-the role of NF-Kappa B activation. *Contrib.Microbiol.*, 2003, 10, 86-105.
- BIERHAUS, A., HUMPERT, P.M., MORCOS, M., WENDT, CHAVAKIS, T., ARNOLD, B., STERN, D.M., NAWROTH, P.P.** Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation endproducts. *J. Mol. Med.*, 2005, 83, 876-886.
- BJORCK, I., NOGUCHI, A., ASP, N.G., CHEFTEL, J., DAHLQVIST, C.** Protein nutritional value of a biscuit processed by extrusion cooking: effects on available lysine. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31, 488-493.
- BOGUNOVIC, M., DAVE, S.H., TILSTRA, J.S., CHANG, D.T., HARPAZ, N., XIONG, H., MAYER, L.F., PLEVY, S.E.** Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 2007, 292, 1770– 1783.
- BOHART, G.S., CARSON, J.F.** Effects of trace metals, oxygen and light on the glucose-glycine browning reaction. *Nature*, 1955, 175, 470-471.
- BONDAROVICH, H.A., FRIEDEL, P., KRAPL, V.** 1967. Citado por Velisek y col. 1976.

- BORRELLI, R.C., FOGLIANO, V., MONTI, S.M., AMES, J.M.** Characterisation of melanoidins from a glucose–glycine model system. *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, 215, 210–215.
- BORRELLI, R.C., FOGLIANO, V.** Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2005, 49, 673–678.
- BOUSKRA, D., BREZILLON, C., BERARD, M.** Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, 2008, 456, 507–510.
- BRAAT, H., ROTTIERS, P., HOMMES, D.W., HUYGHEBAERT, N., REMAUT, E., REMON, J.P., VAN DEVENTER, S.J., NEIRYNCK S., PEPPELENBOSCH, M.P., STEIDLER, L** A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2006, 4, 754–759.
- BROWN, A.J., GOLDSWORTHY, S.M, BARNES, A.A, EILERT, M.M, TCHEANG, L., DANIELS, D., MUIR, A.I., WIGGLESWORTH, M.J, KINGHORN, I., FRASER, N.J., PIKE ,N.B., STRUM, J.C., STEPLEWSKI, K.M., MURDOCK, P.R., HOLDER, J.C., MARSHALL, F.H.,, SZEKERES, P.G., WILSON, S., IGNAR, D.M., FOORD, S.M., WISE, A., DOWELL, S.J.** The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 2003, 28, 278(13), 11312–11319.
- BROWN, D.F., SENN, V.J., DOLLEAR, F.G. GOLDBLATT, L.A.** Comparison of carbonyl compounds in raw and roasted runner peanuts. I.



Major qualitative and same quantitative differences. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1973, 50, 16-20.

**BROWNLEE, M., VLASSARA, H., CERAMI, A.** Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.*, 1984, 101, 527–537.

**BRÜGGEMANN, J., ERBERSDOBLER, H.** Studies on the analytical and physiological characterization of amino acid injuries in heat treatment of food or animal feed. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkd.*, 1968, 24, 55-67.

**BUCCIARELLI, L.G., WENDT, T., RONG, L., LALLA, E., HOFMANN, M.A., GOOVA, M.T., TAGUCHI, A., YAN, S.F., YAN, S.D., STERN, D.M., SCHMIDT, A.M.** RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci.* 2002, 59, 1117-1128.

**BURGER-VAN PAASSEN, N., VINCENT, A., PUIMAN, P.J., VAN DER SLUIS, M., BOUMA, J., BOEHM, G., VAN GOUDOEVEER, J.B., VAN SEUNINGEN, I., RENES, I.B.** The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem. J.*, 2009, 420, 211–219.

**BURTON, H., MCWEENEY, S.** Consideration of sugar stability. *Nature*, 1963, 197, 266-268.

**BURVALL, A., ASP, N.G., BOSSON, A., SAN JOSE, C., DAHLQVIST, A.** Storage of lactose hydrolysed dried milk, effect of water activity of the protein nutritional value. *J. Dairy Res.*, 1978, 45, 381-389.

- BUTTERY, R.G., SEIFERT, R.M., LING, L.C.** 1970. Citado por Velisek y col. 1976.
- CAMMERER, B., JALYSCHKOV, V., KROH, L.W.** Carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *International Congress Series*, 2002, 1245, 269-273.
- CARSON, J.F.** The reaction of fructose with isopropyl-amine and cyclohexylamine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 1881-1887.
- CASTRILLON, A.M., NAVARRO, M.P., GARCÍA-ARIAS, M.T.** Tuna protein nutritional quality changes alter canning. *J. Food Sci.*, 1996, 61, 1250-1253.
- CHAVAKIS, T., BIERHAUS, A., AL-FAKHRI, N., SCHNEIDER, D., WITTE, S., LINN, T., NAGASHIMA, K., MORSER, J., ARNOLD, B., J., PREISSNER, K.T., NAWROTH, P.P.** The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J. Exp. Med.*, 2003, 198, 10, 1507-1515.
- CHEFTEL, J.C., CHEFTEL, H.** Introducción a la bioquímica de los alimentos. *Ed. Acribia*, Zaragoza, 1980, 306-308.
- CHEN, G.Y., LIU, M., WANG, F.** A functional role for nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J. Immunol.*, 2011, 186, 7187–7194.
- CHEN, G.Y., NÚÑEZ, G.** Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, 10, 826–837.
- CHEN, G.Y., NÚÑEZ, G.** Inflammasomes in Intestinal Inflammation and

- Cancer. *Gastroenterology*, 2011, 141, 1986–1999.
- CHEN, G.Y., SHAW, M.H., REDONDO, G.** The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. *Cancer Res.*, 2008, 68, 10060–10067.
- CLARK, A.V., TANNENBAUM, S.R.** Isolation and characterisation of pigments from protein-carbonyl browning systems. Isolation, purification and properties. *J. Agric. Food Chem.*, 1970, 18, 891-894.
- CLAYBURGH, D. R., MUSCH, M. W., LEITGES, M., FU, Y. X. TURNER, J. R.** Coordinated epithelial NHE3 inhibition and barrier dysfunction are required for TNF-mediated diarrhea *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 2006, 116, 2682–2694.
- CLEGG, K.M.** Nonenzymic browning in lemon juice. *J. Sci. Food Agric.*, 1964, 15, 878-885.
- CLINCH, K., EVANS, G.B., FURNEAUX, R.H., RENDLE, P.M., RHODES, P.L., ROBERTON, A.M., ROSENDALE, D.I., TYLER, P.C., WRIGHT, D.P.** Synthesis and utility of sulfated chromogenic carbohydrate model substrates for measuring activities of mucin-desulfating enzymes. *Carb. Res.* 2002, 337, 1095–1111.
- COMALADA, M., PEPPELENBOSCH, M.P.** Impaired innate immunity in Crohn's disease. *Trends Mol. Med.*, 2005, 12(9), 397-399.
- COOMBES, J.L., SIDDIQUI, K.R., ARANCIBIA-CÁRCAMO, C.V., HALL, J., SUN, C.M., BELKAID, Y., POWRIE, F.** A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T

cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid dependent mechanism. *J. Exp. Med.*, 2007, 204, 1757–1764.

**CONDLIFFE, A.M., DAVIDSON, K., ANDERSON, K.E., ELLSON, C.D., CRABBE, T., OKKENHAUG, K., VANHAESEBROECK, B., TURNER, M., WEBB, L., WYMAN, M.P., HIRSCH, E., RUCKLE, T., CAMPS, M., ROMMEL, C., JACKSON, S.P. CHILVERS, E.R., STEPHENS, L.R., HAWKINS, P.T.** Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood*, 2005, 106, 1432-1440.

**CORTE, C., SAXENA, P., TATTERSALL, S., SELINGER, C., LEONG, R.W.** When to use biological agents in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.*, 2011, 27(7), 1141-1149.

**CORTE-OSORIO, L.Y., MARTÍNEZ, H.E., ORTÍZ, R.** Efecto del consumo de la fibra dietética en la expresión cuantitativa del receptor de butirato GPR43 en colon de ratas. *Nutr. Hosp.*, 2011, 26, 1052-1058.

**DAGLIA, M., RACCHI, M., PAPETTI, A., LANNI, C., GOVONI, S., GAZZANI, G.** In vivo and ex vivo antihydroxyl radical activity of Green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 1700-1704.

**DELGADO-ANDRADE, C., RUFÍÁN-HENARES, J.A., MORALES, F. J.** Assessing the antioxidant reactivity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7832-7836.

- DELGADO-ANDRADE, C., TESSIER, F., NIQUET-LERIDON, C., SEIQUER, I., NAVARRO, M.P.** Study of the urinary and faecal excretion of N $\epsilon$ -carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids*, 2012, 43, 595–602.
- DE FILIPPO, C., CAVALIERI, D., DI PAOLA, M., RAMAZZOTTI, M., POULLET, J.B., MASSART, S., COLLINI, S., PIERACCINI, G., LIONETTI, P.** Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107, 33, 14691–14696.
- DE JONGE, H.R.** Toxicity of tetracyclines in rat-small-intestinal epithelium and liver. *Biochem Pharmacol.*, 1973, 22, 2659–2677.
- DE LA CUEVA, S., RUFÍÁN-HENARES, J.A.** Antimicrobial activity of coffee melanoidinas. A study of their metal-chelating properties. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 432-438.
- DITTRICH, R., EL-MASSRY, F. KUNZ,K., RINALDI, F., PEICH, C.C., BECKMANN, M.W., PISCHETSRIEDER, M.** Maillard Reaction Products Inhibit Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins in Vitro *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51 (13), 3900–3904.
- DONLON, T.A., KRENSKY, A.M., WALLACE, M.R., COLLINS, F.S., LOVETT, M., CLAYBERGER, C.** Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12. , 1990, 6,: 548–553.

- DONOSO, G., LEWIS, O.A.M., MILLER, D.S., PAYNE, P.R.** Effect of heat treatment on the nutritive value of proteins. Chemical and balance studies. *J. Sci. Food Agric.*, 1962, 13, 192-196.
- DOSTERT, C., PETRILLI, V., VAN BRUGGEN, R.** Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 2008, 320, 674–677.
- DRUSCH, S., FAIST, V., ERBERSDOBLER, H.F.** Determination of N<sup>-</sup>-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.*, 1999, 65, 547–553.
- DUPAUL-CHICOINE, J., YERETSSIAN, G., DOIRON, K., BERGSTROM, K.S., MCINTIRE, C.R., LEBLANC, P.M., MEUNIER, C., TURBIDE, C., GROS, P., BEAUCHEMIN, N., VALLANCE, B.A., SALEH, M.** Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*, 2010, 32, 367-378.
- DWORSCHAK, E., ÖRSI, F.** Study into the Maillard reaction occurring between methionine and tryptophan on the one hand and glucose on the other. I. Studies in aqueous solutions. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 1977, 6, 59-71.
- E.C. Commission Directive 92/39/EEC**, amending Directive 90/128/EEC relating to plastic materials and articles intended to come in contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L168, 21-29.

- EICHNER, K., KAREL, M.** The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20, 218-223.
- EINARSSON, H.** The effect of time, temperature, pH, and reactants on the formation of antibacterial compounds in the Maillard reaction. *Lebensm-Wiss. U-technol.*, 1987, 20, 51-55.
- EINARSSON, H., EKLUND, T., NES, I.F.** Inhibitory mechanisms of Maillard reaction products. *Microbios*, 1988, 53, 27-36.
- EINARSSON, H., ERIKSON, C.** The antibacterial effect of Maillard Reaction Products and sorbic acid at different pH levels and temperatures. En: *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Berlin, 1990, 227-232.
- ELINAV, E., STROWIG, T., KAU, A.L., HENAO-MEJIA, J., THAISS, C.A., BOOTH, C.J., PEAPER, D.R., BERTIN, J., EISENBARTH, S.C., GORDON, J.I., FLAVELL, R.A.** NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, 2011, 145, 745–757.
- ELLIS, G.P.** 1959. Citado por O'Brien, J. y Morrissey, P.A., 1989.
- ELLIS, R.D., LIMB, G.A., THOMPSON, R.P., PUNCHARD, N.A.** NF kappa B in Crohn's disease. *Biochem. Soc. Trans.*, 1997, 25, 178S.
- EL-SALHY, M., DANIELSSON, A., STENLING, R., GRIMELIUS, L.** Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.*, 1997, 242, 413–419.

- ERBERSDOBLER, H., ZUCKER, H.** Untersuchungen zum gealt and lysin und verfügbarem lysin in trockenmagermilch. *Milchwis.*, 1966, 21, 564-568.
- ERBERSDOBLER. H., DÜMMER, H., ZUCKER, H.** Analytical and phisiological characterization of amino acid damage due to thermal treatment of nutrients and feed. II. Effect of amino acid availability on the free amino acid concentration in portal vein plasma. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.*, 1968, 24, 136-152.
- ERBERSDOBLER, H.F.** Über untersuchungen zur intestinalen resorption von epsilon-fructoselysin. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.*, 1971, 28, 171-173.
- ERBERSDOBLER, H., WEBER, G., GUNSSER, I.** Analytical and physiological characterisation of amino acid damage. IV. Heating of proteins alone. *Z. Tierphysiol. Tierernahr. Futtermittelkd.*, 1972, 29, 325-34.
- ERBERSDOBLER, H.F., GROSS, A., KLUSMAN, U., SCHLECHT, K.** Absortion and metabolism of heated protein-carbohydrate mixtures in humans. En: Absortion and utilization of amino acids, Friedman, M. (Ed.), CRC: Boca Raton, Florida, 1989, 91-120.
- ERBERSDOBLER, H., LOHMANN, M., BUHL, K.** Utilizattion of early Maillard reaction products in humans. En: Nutritional and toxicological consequences of food processing, Friedman, M. (Ed.); Plenum: New York, 1991, 363-378.



- FAIST, V., WENZEL, E., ERBERSDOBLER, H. F.**, In vitro and in vivo studies on the metabolic transit of Ne-carboxymethyllysine, *Czech J. Food Sci.*, 2000, 18, 116–119.
- FAHLGREN, A., HAMMARSTROM, S., DANIELSSON, A., HAMMARSTROM, M.L.** Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2003, 131, 90–101.
- FARHADI, A., KESHAVARZIAN, A., VAN DE KAR, L.D., SHRIRAN JAKATE, M.D., LEI ZHANG, M.D., MALIHA SHAIKH, MS, ALI BANAN, P.D., JEREMY FIELDS, P.D.** Heightened Responses to Stressors in Patients with Inflammatory Bowel Disease *Am. J. Gastroenterol.*, 2005, 100, 1796–1804.
- FELLERMANN, K., STANGE, D.E., SCHAEFFELER, E., SCHMALZL, H., WEHKAMP, J., BEVINS, C.L., REINISCH, W., TEML, A., SCHWAB, M., LICHTER, P., RADLWIMMER, B., STANGE, E.F.** A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am. J. Hum. Genet.*, 2006, 79, 439–448.
- FENNEMA, O.R.** Química de los alimentos. *Ed. Acribia*, Zaragoza, 1993.
- FIHN, B. M., SJOQVIST, A., JODAL, M.** Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus– crypt axis: effects of glucose transport. *Gastroenterology*, 2000, 119, 1029–1036.

- FINHOLT, P., ASLOS, L., HIGUCHI, T.** Rate studies on the anaerobic degradation of ascorbic acid III. Rate of formation of furfural. *J. Pharm. Sci.*, 1965, 54, 181-186.
- FINOT, P.A.** Metabolism and physiological effects of Maillard reaction products. En: *The Maillard reaction in food processing human nutrition and physiology*, Finot, P.A.; Aeschbacher, H.U.; Hurrell, R.F. y Liardon, R. (Eds.), Basel, 1990, 259-271.
- FINOT, P.A.** Toxicology of nonenzymatic browning. In: R Macrae, RK Robinson, MJ Sadler (eds.). *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*, London, UK: Academic Press., 1993.
- FINOT, P.A., MAURON, J.** Le blocage de la lysine par la reaction de Maillard. II. Propriété chimiques des dérivés N-(désoxy-1-D-frutosyl-I) et N-(désoxy-1-D-lactulosyl-I) de la lysine. *Helv. Chim. Acta*, 1972, 55, 1153-1164.
- FINOT, P.A., MAGNENAT, E., MOTTU, F., BUJARD, E.** Disponibilitè biologique et transit metabolique des acides amines modifies par les traitements technologiques. *Ann. Nutr. Alimen.*, 1978, 32, 325-338.
- FINOT, P.A., MAGNENAT, E.** Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 193-207.
- FINOT, P.A., FURNISS, D.E.** Metabolic transit and toxicity of Maillard reaction products. En "*The Maillard reaction in ageing, diabetes and nutrition*". Ed. Baynes, J.W. y Monnier, V.M. Alan R. Inc., New York. 1989, 343-358.

- FORD, J.E., SALTER, D.N.** Analysis of enzymically digested food proteins by sephadex-gel filtration. *Br. J. Nutr.*, 1966, 20, 843-60.
- FORD, J.E., HURREL, R.F., FINOT, P.A.** Storage of milk powders under adverse conditions. *Brit. J. Nutr.*, 1983, 49, 343-364.
- FRANCHI, L., KANNEGANTI, T.D., DUBYAK, G.R.** Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K<sub>v</sub> for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 18810–18818.
- FRANCHI, L., EIGENBROD, T., MUÑOZ-PLANILLO, R.** The inflammasome; a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.*, 2009a, 10, 241–247.
- FRANCHI, L., EIGENBROD, T., NUÑEZ, G.** Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J. Immunol.*, 2009b, 183, 792–796.
- FRANGNE, R., ADRIAN, J.** The Maillard reaction. VI. Demonstration of a lysine labile fraction in proteins. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1972, 26, 97-106.
- FRANK, D.N, St AMAND, A.L., FELDMAN, R.A., BOEDEKER, E.C., HARPAZ, N., PACE, N.R.** Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2007, 104(34), 13780-13785.

- FRIEDMAN, L., WISON, R.E., ZIDERMAN, I.** Mutagen formation in heated wheat gluten, carbohydrates and gluten/carbohydrates blends. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 1019-1028.
- FRIEDMAN, M.** Nutritional values of protein from different food sources. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 6-29.
- FU, H., SHI, Y. Q., MO, S.J.** Effect of short-chain fatty acids on the proliferation and differentiation of the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2. *Chin. J. Dig. Dis.*, 2004, 115-117.
- FU, M.X., REQUENA, J.R., JENKINS, A.J, LYONS, T.J, BAYNES, J.W., THORPE, S.R.** The advanced glycation end product, N-epsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 9982–9986.
- FUKATA, M., CHEN, A., VAMADEVAN, A.S.** Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*, 2007, 133, 1869–1881.
- GABE, S.M, BJARNASON, I., TOLOU-GHAMARI, Z., TREDGER, J.M., JOHNSON, P.G., BARCLAY, G.R., WILLIAMS, R., BA SILK, D.** The effect of tacrolimus (FK506) on intestinal barrier function and cellular energy production in humans. *Gastroenterology*, 1998, 115, 67–74.
- GARCÍA-PAREDES J., MENDOZA J.L.** Epidemiología descriptiva de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal en España. *An. Med. Interna*, 2003, 20(1), 1-2.

- GASSULL, M.A., GOMOLLÓN, F., OBRADOR, A., HINOJOSA, J.** Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Ediciones Ergon*, 2002, Segunda edición.
- GERSEMANN, M., BECKER, S., KÜBLER, I., KOSLOWSKI, M., WANG, G., HERRLINGER, K.R., GRIGER, J., FRITZ, P., FELLERMANN, K., SCHWAB, M., WEHKAMP, J., STANGE, E.F.** Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation*, 2009, 77, 84–94.
- GLATT, H.R., SOMMER, Y.** Health risks by 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: Skog K, Alexander J, editors. Acrylamide and other health hazardous compounds in heat-treated foods. Cambridge: *Woodhead Publishing*, 2006, 328–57.
- GOMYO, T., MIURA, M.** Effect of melanoidin on the digestion and absorption of disaccharides in the small intestine of rat. En: Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems, Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Maillard reaction, Susono, Shizuoka, Japan, 1985, Fujimaki, M.; Namiki, M.; Kato, H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1986, 549-558.
- GOODHAND, J.R., WAHED, M., RAMPTON, D.S.** Management of stress in inflammatory bowel disease: a therapeutic option? *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2009, 3(6), 661-679.
- GRENIER, J.M., WANG, L., MANJI, G.A.** Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett.*, 2002, 530, 73–78.

- HACKLER, L.R., STILLINGS, B.R.** Aminoacid composition of heated-processed soy-milk and its correlation with nutritive value. *Cereal. Chem.*, 1967, 44, 70-77.
- HANAUER, S.B.** Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflam. Bow. Dis.*, 2006, 12, S3-S9.
- HARIG, J.M., SOERTEL, K.H., KOMOROWSKI, R.A., WOOD, C.M.** Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N. Engl. J. Med.*, 1989, 320, 23-28.
- HARTKOPF, J., ERBERSDOBLER, H.F.** Model experiments of the formation of N epsilon-carboxymethyllysine in food products. *Z Lebensm UntersForsch*, 1994, 198, 15–19.
- HASLBECK, K.M., FRIESS, U., SCHLEICHER, E.D., BIERHAUS, A., NAWROTH, P.P.** The RAGE pathway in inflammatory myopathies and limb girdle muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.*, 2005, 110(3), 247-254.
- HAYASHI, T., NAMIKI, M.** Formation of two-carbon sugar fragment at an early stage of the browning reaction of sugar with amine. *Agric. Biol. Chem.*, 1986, 50(8), 1959-1964.
- HE, D., SOUGIOULTZIS, S., HAGEN, S., LIU, J., KEATES, S., POTHOUKAKIS, C., LAMON, J.T.** Clostridium difficile toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology*, 2002, 122, 1048–1057.

- HEISS, R.** Haltbarkeit und Sorptionsverhalten wasserarmer. Lebensmittel. Springer-Verlag. New York, 1968, 163, 82.
- HENLE, T., KLOSTERMEYER, H.** Determination of protein-bound 2-amino-6-(2-formyl-2-hydroxymethyl-1-pyrrolyl)-hexanoic acid (“pyrraline”) by ion-exchange chromatography and photodiode array detection. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1993, 196, 1–4.
- HENLE, T., WALTER, A.W., KLOSTERMEYER, H.** Simultaneous determination of protein-bound Maillard products by ion-exchange chromatography and photodiode array detection. – In: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O’Brien J, Baynes JW (eds) Maillard reactions in chemistry, food, and health. The Royal Society of Chemistry, 1994, 195–200.
- HENLE, T., SCHWARZENBOLZ, U., KLOSTERMEYER, H.** Detection and quantification of pentosidine in foods. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1997, 204, 95–98.
- HENLE, T., MIYATA, T.** Advanced glycation end products in uremia. *Adv. Ren. Repl. Ther.*, 2003, 10, 321–331.
- HIGUCHI, K., UMEGAKI, E., WATANABE, T., YODA Y., MORITA, E., MURANO, M.** Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury. *J Gastroenterol.*, 2009, 44, 879–888.
- HIROTA, S.A., NG, J., LUENG, A.** NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 2011, 17, 1359–1372.

- HODGE, J.E.** Browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 1953, 1, 928–943.
- HODGE, J.E., RIST, C.E.** The Amadori rearrangement under new conditions and its significances for non-enzymatic browning reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 316-322.
- HOFMANN, M.A., SCHIEKOFER, S., ISERMANN, B., KANITZ, M., HENKELS, M., JOSWIG, M., TREUSCH, A., MORCOS, M. WEISS, T., BORCEA, V., ABDEL KHALEK, A.K., AMIRAL, J., TRISCHLER, H., RITZ, E., WAHL, P., ZIEGLER, R., BIERHAUS, A., NAWROTH, P.P.** Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia*, 1999, 42, 222-232.
- HOLLANDER, D.** Crohn's disease — a permeability disorder of the tight junction? *Gut*, 1988, 29, 1621–1624.
- HOLLANDER, D., VADHEIM, C.M., BRETTHOLZ, E., PETERSEN, G.M., DELAHUNTY, T., ROTTER, J.I.** Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann. Intern. Med.*, 1986, 105(6), 883-885.
- HOMMA, S., AIDA, K., FUJIMAKI, M.** Chelation of metal with brown pigments in coffee. En: Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems, Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Maillard reaction, Susono, Shizuoka (Japan),



---

Fujimaki, M.; Namiki, M.; Kato, H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1986, 165-172.

**HOMMA, S., MURATA, M.** Metal chelating compounds in instant coffee. *Annals Nutr. Metabolism*, 2001, 45 S, 394-402.

**HORNUNG, V., BAUERNFEIND, F., HALLE, A.** Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.*, 2008, 9, 847–856.

**HRDLICKA, J.** Changes during thermal and hydrothermal reactions XX. The effect of heavy methals on the course of NONENZYMATIC browning. *Sh. Vys. Sk. Chem. Technol.* 1975, 65, E48.

**HUGOT, J.P., CHAMAILLARD, M., ZOUALI, H., LESAGE, S., CÉZARD, J.P., BELAICHE, J., ALMER, S., TYSK, C., O´MORAIN, C.A., GASSULL, M.A., BINDER, V., FINKEL, Y., CORTOT, A., MODIGLIANI, R., LAURENT-PUIG, P., GOWER-ROUSSEAU, C., MACRY, J., COLOMBEL, J.F., SAHBATOU, M., THOMAS, G.** Association of Nod2 leucine-rech repeat variants with susceptibility to Crohn´s disease. *Nature*, 2001, 411, 599-603.

**HULTSCH, C., HELLWIG, M., PAWELKE, B., BERGMANN, R., RODE K., PIETZSCH, J., KRAUSE, R., HENLE, T.** Biodistribution and catabolism of 18F-labeled N-epsilon-fructoselysine as a model of Amadori products. *Nucl. Med. Biol.* 2006, 33(7), 865-873.

**HUSSOY, T., HAUGEN, M., MURKOVIC, M., JOBSTL, D., STOLEN, L., BJELLAAS, T.** Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from

- Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 46, 3697–3702.
- IARC** Acrylamide. In IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. 1994, 60, 5, 389-433.
- IRVINE, E. J., MARSHALL, J. K.** Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*, 2000, 119, 1740–1744.
- ISELL, H.S., FRUSH, H.L.** Mutarotation, hydrolysis and rearrangement reactions of glycosylamines. *J. Org. Chem.*, 1958, 23, 1309-1319.
- ISHIGURO, H., NAKAIWAGA, N., MIYOSHI, Y., FUJINAMI, K., KUBOTA, Y., UEMURA, H.** Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development. *The prostate*, 2005, 64(1), 92-100.
- JACOBASCH, G., SCHMIEDLL, D., KRUSCHEWSKI, M., SCHMEHL, K.** Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases. *Int. J. Colorectal Dis.*, 1999, 14, 201-21.
- JANZOWSKI, C., GLAAB, V., SAMIMI, E., SCHLATTER, J., EISENBRAND, G.** 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity. DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38, 801–809.
- JESENBERGER, V., PROCYK, K.J., YUAN, J., REIPERT, S., BACCARINI, M.** Salmonella-induced caspase- 2 activation in macrophages: a novel

mechanism in pathogen mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 2000, 192: 1035–1046.

**JOHANSSON, M.E., PHILLIPSON, M., PETERSSON, J., VELCICH, A., HOLM, L., HANSSON, G.C.** The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 15064–15069.

**JOKINEN, J.E, REINECCIUS, G.A., THOMPSON, D.R.** Losses in available lysine during thermal processing of soy protein model system. *J. Food Sci.*, 1976, 41, 816-819.

**KADA, T., INOUE, T., OHTA, T., SHIRASU, Y.** Antimutagens and their modes of action. En: Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms. Ed: Shankel, D.M.; Hartman, P.E.; Kada, T.; Hollaender, A. Basic Life Science 39, Plenum, New York, 1985, 181-196.

**KAMBHAM, N., BIERHAUS, A., NAWROTH, P., NEURATH, M.F., SLATTERY, T., BEACH, D., MCCLARY, J., NAGASHIMA, M., MORSE, R. J., STERN, D., SCHMIDT, A.M.** RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 1999, 97, 889–901.

**KANE, A., LABUZA, T.P.** The Maillard Reaction in Foods. In: J.W. Baynes, V.M. Monnier (Eds.). In: *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*. New York: Alan r. Liss, Inc., 1989.

- KAREL, M.** Some effects of water and oxygen on rates of reactions of foods components. Thesis, Institute of technology, Massachussets, 1960.
- KATO, H., WATANABE, K., SATO, Y.** Effect of some metal on the Maillard reaction of ovoalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, 540-543.
- KISLINGER, T., FU, C., HUBER, B., QU, W., TAGUCHI, A., DU YAN, S., HOFMANN, M., YAN, S.F., PISCHETSRIEDER, M., STERN, D., SCHMIDT, A.M.** N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 31740–31749.
- KNIPFEL, J.E., BOTTING, H.C., MCLAUGHLAN, J.M.** Nutritional quality of several proteins as affected by heating in the presence of carbohydrates. En: *Protein Nutritional quality of foods and feeds*, Friedman, M., (Ed), New York (USA), 1975,674.
- KOLBERT, C.P., PERSING, D.H.** Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opp. Microbiol.* 1999, 2, 299-305.
- KÜHL, A.A., KAKIRMAN, H., JANOTTA, M., DREHER, S., CREMER, P., PAWLOWSKI, N.N., LODDENKEMPER, C., HEIMESAAT, M.M., GROLICH, K., ZEITZ, M., FARKAS, S., HOFFMANN, J.C.** Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. *Gastroenterology.* 2007, 133(6), 1882-1892.

- KURATA, T., SAKURAI, Y.** Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymatic browning reaction. Non-oxidative degradation of L-ascorbic acid including formation of 3-deoxy-L-pentosone. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, 1967, 31(2), 170-179.
- KYD, J.M., CRIPPS, A.W.** Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens. *Vaccine*, 2008, 26, 6221-6224.
- LABUZA, T.P., SALTMARCH, M.** Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions. *J. Food Sci.*, 1981, 47, 92-96.
- LABUZA, T.P., SCHMIDL, M.K.** Advances in the control of browning reactions in food. En: *Role of Chemistry in the Quality of Processed Food*. Ed. O. D. Fennema, W. H. Chang y C.Y. Lii. *Food and Nutrition Press, Inc.* Westport, Conn, 1986.
- LABUZA, T.P., TANNENBAUM, S.R., KAREL, M.** Water content and stability of low-moisture and intermediate-moisture foods. *Food Technol.*, 1970, 24, 543-550.
- LECH, M., AVILA-FERRUFINO, A., SKUGINNA, V.** Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome related mRNAs in humans and mice. *Int. Immunol.*, 2010, 22, 717-728.
- LALIGANT, A., MARTI, J., CHEFTEL, J.C., DUMAY, E. CUQ., J.L.** Detection of conformational modifications of heated b-lactoglobulin by immunochemical methods. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 2086-2093.

- LAWRENCE, T., GILROY, D.W., COLVILLE-NASH., PR., WILLOUGHBY, D.A.** Possible new role for NF-kappa B in the resolution of inflammation. *Nat. Med.*, 2001, 7, 1291–1297.
- LE POUL, E., LOISON ,C., STRUYF, S., SPRINGAEL, J.Y., LANNOY, V., DECOBECQ, M.E., BREZILLON, S., DUPRIEZ, V., VASSART, G., VAN DAMME, J., PARMENTIER, M., DETHEUX, M.** Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(28), 25481-25489.
- LEA, C.H., HANNAN, R.S.** Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. The effects of activity of water, of pH and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1949, 313-325.
- LEE T, SCHWANDNER, R., SWAMINATH, G., WEISZMANN, J., CARDOZO, M.** Identification and functional characterization of allosteric agonists for the G protein-coupled receptor FFA2. *Mol Pharmacol*, 2008, 74, 1599–609.
- LEE, T.C., PINTAURO, S.M., CHICHESTER, C.O.** Nutritional and toxicological effects of nonenzymatic Maillard Browning. *Diabetes*, 1982, 31, 37-46.
- LEKSTROM-HIMES, J.A, GALLIN, J.I.** Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N. Engl. J. Med.*, 2000, 343(23), 1703-1714.

- LI, J., SCHMIDT, A.M.** Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 16498-16506.
- LINDEN, D.R., FOLEY, K.F., MCQUOID, C., SIMPSON, J., SHARKEY, K.A. MAWE, G.M.** Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis. *Neurogastroenterol. Motil.*, 2005, 17, 565-574.
- LINDENMEIER, M., FAIST, V., HOFMANN, T.** Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in breadcrust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I=II enzymemodulating activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 6997–7006.
- LINDENMEIER, M., HOFMANN, T.** Influence of baking conditions and precursor supplementation on the amounts of the antioxidant pronyl-Llysine in bakery products. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 350–354.
- LÓPEZ SAN ROMÁN, A., BERMEJO, F.** Inflammatory Bowel Disease in Spain: problems grow. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 2004, 96(5), 291-295.
- LUTTERLOH, E.C., OPAL, S.M., PITTMAN, D.D., KEITH, J.C., TAN, X.Y., CLANCY, B.M., PALMER, H., MILARSKI, K., SUN, Y., PALARDY, J.E., PAREJO, N.A., KESSIMIAN, N.** Inhibition of the RAGE products increases survival in experimental models of severe sepsis and systemic infection. *Crit Car.* 2007, 11, R122.

- MACFARLANE, S., MACFARLANE, G.T.** Regulation of short –chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.*, 2003, 62, 67-72.
- MACIA, L., THORBURN, A.N., BINGE, L.C., MARINO, E., ROGERS, K.E., MASLOWSKI, K.M., VIEIRA, A.T., KRANICH, J., MACKAY, C.R.** Microbial influences on epithelial integrity and immune function as a basis for inflammatory diseases. *Immunol Rev.* 2012, 245, 164-176.
- MADSEN, K.L., YANCHAR, N.L., SIGALET, D.L., REIGEL, T., FEDORAK, R.N.** FK506 increases permeability in rat intestine by inhibiting mitochondrial function. *Gastroenterology*, 1995, 109, 107–114.
- MADSEN, K. L., MALFAIR, D., GRAY, D., DOYLE, J.S., JEWELL, L.D., FEDORAK, R.N.** Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflam. Bow. Dis.*, 1999, 5, 262–270.
- MAKI, M., VESIKARI, T., RANTALA, I., GRONROOS, P.** Yersiniosis in children. *Arch. Dis. Child.* , 1980, 55, 861–865.
- MAKITA, Z., RADOFF, S., RAYFIELD, E.J., YANG, Z., SKOLNIK, E., DELANEY, V., FRIEDMAN, E.A.** Advanced glycosylation endproducts in patients with diabetic nephropathy. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 325, 836–842.
- MARHMAN, E., BOOTH C., POTTEN, C.S.** The intestinal epithelial stem cell. *Bio Assays*, 2002, 24, 91-98.
- MARIATHASAN, S., WEISS, D.S, NEWTON, K.** Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 2006, 440,



228–232.

- MARTIN, F., AMES, J.** Formation of Stecker aldehydes and pyrazines in fried potato model systems. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3885–3892.
- MARTÍN, M.M., RAMOS, S., MATEOS, R., RUFÍAN-HENARES, J.A., MORALES, F.J., BRAVO, L., GOYA, L.** Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 7250–7258.
- MARTINON, F., BURNS, K., TSCHOPP, J.** The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.*, 2002, 10, 417–426.
- MARTINON, F., PETRILLI, V., MAYOR, A.** Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 2006, 440, 237–241.
- MASLOWSKI, K.M., VIEIRA, A.T., KRANICH J.** Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 2009, 461, 1282–1286.
- MATSUKI, T., WATANABE, K., FUJIMOTO, J., TAKADA, T., TANAKA, R.** Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces. *Appl. Environm. Microbiol.* 2004, 71, 7220–7228.
- MAUKONEN, J., MATTO, J., SATOKARI, R., SODERLUND, H., MATTILA-SANDHOLM, T., SAARELA, M.** PCRDGGE and RT-PCRDGGE show diversity and short-term temporal stability in the Clostridium

- coccoides-Eubacterium rectale group in the human intestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006, 58, 517–528.
- MAURON, J.** The Maillard reaction in food, a critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 5-35.
- MAWDSLEY, J.E., RAMPTON, D.S.** Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 2005, 54, 1481–1491.
- MAYER LL.** Epithelial cell antigen presentation. *Current Opin. Gastroenterol.*, 2000, 16, 531-535.
- MCKENZIE, J. A., RIDLEY, A. J.** Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF- $\alpha$ -induced changes in endothelial morphology and permeability. *J. Cell. Physiol.*, 2007, 213, 221–228.
- MCPHERSON, E., SHILTON, J.D., B.H., WALTON, D.** Casein biochemistry. *Biochem. J.*, 1988, 27, 1901-1907.
- MERCURIO, F., MANNING, A.M.** NF-kappa B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene*, 1999, 18, 6163–6171.
- MOLODECKY, N.A., PANACCIONE, R., GHOSH, S., BARKEMA, H.W. KAPLAN, G.G.** Challenges associated with identifying the environmental determinants of the inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011, 17, 1792-1799.
- MONTGOMERY, M.W., DAY, E.A.** Aldehyde-amine condensation reactions, a possible fate of carbonyls in foods. *J. Food Sci.*, 1965, 30, 828-832.

- MORCOS, M., SAYED, A.A., BIERHAUS,A., YARD, B., WALDHERR, R., MERZ, W., KLOETING, I., SCHLEICHER, E., MENTZ, S., ABD EL BAKI, R.F., TRITSCHLER, H., KASPER, M., SCHWENGER, V., HAMANN, A., DUGI, K.A., SCHMIDT, A.M., STERN, D., ZIEGLER, R., HAERING, H.U., ANDRASSY, M., VAN DER WOUDE ,F., NAWROTH, P.P.** Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2002, 51(12), 3532-3544.
- MORTENSEN, F.V., NIELSEN, H., AALKJAER, C., MULVANY, M.J., HESSOV, I.** In vivo and vitro effects of short-chain fatty acids on Intestinal blood circulation. *Pharmacol.Toxicol.*, 1995, 75, 181-185.
- MOTTRAM, D., WEDZICHA, B., DODSON, A.** Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 2002, 419, 448-449.
- MOUGHAM, P.J., GALL, M.P.J., RUTHERFORD, S.M.** Absorption of lysine and deoxyketolysine in an early Maillard browned casein by the growing pig. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 1520-1525.
- MOYE, C.J., KRZEMINSKI, Z.S.** The formation of 5-hydroxymethylfurfural from hexoses. *Aust. J. Chem.*, 1963, 16, 258-269.
- MUCIDA, D., PARK, Y., TUROVSKAYA, O., SCOTT, I., KRONENBERG, M., CHEROUTRE, H.** Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 2007, 317, 256–260.
- MULDERS, E.J., MAARSE, H., WEARMAN, C.** 1972. Citado por Velisek y col. 1976.

- MURKOVIC, M., PICHLER, N.** Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 842–846.
- MUTLU, E.A., ENGEN, P.A., SOBERANES, S., URICH, D., FORSYTH, C.B., NIGDELIOGLU, R., CHIARELLA, S.E., RADIGAN, K.A., GONZALEZ, A., JAKATE, S., KESHAVARZIAN, A., BUDINGER, S., MUTLU, G.M.** Particulate matter air pollution causes oxidant mediated increase in gut permeability in mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 2011, 8, 19.
- NADIYA, B., BERNHARD, M. HEINZ, F., ALBRECHT, S., HANSRUEDI, G.** Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate the cellular accumulation of 5-sulfooxymethylfurfural, a reactive, nephrotoxic metabolite of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural. *Biochem. Pharmacol.* 2009, 78, 414–419.
- NAMIKI, M., TERAOKA, A., UEDA, S., HAYASAKI, T.** Determination of lysine in protein by reaction with oxidized ascorbic acid or active carbonyl compounds produced by Maillard reaction. En: Amino-carbonyl reactions in food and biological systems, Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International symposium on the Maillard reaction, Susono, Shizuoka (Japan), 1985, Fujimaki, M.; Namiki, M.; Kato, H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1986, 105-114.
- NAWROTH, P., BIERHAUS, A., MARRERO, M., YAMAMOTO, H., STERN, D.M.** Atherosclerosis and restenosis: is there a role for RAGE? *Curr. Diab. Rep.*, 2005, 5, 11–16.

- NIKOLAUS, S., BAUDITZ, J., GIONCHETTI, P., WITT, C., LOCHS, H., SCHREIBER, S.** Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut*, 1998, 42(4), 470-476.
- NORMAND, S., DELANOYE-CRESPIN, A., BRESSENOT, A.** Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2011, 108, 9601–9606.
- NURSTEN, H.E.** Recent developments in studies of the Maillard reaction. *Food Chem.*, 1980, 6, 263-277.
- NURSTEN, H.E.** Maillard browning reactions in dried foods, Concentration and Drying of Foods, *Elsevier Applied Science Publishers*, London, 1986, 53-68.
- OBRETE NOV, T.D., ARGIROV, O.K., RASHKOV, I.B.** On melanoidin formation with furfural participation, synthesis of melanoidins from furfural and glycine. *J. Food Process. Preser.*, 1983, 7, 115-126.
- O'BRIEN, J., MORRISEY, P.A.** Metal ion complexation by products of the Maillard reaction. *Food Chem. Toxicol.*, 1988, 26 (9), 775-783.
- O'BRIEN, J. A., MORRISEY, P.A.** Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1989, 28, 211-248.

- O'BRIEN, J., MORRISSEY, P.A., FLYNN, A.** Alterations of Maillard metabolites and secondary pathology in rats fed Maillard reaction products. En: *Maillard reaction in chemistry, food and health*. Ed.: Labuza, T.P.; Reineccius, G.A.; Monnier, V.; O'Brien, J. y Baynes, J. 1994, 397-401.
- OGURA, Y., BONEN, D.K., INIHARA, N., NICOLAE, D.L., CHEN, F.F., RAMOS, R., BRITTON, H., MORAN, T., KARALIUSKAS, R., DUERR, R.H., ACHKAR, J.P., BRANT, S.R., BAYLESS, T.M., KIRSNER, B.S., HANAUER, S.B., NUÑEZ, G., CHO, J.H.** A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohns disease. *Nature*, 2001, 411, 603-606.
- O'HARA, A.M., SHANAHAN, F.** The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 2006, 7(7), 688-693.
- O'HARA, J.R., BURET, A.G.** Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front. Biosci.*, 2008, 13, 7008-7021.
- OH-DA, Y., TALUKDAR, S., BAE, E.J., IMAMURA, T., MORINAGA, H., FAN, W., LI, P., LU, W.J., WATKINS, S.M., OLEFSKY, J.M.** GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, 2010, 142, 687-698.
- OMS, Organización Mundial de la Salud.** Guidelines for drinking-water quality (2<sup>nd</sup>. Ed.) Health criteria and other supporting information, 2, Geneva: Organic Constituents, 1996.

- ONO, S., KARAKAI, S.I., KUWAHARA, A.** Short chain fatty acids decrease the frequency of spontaneous contractions of longitudinal muscle via enteric nerves in rat distal colon. *Jpn. J. Physiol.*, 2004, 54, 483-93.
- O'REILLY, R.** The nature of the chemical grouping is responsible for the colour of the products of the Maillard reaction, Ph.D. Thesis University of Reading, Reading, 1982.
- OSTE, R., BJORK, I., DAHLQVIST, A., JAGERSTAD, M., SJODIN, P., SJOSTROM, H.** Effect of a glucose-lysine reaction mixture on protein and carbohydrate digestion and absorption. En: The Maillard reaction in foods and nutrition, Waller, G.R. y Feather, M.S., (Eds.), *American Chemical Society, Symposium Series*, 215, Washington D.C., 1983, 405-417.
- OSTE, R., SJODIN, P., JAGERSTAD, M., BJORCK, I., DAHLQVIST, A.** Effect of Maillard reaction products on carbohydrate utilization -studies in vitro and in vivo. *Food Chem.*, 1985, 16, 37-47.
- OSTE, R., DAHLQVIST, A., SJOSTROM, H., NOREN, O., MILLER, R.** Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vitro studies. *J. Agric. Food Chem.*, 1986, 34, 355-358.
- OSTE, R., MILLER, R., SJOSTROM, H., NOREN, O.** Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35, 938-942.
- OVERBY, L. R., FROST, D. V.** The effect of heat on the nutritive value of protein hydrolyzates with dextrose. *J. Nutr.*, 1952, 46, 39-550.

- PALAZZO, M., BALSARI, A., ROSSINI, A., SELLERI, S., CALCATERRA, C., GARIBOLDI, S., ZANOBBIO, L., ARNABOLDI, F., SHIRAI, Y.F., SERRAO, G., RUMIO, C.** Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion. *J. Immunol.*, 2007, 178, 4296–4303.
- PARKOS, C.A.** Molecular events in neutrophil transepithelial migration. *Bioessays*. 1997, 19(10), 865-873.
- PASTORIZA, S., DELGADO-ANDRADE, C., RUFÍÁN-HENARES, J.A.** A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chem.* 2011, 129, 1926–1932.
- PENG, I., HE, Z., CHEN, W., HOLZMAN, I.R., LIN, J.** Effects of butyrate on intestinal barrier function in a caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr. Res.*, 2007, 61, 37-41.
- PEPPA, M., BREM, H., EHRlich, P., ZHANG, J.G.** Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice, *Diabetes*, 2003, 52, 2805-2813.
- PEPPA, M., URIBARRI, J., VLASSARA, H.** The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis, *Curr. Diab. Rep.*, 2004, 4, 31-36.
- PERKINS, E.G., BAKER, D.H., JOHNSON, G.H., MAKOWSKI, E.** The metabolism of fructose-phenylalanine in the rat. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 229-242.



- PIGMAN, W., JOHNSON, K.C.** Reactions of Carbohydrates with Nitrogenous Substances.<sup>1</sup> III. The Tetraacetates of N-D-Glucosylaniline. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 3464–3466.
- POKORNY, J.** Browning for lipid-protein interactions. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 421-425.
- POWELL, R.C.T., SPARK, A.A.** Effect of zirconium and aluminium compounds and pH on the Maillard reaction. *J. Sci. Food Agric.*, 1971, 22, 596-599.
- PURLIS, E.** Browning development in bakery products. *J. Food Engin.*, 2010, 99, 239-249.
- RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F.** Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 2004, 118, 229–241.
- RAMAN, K.G., SAPPINGTON, P.L., YANNG, R., LEVY, R.M., PRINCE, J.M., LIU, S., WATKINS, S.K., SCHMIDT, A.M., BILLIAR, T.R., FINK, M.P.** The role of RAGE in the pathogenesis of intestinal barrier dysfunction after hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Lives Physiol.*, 2006, 291, G556-G565.
- RAMASAMY, R., VANNUCCI, S.J., YAN, S.S., HEROLD, K., YAN, S.F., SCHMIDT, A.M.** Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*, 2005a, 15, 16R–28R.
- RAMASAMY, R., YAN, S.F., SCHMIDT, A.M.** The RAGE axis and endothelial dysfunction: maladaptive roles in the diabetic

- VASCULATURE and beyond. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2005b, 15, 237–243.
- RAMASUNDARA, M., LEACH, S.T., LEMBERG, D.A., DAY, A.S.** Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, 24, 202–208.
- RAO, M. N., SREENIVAS, H., SWAMINATHAN, M., CARPENTER, K.J., MORGAN, C.B.** The nutritionally available lysine and methionine of heated casein-glucose mixtures. *J. Sci. Food Agric.*, 1963, 14, 544-550.
- RENDELMAN, J.A.** Carbohydrate-mineral complexes in foods. En: Interactions of Food Components, Birch G.C. and Lindley, M.G. *Ed. Elsevier*, London, 1986, 63-83.
- RENDELMAN, J.A.** Complexation of calcium by the melanoidin and its role in determining bioavailability. *Journ. Food Sci.*, 1987, 52, 1699-1705.
- RENDELMAN, J.A., INGLETT, G.E.** Influence of cupric ion on the Maillard reaction of glucose with glycine. Paper presented at 187<sup>th</sup> ACS National Meeting, St. Louis, M.O. 1990, April, 8-13.
- RESMINI, P., PELLEGRINO, L.** Occurrence of protein-bound lysylpyrrolaldehyde in dried pasta. *Cereal. Chem.*, 1994, 71, 254–262.
- RICHARDS, E.L.** 1956. Citado por O'Brien, J. y Morrissey, P.A., 1989.

- RIESEN, W. H., CLANDININ, D. R., ELVEHJEM, C. A., CRAVENS, W. W.** Liberation of essential amino acids from raw, properly heated, and overheated soybean-oil meal. *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 143-150.
- RIZZI, G.P.** Chemical structure of coloured Maillard reaction products. *Food Rev. Int.*, 1997, 13, 1-28.
- ROSEN, L., JOHNSON, K. C., PIGMAN, W.** Reaction of carbohydrates with nitrogenous substances. II. Factors affecting the darkening of N-D-glucosylaniline. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 3464-3464.
- ROSIGNOLI, P., FABIANI, R., DE BARTOLOMEO, A., SPINOZZI, F., AGEA, E., PELLI, M.A., MOROZZI, G.** Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumor cells. *Carcinogenesis*, 2001, 22, 1675-80.
- RUBIN, D.C., ZHANG, H., QIAN, P., LORENZ, R.G., HUTTON, K., PETERS, M.G.** Altered enteroendocrine cell expression in T cell receptor alpha chain knock-out mice. *Microsc. Res. Tech*, 2000, 51, 112–120.
- RUFÍÁN-HENARES, J.A., GUERRA-HERNANDEZ, E., GARCIA-VILLANOVA, B.** Pyrrolidine content in enteral formula processing and storage and model systems. *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, 219, 42–47.
- RUFÍÁN-HENARES, J.A., MORALES, F.J.** Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. *J Agric Food Chem.*, 2007, 55, 10016–10021.

- RUFÍÁN-HENARES, J.A., DE LA CUEVA, S.P.** Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Add. Contam.*, 2008, 25, 1306–1312.
- RUFÍÁN-HENARES, J.A., MORALES, F.J.** Microtiter plate-based assay for screening the specific antimicrobial activity of melanoidins. *Food Chem.*, 2008, 111, 1069–1074.
- RUFÍÁN-HENARES, J.A., DELGADO-ANDRADE, C.** Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Res. Intern.*, 2009, 42, 394-400.
- RUFÍÁN-HENARES, J.A., DELGADO-ANDRADE, C., MORALES, F.J.** Non-enzymatic browning: The case of the Maillard reaction. En: *Assesing the generation and bioactivity of neoformed compounds in thermally treated foods*. Ed: Atrio, Edición 2009a.
- RUFÍÁN-HENARES, J.A., DELGADO-ANDRADE, C., MORALES, F.J.** Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. *Food Chemistry*, 2009b, 114, 93-99.
- SAKATA, T.** Effects of short- chain fatty acids on the proliferation of gut epithelial cells in vivo. *Physiological and Clinical Aspects of Short Chain Fatty Acid*. Cambridge University Press Cambridge, UK, 1995, 289-305.
- SALEH, M., TRINCHIERI, G.** Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, 11, 9–20.

- SARTOR, R. B.** Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2008, 134, 577–594.
- SCHLEICHER, E.D., WAGNER, E., NERLICH, A.G.** Increased accumulation of the glycoxidation product N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99, 457–468.
- SCHMIDT, A.M., YAN, S.D., YAN, S.F., STERN, D.M.** The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1498, 99–111.
- SCHMIDT, J., SMITH, N.J., CHRISTIANSEN, E., TIKHONOVA, I.G., GRUNDMANN, M., HUDSON, B.D., WARD, R.J., DREWKE, C., MILLIGAN, G., KOSTENIS, E., ULVEN, T.** Selective orthosteric free fatty acid receptor2 (FFA2) agonist. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 10628-10640.
- SCHNEPF, M.I., SATTERLEE, L.D.** The interaction of iron with proteins and peptides. En: Interaction of food components, Birch, G.G.; Lindley, M.G. (Eds.), *Elsevier*, London, 1986, 43-55.
- SCHOULTZ, I., SÖDERHOLM, J.D., MCKAY, D.M.** Is Metabolic Stress a Common Denominator in Inflammatory Bowel Disease? *Inflam. Bow. Dis.*, 2011, 17, 2008-2018.
- SCHWART, H.M., LEA, C.H.** The reaction between proteins and reducing sugars in the "dry" state. Relative reactivity of the alfa-amino groups of insulin. *Biochem. J.*, 1952, 50, 713-719.

- SCHWEDLER, T., METZGER, S.B., SCHINZEL, R., WANNER, C.** Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney International*, 2002, 62, 301–310.
- SEBEKOVÁ, K., SOMOZA, V.** Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects – PRO. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 1079 – 1084.
- SEGAL, F., PROLLA, J.C., MAGUILNIK, I., WOLFF, F.H.** Clinical and endoscopic aspects in the evolution of patients with bleeding peptic ulcer--a cohort study. *Arq Gastroenterol.*, 2000, 37(3), 162-167.
- SERPEN, A., CAPUANO, E., FOGLIANO, V., GOKMEN, V.** A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 7676–7681.
- SERRA-MAJEM, LL., RIBAS, L., NGO DE LA CRUZ, J., ORTEGA, R.M.** In: Serra Majem, Ll., Aranceta Bartrina, J. (Eds), *Alimentación infantil y juvenil*, Estudio Enkid Masson, Barcelona, Spain, 2002, 51-59.
- SGARBIERI, V.C., AMAYA, J., TANAKA, M., CHICHESTER, C.O.** Nutritional consequences of the Maillard reaction. Aminoacid availability from fructose-leucine and fructose-tryptophan in the rat. *J. Nutr.*, 1973, 103, 657-663.
- SHIZUUCHI, S., HAYASE, F.** Antioxidative activity of the blue pigment formed in a D-xylose-glycine reaction system. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003, 67(1), 54-59.

- SIEGMUND, B., LEHR, H.A., FANTUZZI, G., DINARELLO, C.A.** IL-1 $\beta$ -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 13249–13254.
- SIMON, D. B., LU, Y., CHOATE, K.A., VELAZQUEZ, H., AL-SABBAN, E., PRAGA, M., CASARI, G., BETTINELLI, A., COLUSSI, G., RODRIGUEZ-SORIANO, J., MCCREDIE, D., MILFORD, D., SANJAD, S., LIFTON, R.P.** Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science*, 1999, 285, 103–106.
- SINA, C., GAVRILOVA, O., FORSTER, M., TILL, A., DERER, S.** G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J. Immunol.*, 2009, 183, 7514–7522.
- SODERHOLM, J.D., OLAISON, G., LINDBERG, E., HANNESTAD, U., VINDELS, A., TYSK, C., JÄRNEROT, G., SJÖDAHL, R.** Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence? *Gut*. 1999, 44, 96–100.
- SODERHOLM, J.D., PERDUE, M.H.** Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2001, 280, G7–G13.
- SOKOL, H. PIGNEUR, B., WATTERLOT, L., LAHKADARI, O., BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G., GRATADOUX, J.J., BLUGEON, S., BRIDONNEAU, C., FURET, J.P., CORTHER, G.** Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut

- microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 16731-16737.
- SONG, P. S., CHICHESTER, C.O.** Kinetic behaviour and mechanism of inhibition in the Maillard reaction. IV. Mechanism of the inhibition. *J. Food Sci.*, 1967, 32, 107-115.
- STADLER, R., BLANK I., VARGA, N., ROBER F., RIEDKER, S.** Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 2002, 419, 449-450.
- STADTMAN, F.H., CHICHESTER, C.O., MACKINNEY, C.** Carbon dioxide production in the browning reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 3194-3196.
- STEPANENKO, B. N., SERBYUK, O. G.** The content of acyclic forms of various sugars in aqueous solutions. *Biokhimiya*, 1950, 15, 155-164.
- STERN, D., YAN, S.D., YAN, S.F., SCHMIDT, A.M.** Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Age Res. Rev.*, 2002, 1-15.
- STODDART, L.A., SMITH, N.J., JENKINS, L., BROWN, A.J., MILLIGAN, G.** Conserved polar residues in transmembrane domains V, VI, and VII of free fatty acid receptor 2 and free fatty acid receptor 3 are required for the binding and function of short chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 32913-32924.
- STROWIG, T., HENAO-MEJIA, J., ELINAV, E., FLAVELL, R.** Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 2012, 481, 278-286.
- SUIRE, S., CONDLIFFE, A.M., FERGUSON, G.J., ELLSON, C.D., GUILLOU, H., DAVIDSON, K., WELCH, H., COADWELL, J., TURNER, M.,**



- CHILVERS, E.R., HAWKINS, P.T., STEPHENS, L.E.** Gs and the Ras binding domain of p110 are both important regulators of PI3K signalling in neutrophils. *Nature Cell Biol*, 2006, 8, 1303-1309.
- SURH, Y.J., LIEM, A., MILLER, J.A., TANNENBAUM, S.R.** 5-Sulfooxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis*, 1994, 15, 2375–2377.
- SUTTERWALA, F.S., OGURA, Y., SZCZEPANIK, M.** Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*, 2006, 24, 317–327.
- SWAMINATH, G., JAECKEL, GUO, Q., CARDOZO, M., WEISZMANN, J., LINDBERG, R., WANG, Y., SCHWANDNER, R., LI, Y.** Allosteric rescuing of loss-of-function FFAR2 mutations. *FEBS Letters*, 2010, 584, 4208-4214.
- TAMURA, K., FUKUDA, Y., SASHIO, H.** IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease. *J Gastroenterol.*, 2002, 37, 111–116.
- TAREKE, E., RYDBERG P., KARLSSON P., ERIKSSON S., TORNQUIST, M.** Analysis of acrylamide a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 4998-5006.
- TESSIER, F., BIRLOUEZ-ARAGON, I.** Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids*, 2012, 42, 1119–1131.

- THIELE, K., BIERHAUS, A., AUTSCHBACH, F., HOFMANN, M., STREMMEL, W., THIELE, H., ZIEGLER, R., NAWROTH, P.P.** Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF kappaBp65/IkappaBalph system in patients with Crohn's disease. *Gut*, 1999, 45, 693–704.
- THORNALLEY, P.J.** Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell.Mol.Biol. (Noisy-le-grand)*, 1998, 44, 1013–1023.
- THORNALLEY, P.J.** Clinical significance of glycation. *Clin. Lab.*, 1999, 45, 263–273.
- THORNALLEY, P.J., BATTAH, S., AHMED, N., KARACHALIAS, N., AGALDU, S., BABAEI-JADIDI, R., DAWNAY, A.** Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.*, 2003, 375, 581-592.
- TRESSL, R., WONDRAK, G.T., GARBE, L.A.** Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 1765-1776.
- TSAI, H.H., DWARAKANATH, A.D., HART, C.A., MILTON, J.D., RHODES, J.M.** Increased faecal mucin sulphatase activity in ulcerative colitis: a potential target for treatment. *Gut*, 1995, 36, 570-576.
- TURNBAUGH, P.J., RIDAURA, V.K., FAITH, J.J., REY, F.E., KNIGHT, R., GORDON, J.I.** The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A

- Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci. Transl. Med.* 1, 2009, 6-14.
- TURNER, J.** Intertinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Rev. Immunol.* 2009, 9, 799-809.
- ULBRICHT, R.J., NORTHUP, S.J., THOMAS, J.A.** A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1984, 4, 843–853.
- URIBARRI, J., CAI, W., SANDU, O., PEPPA, M., GOLDBERG, T., VLASSARA, H.** Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool induce inflammation in healthy subjects. *Ann. Y. Y. Acad. Sci.*, 2005, 1043, 461-466.
- VAISHNAVA, S., BEHRENDT, C.L., ISMAIL, A.S., ECKMANN, L., HOOPER, L.V.** Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 20858–20863.
- VALENCIA, J.V., WELDON, S.C., QUINN, D., KIERS, G.H.** Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Anal. Biochem.* 2004, 324, 68–78.
- VALENTE, T., GELLA, A., FERNANDEZ-BUSQUETS, X. UNZETA, M., DURANY, N.** Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol. Dis.*, 2010, 37, 67–76.

- VAN ITALLIE, C. M., HOLMES, J., BRIDGES ,A., GOOKIN, J.L, COCCARO, M.R., PROCTOR, W., COLEGIO, O.R., ANDERSON, J.M.** The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J. Cell Sci.*, 2008, 121, 298–305.
- VELISEK, J., DAVIDEK, J., KUBELKA, V., ZELINKOVÁ, Z., POKORNY, J** .Volatile degradation products of L-dehydroascorbic acid. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 1976, 162, 285-290.
- VERNIA, P., MARCHEGGIANO, A., CAPRILLI, R., FRIERI, G., CORRAO, G., VALPIANI ,D., DI PAOLO ,M.C., PAOLUZI, P., TORSOLI, A.** Short-chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1995, 9(3),309-313.
- VIEIRA, A.T., PINHO, V., LEPSCH, L.B., SCAVONE, C., RIBEIRO, I.M., TOMASSINI, T., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., SOARES, M., TEIXEIRA, M.M., SOUZA, D.G.** Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.*, 2005,146, 244–251
- VIEIRA, A.T., DE LEON, E., SHIM, D., SCHILTER, H., MASLOWSKI, K., AMARAL, F.A., TEIXEIRA, M.M., MACKAY, C.R.** Activation of g-protein coupled receptor 43 by short chain fatty acids regulates inflammation on acute gout: role of diet and commensal microbiota. *Inflamm. Res.*, 2011, 60, 177.
- VILLANI, A.C., LEMIRE, M., FORTIN, G.** Common variants in the NLRP3

region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.*, 2009, 41, 71–76.

**VINOLO, M.A., RODRIGUES, H.G., HATANAKA, E., HEBEDA, C.B., FARSKY, S.H.** Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin. Sci. (Lond)*, 2009, 117, 331–338.

**VLISSARA, H., CAI, W., CRANDALL, J., GOLDBERG, T.** Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99, 15596–15601.

**VOSS, E., WEHKAMP, J., WEHKAMP, K., STANGE, E.F., SCHRODER, J.M., HARDER, J.** NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 2005–11.

**WANG, Y., JIAO, X., KAYSER, F., LIU, J., WANG, Z., WANSKA, M., GREENBERG, J., WEISZMANN, J., GE, H., TIAN, H., WONG, S., SCHWANDER, R., LEE, T., LI, Y.** The first synthetic agonists of FFA2: Discovery and SAR of phenylacetamides as allosteric modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20, 493–9498.

**WATSON, C. J., HOARE, C. J., GARROD, D. R., CARLSON, G. L., WARHURST, G.** Interferon- $\gamma$  selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *J. Cell Sci.*, 2005, 118, 5221–5230.

- WEHKAMP, J., SALZMAN, N.H., PORTER, E., NUDING, S., WEICHENTHAL, M., PETRAS, R.E., SHEN, B., SCHAEFFELER, E., SCHWAB, M., LINZMEIER, R., FEATHERS, R.W., CHU, H., LIMA, H. JR, FELLERMANN, K., GANZ, T., STANGE, E.F, BEVINS, C.L.** Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 18129–18134.
- WIJEWICKREME, A.N., KITTS, D.D., DURANCE, T.D.** Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondializable model Maillard products. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 4577-4583.
- WILLOUGHBY, R.P., HARRIS, K.A., CARSON, M.W., MARTIN, C.M., TROSTER, M., DEROSE, G., JAMIESON, W.G., POTTER, R.F.** Intestinal mucosal permeability to <sup>51</sup>Cr ethylenediaminetetraacetic acid is increased after bilateral lower extremity ischemia-reperfusion in the rat. *Surgery*. 1996, 120(3), 547-553.
- WOLF, J.C., THOMPSON, D.R., REINECCIUS, G.A.** Initial losses of available lysine in model systems. *J. Food Sci.*, 1977, 42, 1540-1544.
- WOLF, S.P.** Free radicals and glycation theory. In: Ikan RI, (Ed). The Maillard reaction. *Consequences for chemical and life science*; Wiley: Chichester, UK, 1996, 72-88.

- WOLFF, S.P., DEAN, R.T.** Glucose autoxidation and proteinmodification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.*, 1987, 245, 243–250.
- WOLFRON, M.L., ROONEY, C.S.** Chemical interactions of amino compounds and sugars. VIII. Influence of water. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 5435-5436.
- WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G., POOL-ZOBEL, B.L.** Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, 73, 451- 455.
- WONG, J.M., DE SOUZA, R., KENDALL, C.W., EMAM, A., JENKINS, D.J.** Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin Gastroenterol.*, 2006, 40(3), 235-243.
- WRIGHT, D.P., ROSENDALE, D.I., ROBERTSON, A.M.** Prevotella enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 190, 73-79.
- WU, H.J., IVANOV, II., DARCE, J., HATTORI, K., SHIMA, T., UMESAKI, Y., LITTMAN, D.R., BENOIST, C., MATHIS, D.** Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, 2010, 2532(6), 815-827.
- XIE, J., REVERDATTO, S., FROLOV, A., HOFFMANN, R., BURZ, D.S., SHEKHTMAN, A.** Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 27255–27269.

- XUE, J., RAI, V., SINGER, D., CHABIERSKI, S., XIE, J., REVERDATTO, S., BURZ, D.S., SCHMIDT, A.M., HOFMANN, R., SHEKHTMAN, A.** Advanced glycation end product recognition by the receptor of AGEs. *Structure*, 2011, 722-732.
- YAN, Y., KOLACHALA, V., DALMASSO, G., NGUYEN, H., LAROU, H., SHANTHI V.** Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *Plos One*, 2009, 4, e6073-6073.
- YU, H., PARDOLL, D., JOVE, R.** STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, 9, 798–809.
- ZAKI, M.H., BOYD, K.L., VOGEL, P.** The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity*, 2010, 32, 379–391.
- ZAKI, M.H., VOGEL, P., MALIREDDI, S., BODY-MALAPEL, M., NAND, P.K., BERTIN, J., GREEN, D.R., LAMKANFI, M., KANNEGANTI, T-D.** The NOD-Like receptor NLRP12 Attenuates Colon Inflammation and Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2011, 20, 649-660.
- ZHANG, X.M., CHAN, C.C., STAMP, D., MINKIN, S., ARCHER, M.C., BRUCE, W.R.** Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose. *Carcinogenesis* 1993, 14, 773–775.
- ZHERNAKOVA, A., FESTEN, E.M., FRANKE, L.** Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two



susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Am. J. Hum. Genet.*, 2008, 82, 1202–1210.

**ZYZAK, D., SANDERS, R., STOKANOVIC, M., TALLMUDGE, D., EBERHORT, B., EWALL, D.** Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 4782-4787.

Figures are reprinted with permission from Elsevier and Nature Publishing Group [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER].