

## **ACTIVE HEXOSE CORRELATED COMPOUND (AHCC) como terapia alternativa en Enfermedad Inflamatoria Intestinal**

El AHCC ejerce efectos antiinflamatorios cuando se administra como pretratamiento a ratas con colitis inducida por la administración de TNBS, un modelo preclínico de EII ampliamente usado.

El mecanismo de acción del AHCC podría estar relacionado con su capacidad de incrementar la presencia de microbiota beneficiosa (bacterias ácido lácticas y bifidobacterias), y de reducir la presencia de clostridios. El AHCC actuaría pues como prebiótico.

Nuestros estudios *in vitro* han mostrado que el AHCC potencia la producción de citocinas proinflamatorias (IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) por células de la mucosa intestinal (células epiteliales y macrófagos) mediante la estimulación de TLR4/MyD88 y de las vías de traducción de señal mediadas por MAPKs y NF- $\kappa$ B. Por lo que deducimos que podría, como mecanismo independiente de su acción prebiótica, actuar potenciando la inmunidad y por tanto la función de barrera y de defensa de la mucosa. Aunque es difícil trasladar los efectos *in vitro* a efectos *in vivo*, este mecanismo de acción del AHCC podría proporcionar también una explicación molecular y celular de sus efectos sobre el manejo de los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia en pacientes con cáncer.

El AHCC podría ser una adición valiosa a las alternativas terapéuticas actuales para la EII. No obstante es obvio que se necesitan más estudios para validar estos resultados

Hemos puesto a punto una técnica que permite la determinación de las actividades MPO y AP en una misma muestra, lo que no sólo permite la utilización de menos muestras, sino que también ahorra tiempo de homogenización.



Departamento de Bioquímica y Biología molecular II  
Universidad de Granada

**TESIS DOCTORAL**  
**JUAN ENRIQUE MARTÍNEZ DE LA PLATA**

**Granada, 2013**

**Título:** ACTIVE HEXOSE CORRELATED COMPOUND (AHCC) como terapia  
alternativa en Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Juan Enrique Martínez de la Plata  
D.L.: GR 1706-2013  
ISBN: 978-84-9028-584-4

Memoria presentada para aspirar al Título de Doctor en Farmacia por  
el licenciado Juan Enrique Martínez de la plata

Fdo.: Juan Enrique Martínez de la plata

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, bajo la dirección de la Catedrática: Olga Martínez Augustin y los Doctores Abdelali Daddaoua y Raquel González Pérez.

**Olga Martínez Augustin**

Catedrática de Universidad  
Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular II  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

**Abdelali Daddaoua**

Titulado Superior Técnico  
Profesional con Grado de Doctor  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)  
Granada

**Raquel González Pérez**

Departamento de Farmacología  
Investigadora del CIBER-ehd  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

## **AGRADECIMIENTOS**

## **I. ÍNDICE**

**I. ÍNDICE**

- i. Índice
- ii. Abreviaturas

**II. ANTECEDENTES**

	1
1. Aspectos generales de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal	2
2. Epidemiología Enfermedad Inflamatoria Intestinal	5
3. Etiología Enfermedad Inflamatoria Intestinal	6
3.1 Factores genéticos	6
3.2 Microbiota intestinal y agentes infecciosos	10
3.3 Anticonceptivos orales	12
3.4 Apendicetomía	13
3.5 Tabaco	13
3.6 Estrés	14
3.7 Factores inmunológicos	15
4. FISIOPATOLOGÍA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	15
5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	22
5.1 Receptores relacionados con EII	23
5.1.1 TLR	24
5.1.2 NLR	27
5.2 Vías de señalización relacionadas con EII	29
5.2.1 Factor de transcripción nuclear kappa B	29
5.2.2. Mitogen-activated protein kinasas	32
5.2.3. Janus kinases-signal transducers and activators of transcription	33
5.2.4. Receptor activado por proliferadores de peroxisomas- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )	34
6. Modelo experimental de Enfermedad Inflamatoria Intestinal	34
6.1. Colitis por ácido trinitro-bencenosulfónico en ratas (TNBS)	35
6.2. Colitis por sulfato de dextrano sódico (DSS)	36
7. TRATAMIENTO ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	37
7.1. Farmacología de la enfermedad inflamatoria intestinal	37
7.1.1 Aminosalicilatos	38
7.1.2 Glucocorticoides	40
7.1.3. Azatioprina y 6-mercaptopurina	42
7.1.4. Metotrexato	43
7.1.5. Ciclosporina y tacrólimo	44
7.1.6. Agentes biológicos o terapia biológica	45
7.1.7. Terapia génica	47
8. PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS	48
8.1. Prebióticos	49
8.1.1. Prebióticos e inflamación intestinal	52

8.2. Probióticos	53
8.2.1. Probióticos e inflamación intestinal	54
8.3. Simbióticos	55
8.3.1. Simbióticos e inflamación intestinal	56
9. ACTIVE HEXOSE CORRELATED COMPOUNDS (AHCC)	56
9.1. AHCC e infecciones	57
9.2. AHCC y cáncer	58
9.3. Efecto de AHCC en el sistema inmune	60
<b>III. OBJETIVOS</b>	62
<b>IV. RESULTADOS</b>	64
<b>Capítulo I:</b> <i>Active Hexose Correlated Compound actúa como prebiótico y antiinflamatorio en ratas con colitis inducida por TNBS</i>	65
<b>Capítulo II:</b> <i>El suplemento nutritivo Active Hexose Correlated Compound (AHCC) tiene 95acción inmunomoduladora directa sobre las células epiteliales intestinales y m101acrófos que implican TLR/MyD88 y la activación de la vía NF-kB/MAPK</i>	74
<b>Capítulo III:</b> <i>Medida de las actividades mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en la misma muestra de tejido intestinal</i>	84
<b>V. DISCUSIÓN</b>	89
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	102
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	104
<b>VIII. ANEXO</b>	127
Índice de Tablas	128
Índice de Figuras	128
Formación científica	129
Publicaciones científicas en revistas indexadas	129
Capítulos en Libro	129



## ii) Abreviaturas

<b>5-ASA</b>	Ácido 5-aminosalicílico ( <i>5-aminoacilic acid</i> ).
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AGCC</b>	Ácidos Grasos de Cadena Corta.
<b>AHCC</b>	Active Hexose Correlated Compound.
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígenos ( <i>Antigen presented cell</i> ).
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>CAM</b>	Molécula de adhesión celular ( <i>Cellular adhesion molecule</i> )
<b>CAMPS</b>	Patrones moleculares asociados a microbiota ( <i>Microbial-associated molecular patterns</i> ).
<b>CBP</b>	Proteínas de Unión a CREBP ( <i>CREBP binding proteína</i> ).
<b>COX2</b>	Ciclooxigenasa 2.
<b>CRF</b>	Factor liberador de corticotropina ( <i>Corticotropin releasing factor</i> ).
<b>CU</b>	Colitis Ulcerosa ( <i>Ulcerative colitis</i> ).
<b>CUTEI</b>	Colitis Ulcerosa de tipo o etiología incierta ( <i>Ulcerative Coliti uncertain etiology type</i> ).
<b>CREBP</b>	Proteína de Unión a CRE ( <i>CRE binding proteína</i> ).
<b>DAI</b>	Índice de actividad de la enfermedad ( <i>Disease activity index</i> ).
<b>DAMPs</b>	Los daños asociados a los patrones moleculares ( <i>Damage-associated molecular patterns</i> ).
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>DSS</b>	Sulfato de dextrano sódico ( <i>Dextran sulfate sodium</i> ).
<b>EC</b>	Enfermedad de Crohn ( <i>Crohn's Disease</i> ).
<b>EII</b>	Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
<b>EIINC</b>	EII no clasificada.
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme linked Immuno Sorbent Assay</i> ).
<b>ERK</b>	Kinasa de proteínas activada por señales extracelulares ( <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> ).
<b>FA</b>	Fosfatasa alcalina ( <i>Alkaline phosphatase</i> ).
<b>FOS</b>	Frucooligosacáridos ( <i>Frucooligosaccharides</i> ).
<b>Foxp3</b>	<i>Forkhead box P3</i> .
<b>GRO-<math>\alpha</math></b>	Oncogen alfa regulador del crecimiento ( <i>Growth regulated oncogen alfa</i> ).
<b>GSH</b>	Glutación ( <i>Glutation</i> ).
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano ( <i>Human Leukocyte Antigen</i> ).
<b>IBD</b>	<i>Inflammatory Bowel Disease</i> .
<b>IDM</b>	Índice de daño macroscópico ( <i>Macroscopic Damaged Index</i> ).
<b>IECs</b>	Células Intestinales Epiteliales ( <i>Intestinal Epithelial Cells</i> ).
<b>IFN</b>	Interferon.
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina.
<b>IKK</b>	Kinasa de I $\kappa$ B ( <i>I<math>\kappa</math>B Kinase</i> ).
<b>IL</b>	Interleukina.
<b>IL-1ra</b>	Antagonista del receptor de Interleukina 1 ( <i>Interleukin 1 antagonist receptor</i> ).
<b>iNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico inducible ( <i>inducible nitric oxid syntethase</i> ).
<b>IRAK</b>	Kianasa asociada al receptor para IL-1 ( <i>IL-1 Receptor Associated Kinase</i> ).

<b>IRFs</b>	Factor regulador de Interferón ( <i>Interferón regulatory factors</i> ).
<b>JAK</b>	Kinasa Janus ( <i>Janus kinases</i> ).
<b>JNK</b>	Kinasa c-Jun N-terminal ( <i>c-Jun NH2-terminal kinase</i> ).
<b>LFA</b>	Linfocitos funcionales asociados a antígeno ( <i>Lymphocyte funciton associated antigen</i> ).
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido ( <i>Lipopolysaccharide</i> ).
<b>MAPK</b>	Kinasa de proteínas activadas por mitógenos ( <i>Mitogen-activated protein kinases</i> ).
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos-1 ( <i>Monocyte chemotactict protein 1</i> ).
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> ).
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa.
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid differentiations primary response gene (88)</i> .
<b>MUC</b>	Mucina ( <i>Mucin</i> ).
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido.
<b>NEMO</b>	<i>NF-KB Essentials modulator</i> .
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas ( <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> ).
<b>NF-κB</b>	Factor de transcripción nuclear kappa B ( <i>Nuclear Factor κB</i> ).
<b>NIK</b>	kinasa inducida por NF-κB ( <i>kinase induced NF-kB</i> ).
<b>NLRs</b>	Receptores similares a los dominios de oligomerización y unión a nucleótidos ( <i>Nucleotide-binding and oligomerization domains (NODs)-like receptors</i> ).
<b>CARD15</b>	Dominio de Reclutamiento de una Caspasa C-terminal ( <i>C-terminal caspase Recruitment domain</i> ).
<b>PAMPs</b>	Patógenos asociados a moléculas ( <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> ).
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular ( <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> ).
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Reaction Chain</i> ).
<b>PPRs</b>	Receptores de reconocimiento para patógenos ( <i>Pathogen-Recognition Receptors</i> ).
<b>OCTN</b>	Transportadores de Cationes Orgánicos ( <i>Organic cation transporters</i> ).
<b>PPRAγ</b>	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma ( <i>Peroxisome proliferated-activated receptor gamma</i> ).
<b>PPRE</b>	Elementos de Respuesta a PPAR ( <i>PPAR response elements</i> ).
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
<b>SAZ</b>	Sulfasalazina.
<b>SSI</b>	<i>STAT-induced STAT inhibitor</i> .
<b>STAT</b>	Traductor de señal y activador de la transcripción ( <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> ).
<b>TCR</b>	Receptor de células T ( <i>Tcells receptor</i> ).
<b>TFF3</b>	Factor Trébol 3 ( <i>Trefoil Factor 3</i> ).
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimientos transformante ( <i>Transforming growth factor-beta</i> ).
<b>TLR</b>	Receptores tipo ( <i>Toll Toll like receptor</i> ).
<b>TNBS</b>	Ácido trinitrobencenosulfónico ( <i>Trinitrobenzene sulfonic acid</i> ).
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> ).
<b>Treg</b>	Linfocitos T reguladores.



## **II. ANTECEDENTES**

## **1. ASPECTOS GENERALES: ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

El término Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) hace referencia a una inflamación crónica e idiopática del tracto gastrointestinal con carácter recurrente, en la que se alternan periodos de remisión. El mantenimiento del proceso inflamatorio da lugar al daño tisular que se traduce en daño del parénquima, atrofia, fibrosis y pérdida de función. A esto hay que sumar el mayor riesgo para el desarrollo de procesos malignos, fundamentalmente adenocarcinomas. Los signos y síntomas dependen de la extensión, distribución y gravedad del proceso inflamatorio y muchos de ellos se relacionan con la localización anatómica de la enfermedad. La prevalencia de esta patología es alta; según distintas fuentes puede variar entre 27-48 casos por cada 100.000 habitantes [1].

Dentro del término EII se incluyen distintas manifestaciones clínicas, siendo las más importantes, la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la colitis indeterminada, que presenta características clínicas similares a las anteriormente citadas, resultando imposible una distinción convincente entre EC y CU [2]. Recientemente se ha introducido la distinción entre EII no clasificada (EIINC), para aquellos casos con un diagnóstico de EII en los que resulta imposible distinguir entre EC y CU; y CUTEI (colitis de tipo o etiología incierta) refiriéndose a la imposibilidad de diagnóstico debida a la colitis fulminante sin antecedentes, ya que se impone la necesidad de colectomía y la gravedad del proceso impide el diagnóstico diferencial entre CU y EC [3]. Los síntomas comunes entre las distintas manifestaciones de la EII son la diarrea, la malnutrición, la anorexia, la pérdida de peso corporal y el dolor abdominal, junto con consecuencias sistémicas como la anemia (Tabla 1). En el caso del paciente pediátrico, una característica clínica importante, que incluso se emplea con fines diagnósticos, es el retraso en el crecimiento. Los síntomas de la EII y el hecho de que sea una enfermedad crónica que cursa con recidivas condicionan la calidad de vida de los pacientes y de manera muy importante la de los jóvenes [4].

<b>Características anatómicas</b>	<b>Colitis Ulcerosa</b>	<b>Enf. de Crohn</b>
Segmento afectado	Continuo	Discontinuo
Carácter	Mucosa	Transmural
Capa	Úlceras	Granulomas
Afectación	Pancolitis (60%) izquierdo (25%) (15%)	Colon (70%) Ileal (20%) Cólica (10%)
<b>Características clínicas</b>		
Diarrea	++++	++++
Hemorragias rectales	++	++++
Dolor abdominal	++++	++
Fiebre	+++	++
Anemia	++	++++
Malabsorción	+++	-
Afectación rectal	-	+++
Enfermedad Perianal	+++	-

**Tabla 1.** Características anatómicas y clínicas CU y EC.

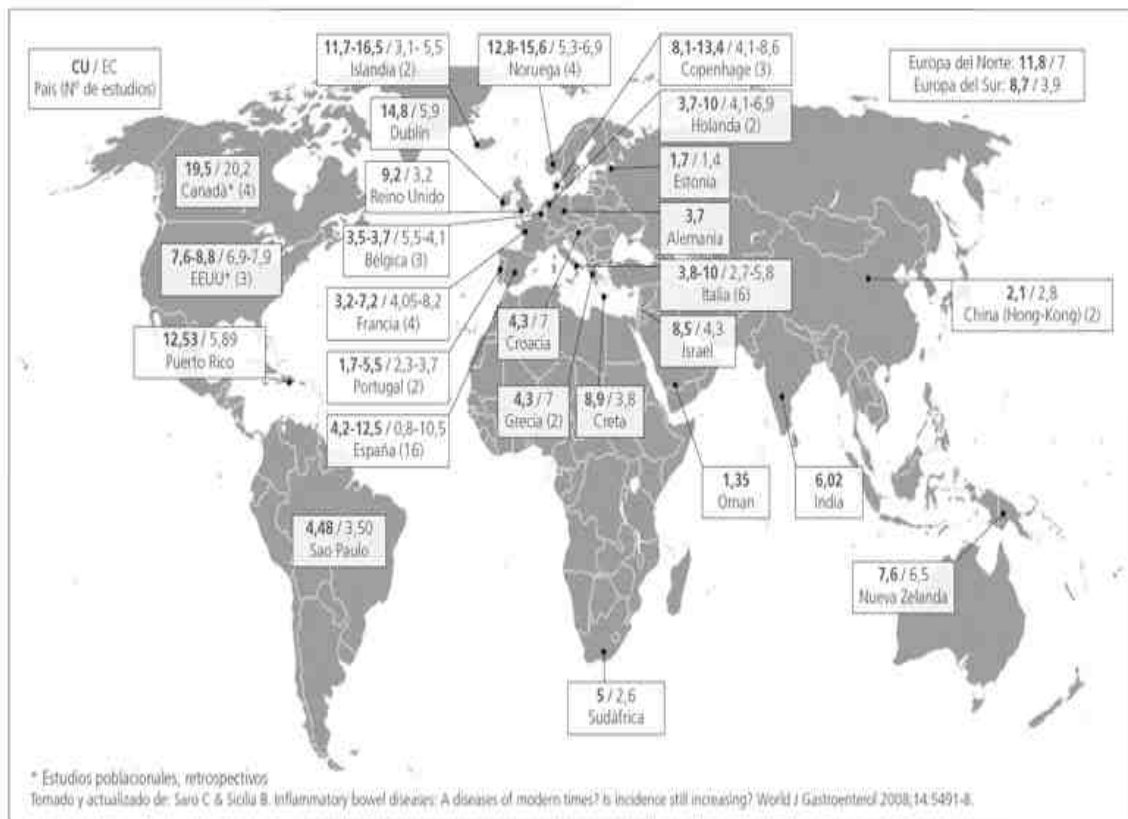
Aunque la EC y CU se engloban dentro de la familia de la EII, cursan de manera diferente en cuanto a la localización anatómica y naturaleza del proceso inflamatorio, teniendo por consiguiente diferentes síntomas, perfil clínico y tratamientos (Tabla 1). La EC cursa con inflamación granulomatosa transmural de la mucosa gastrointestinal [5] y puede afectar a cualquier segmento del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano, aunque en la mayoría de los casos comienza en la parte distal del intestino delgado (íleon). Típicamente, se suelen observar fragmentos discontinuos del intestino afectado separados por zonas de mucosa no inflamada. Las zonas más comúnmente afectadas son el íleon terminal en un 47% de los casos, el colon proximal en un 28%, la parte ileocecal de tracto digestivo en un 21% y la parte superior del mismo en un 3% de los casos [6]. El hecho de que en la EC se produzca inflamación transmural, es decir, que no sólo afecta a la mucosa, sino que se propaga a través de toda la pared intestinal, favorece la aparición de perforaciones, estenosis y fístulas con órganos adyacentes [7]. Así que, aunque en un 70% de los casos la EC cursa sin estenosis y sin la aparición de fístulas o abscesos, en un 17% de los casos se observa estenosis y en un 13% se observan fístulas, abscesos o ambos. El curso normal de la EC es estable desde el punto de vista anatómico, aunque el comportamiento clínico puede variar con el curso de

la misma. El cambio más frecuente es el paso de enfermedad no estenosante a estenosante o penetrante. Por otra parte, tras el primer año de diagnóstico se suele producir una exacerbación de la enfermedad observándose abscesos, fístulas, lesiones focales, segmentarias o difusas, y una potencial inflamación granulomatosa, además de dolor abdominal, diarrea y pérdida de peso [7].

La CU, al igual que la EC, cursa con recidivas, pero a diferencia de ésta la inflamación no es transmural, sino que afecta únicamente a la mucosa y la submucosa colónicas. La CU se manifiesta con diarrea sanguinolenta [8] y afecta, fundamentalmente la región distal del colon, que se extiende progresivamente hacia la región proximal, con presencia de abscesos en las criptas.

Actualmente se desconoce la etiología de la EII, aunque factores genéticos y medioambientales parecen jugar un papel importante. De hecho, la teoría más aceptada sobre la etiopatología de esta enfermedad indica que es el resultado de una respuesta inmune exacerbada frente a la microflora intestinal, que se produce en individuos predispuestos genéticamente. Aminosalicilatos, corticoides e inmunosupresores son los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la EII. Aunque el abanico de posibilidades terapéuticas es cada vez más amplio, ninguno de los principios activos usados actualmente es eficaz ni seguro de forma universal, por lo que la investigación en este campo es muy intensa.

## 2. EPIDEMIOLOGÍA: ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL



**Figura 1:** Estudios Poblacionales y prospectivos: CU y EC.

La EII es una enfermedad frecuente, del denominado "primer mundo" asociada principalmente a ambientes urbanos donde el sedentarismo, la alimentación y el estrés parecen jugar un papel importante en su desarrollo. La actual "occidentalización mundial" está provocando un incremento de la prevalencia de la enfermedad en Asia y América Latina (Figura 1). De hecho, mientras su prevalencia se incrementa en países en desarrollo, se está observando una estabilización en países desarrollados, por lo que las diferencias son cada vez menores [9]. Las diferencias entre "ricos y pobres" establecidas geográficamente entre norte y sur influyen también en la incidencia de la EII (Figura 1); ésta es mayor en las regiones del norte de Europa que en el Sur, existiendo también un gradiente entre el norte y el sur de España [10, 11]. España ha sido considerada como una zona con una incidencia media [9, 12] o elevada [13], dependiendo del estudio considerado y de la zona incluida en él. Navarra y Asturias son las



provincias con los datos de incidencia más elevados. De forma global la incidencia de CU es mayor que la de EC (Figura 1) [14, 15].

Existen relaciones entre incidencia, edad y sexo en zonas de alta incidencia. Así, tanto para la CU como para la EC, el grupo de población principalmente afectado es el de edades entre los 20 y los 40 años [10, 16, 17] también existe un repunte de la enfermedad, sobre todo de la CU, entre la población mayor de 60 años, que puede ser debido a un diagnóstico tardío en esta población. En cuanto a la distribución de la enfermedad en función del sexo, mientras que la EC se observa más frecuentemente en las mujeres, en la CU existe una predominancia en los hombres [18, 19]

Por otra parte, se ha observado que la raza blanca es la más afectada. Varios estudios han constatado también que la frecuencia en las personas que profesan la religión judía es de 2 a 4 veces mayor que en el resto de personas que viven en la misma área pero profesan otra fe [20], lo cual muestra la importancia de la herencia genética, pero también de las costumbres y de los factores ambientales.

### **3. ETIOLOGÍA: ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

La etiología de la EII se considera desconocida. Como se ha indicado anteriormente, la hipótesis más aceptada actualmente indica que es consecuencia de una respuesta inmune exacerbada frente a microorganismos presentes en el intestino en individuos predispuestos genéticamente. Dicha respuesta puede verse modificada por un conjunto de factores genéticos, inmunológicos y ambientales. De igual modo, se ha propuesto que agentes infecciosos podría estar relacionados con la etiología de EII (ver apartado 1.3.2 de esta memoria).

#### **3.1. Factores genéticos**

El hecho de que la prevalencia de la EII sea mucho más alta entre los miembros de una misma familia, unido a la mayor incidencia de la enfermedad entre gemelos monocigotos que entre heterocigotos, indica que

puede tener una base genética [21]. De igual modo, la predisposición genética queda demostrada con la variabilidad de incidencia entre distintos grupos étnicos, como es el caso de la elevada incidencia y prevalencia en la población judía, incluso cuando se compara ésta con otros grupos étnicos dentro de la misma localización geográfica. Los desordenes genéticos son complejos y múltiples en la EII, por lo que la terapia génica en esta enfermedad es poco viable, sin embargo, su conocimiento nos permite entender mejor los mecanismos etiopatogénicos, así como la respuesta a diferentes agentes terapéuticos. A continuación, sin pretender ser exhaustivos, comentaremos algunos de los polifmorismos y mutaciones génicas que han sido relacionados con la EII con el fin de ilustrar mejor la base genética de esta enfermedad.

Mutaciones en el gen *NOD2/CARD15* (dominio de reclutamiento de una caspasa C-terminal), situado en el cromosoma 16, han sido fuertemente relacionadas con la EC (Tabla 2). De hecho, el riesgo de padecer EC de un individuo heterocigoto para una mutación en *NOD2* se incrementa entre 2 y 4 veces, mientras que si el individuo es homocigoto, el riesgo se multiplica por 20-40 comparado con el de un individuo normal [1].

Principales regiones y genes en la EII				
Región	Cromosoma	Locus	Gen	Función
IBD1	6	16q21	NOD2/CARD15	Regulación apoptosis monocitos Reconocimiento bacterias (MDP) Activación NFκB
		16p12.1-p11.2	IL-4R	Respuesta Th2
		16p11.2	ITGAM	Integrina alfa-M
IBD2	12	12q13.11	VDR	Receptor de la vitamina D
		12q13	STAT-6	Respuesta Th2
		12q14	IFN-γ	Activador de macrófagos
		12q13.13	Integrina-β <sub>7</sub>	Circulación de linfocitos hacia el sistema digestivo
IBD3	6	6p21.3	MHC-II	Reconocimiento de epítomos
IBD4	14	14q11.2	IL-25	Activación producción de IL-8
IBD5	5	5q31.1	OCTN	Transporte de cationes orgánicos
		5q31.1	CD14	Antígeno superficie de monocitos-macrófagos Inmunidad innata frente al LPS
IBD6	19	19p13.3	TXA2R	Receptor Tromboxano A2
		19p13.3-p13.2	ICAM-1	Unión a integrinas
IBD7	1	1q41	TGFB2	Inhibición del crecimiento de linfocitos T
IBD8	16	16	Desconocida	
IBD9	3	3p21.31	CCR-5	Receptor de quimiokina expresado en linfocitos T y macrófagos
		3p21.3	CCR-9	Receptor de quimiokina
		3q25.33-q26	IL12A	Diferenciación de Th1 y Th2
OTROS		9q32-q33	TLR4	Respuesta inmune innata Reconocimiento de patógenos
		4p14	TLR1	
		4q32	TLR2	
		4p14	TLR6	
		3p21.3	TLR9	
		7p15-p14	NOD1/CARD4	Reconocimiento de bacterias
		2q33-q37	CCL20	Quimioquina con acción sobre linfocitos T y B y células dendríticas.
		19q13.3-q13.4	IL-11	Producción de inmunoglobulinas por linfocitos B Proliferación de células madre hematopoyéticas y células progenitoras megacariocíticas
		11q22.2-q22.3	IL18 (IL-18)	Inducción de la producción de IFN-γ
		2q37.1	ATG16L1	Autofagia
		5q33.1	IRGM	Autofagia ; control de micobacterias intracelulares
18p11.3-p11.2	PTPN2	Señalización celular		

**Tabla 2:** Conjuntos de genes implicados en la manifestación de EII [22, 23]

El gen NOD2 codifica la proteína del mismo nombre que reconoce antígenos bacterianos (muramildipéptido derivado de peptidoglucano) tanto de bacterias Gram positivas como de Gram negativas y activa el factor nuclear NF-κB, que interviene en la transcripción de citocinas proinflamatorias (Tabla 2). La alteración por mutación del gen NOD2 produce una disminución en la actividad del NF-κB y una regulación a la

baja de los procesos inflamatorios, lo que conlleva un fallo en la respuesta desencadenada por las bacterias que se encuentran en el lumen. No obstante, se ha descrito que la mutación de NOD2 podría incrementar la activación de NF- $\kappa$ B a través de TLR2, incrementando por tanto la inflamación [24].

NOD2 se expresa en monocitos y en células de Paneth. Estas últimas producen una gran variedad de péptidos antimicrobianos incluyendo  $\alpha$ -defensinas, lisozima, fofolipasa A2 y la lectina Reg III $\gamma$ , que constituyen un mecanismo de defensa autónomo frente a bacterias perjudiciales. Pacientes que poseen mutaciones en el gen NOD2 muestran menores niveles de defensinas, desequilibrios en la flora bacteriana e incapacidad para eliminar patógenos bacterianos que invaden más fácilmente la mucosa intestinal [25]. De igual modo, ratones deficientes en NOD2 son incapaces de matar bacterias de manera eficientes y muestran desequilibrios en la flora bacteriana y un incremento de flora bacteriana en el contenido fecal [25]. Por tanto, en la EC es probable que mutaciones en NOD2 incrementen la susceptibilidad a la enfermedad alterando las interacciones entre la microbiota del íleon y la inmunidad de la mucosa [26]. Todavía no se ha dilucidado totalmente el mecanismo exacto por el que NOD2 contribuye al control de la flora bacteriana en el intestino.

Mutaciones en el locus *IBD5* (cromosoma 5q31) han sido también relacionadas con la EC, con un comienzo temprano de la misma o con una elevada incidencia de enfermedad perianal (Tabla 2) [27, 28]. Algunos estudios han relacionado mutaciones en este locus con la CU [29]. Esta asociación es mucho más débil que la de mutaciones en el gen NOD2/CARD15. En este locus se codifican los transportadores de cationes orgánicos OCTN1 y OCTN2 que están presentes en las células epiteliales, macrófagos y linfocitos T pero no en linfocitos B. Los defectos genéticos pueden causar una disminución en el transporte de carnitina en las células epiteliales y con ello la interrupción de la  $\beta$ -oxidación. Alternativamente, pueden aumentar el transporte de antígenos bacterianos y regular, al alza, la respuesta inmune.

La proteína codificada por el gen MDR1 actúa como una bomba dependiente de ATP para la eliminación de toxinas y xenobióticos intracelulares [30], y el polimorfismo de dicho gen se relaciona con la EII [31, 32]. En la CU las variaciones alélicas del gen *MDR1* determinan la extensión de la enfermedad, la susceptibilidad para padecerla, así como la respuesta al tratamiento.

La región del complejo principal de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex, MHC), ubicada en el brazo corto del cromosoma 6, comprende los genes de antígenos leucocitarios humanos (Table 2) (Human Leukocyte Antigen, HLA) , algunos de los cuales podrían estar relacionados con la CU como HLA-DR2, HLA-DRB1\*1502, HLA-DR9 y HLA-DRB1\*0103 [33, 34] y con una localización exclusivamente colónica de la EC [35]. El gen que codifica la citokina TNF- $\alpha$  se encuentra asimismo dentro de esta región, y la mutación -308 G/A SNP se ha relacionado con un riesgo elevado de CU [36, 37], aunque otras mutaciones en el mismo (857 C/T SNP por ejemplo) parecen disminuir el riesgo de padecer EII [38].

Otro Cromosoma implicado es el cromosoma14, en concreto la región 14q11-q12, dando a la región también conocida por IBD4 (Tabla 2) que corresponde a la región inducible de las células T la cual nos codifica el receptor de las células T, IL-25, la hidroxilasa de LTB<sub>4</sub> y las kinasas de las tirosinas TYK2 y JAK3: todas ellas implicadas en el desarrollo

### ***3.2. Microbiota intestinal y agentes infecciosos***

El intestino es un lugar confortable para las bacterias, que encuentran un microambiente estable rico en nutrientes. Las bacterias a cambio proporcional al hospedador nutrientes esenciales (como vitamina K o biotina), colaboran en la digestión de los alimentos, previenen la expansión de microorganismos patógenos e incluso cooperan en el desarrollo y la modulación de la respuesta inmune del hospedador [39]. En consecuencia, el sistema inmune ha evolucionado para vivir en colaboración con la microbiota a la vez que combate bacterias patógenas invasivas. Este

fenómeno se denomina tolerancia. La pérdida de tolerancia frente a la flora bacteriana comensal entérica ha sido propuesta como hipótesis etiopatogénica de la EII. Diversos hechos apoyan esta hipótesis, incluyendo los siguientes: el íleon terminal y el colon son las zonas en las que se encuentra la mayor concentración de bacterias y las más afectadas por la inflamación [40], los pacientes de EII presentan un mayor número de bacterias intestinales comparándolos con la población que no sufre la enfermedad [41], es más, la flora bacteriana en pacientes con EII se encuentra alterada; se ha observado la presencia de un número mayor de bacteroides, *Escherichia coli* y enterococos y de menos lactobacilos y bifidobacterias. Por otra parte, y como se ha indicado anteriormente, se ha descrito en pacientes con EII, sobre todos en aquellos con mutaciones en NOD2 (Tabla 2), una disminución de la producción de péptidos antimicrobianos (defensinas) que conlleva alteraciones en la defensa frente a bacterias [42, 43]. Si las alteraciones de la flora bacteriana son causa o consecuencia de la EII es actualmente tema de debate en la comunidad científica. No obstante lo más posible es que la flora bacteriana sea un factor en el desarrollo de la enfermedad, produciendo una estimulación exacerbada del sistema inmune en individuos predispuestos genéticamente.

Hasta la fecha no se ha demostrado una relación directa entre ningún agente infeccioso y la EII. No obstante, se han llevado a cabo algunos estudios en este sentido que indican que *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) puede estar relacionado con el desarrollo de EC, por su relación con el desarrollo de enterocolitis [44, 45]. No obstante existen estudios que no avalan esta hipótesis [46, 47]. Por otra parte, hay que destacar que es evidente la relación directa entre las gastroenteritis infecciosas creadas por *Campylobacter* y *Salmonella* y la EII [48]. Otros agentes infecciosos que se han estudiado como posibles agentes causales de la EII son bacterias *E. coli* [49], *Bacteroides vulgatus*, *Mycobacterium kansaii*, *Listeria monocytogenes* y *Stenotrophomonas maltophilia* [50, 51]

Por último, diferentes virus se ha intentado implicar en la etiopatogénesis de la EII como el virus del sarampión a edades tempranas, aunque existen detractores de esta teoría [52]. La manipulación de la flora

entérica se ha propuesto como una de las estrategias terapéuticas plausibles en el manejo de la inflamación intestinal crónica. Con este fin, se han utilizado antibióticos, prebióticos y probióticos.

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta que estimulan el crecimiento o la actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon. Por otra parte, los probióticos son microorganismos vivos que al ser agregados como suplemento en la dieta, favorecen el desarrollo de la flora microbiana en el intestino. En el capítulo I de esta memoria, se prestará especial atención al potencial de prebióticos y probióticos en el tratamiento de la EII.

En cuanto a la utilización de antibióticos, aunque los estudios realizados no indican efectos claros de su utilización en la CU, en la práctica médica es frecuente su utilización como adyuvantes en el tratamiento de esta enfermedad [53]. En la EC el tratamiento con antibióticos es una opción viable [54]. De hecho, y aunque hay heterogeneidad en los resultados de distintos estudios, la administración de metronidazol, ornidazol, ciprofloxacina, claritromicina o rifaximina han mostrado ser útiles en la disminución del índice de actividad y/o en la inducción de remisión [53].

### ***3.3. Anticonceptivos orales***

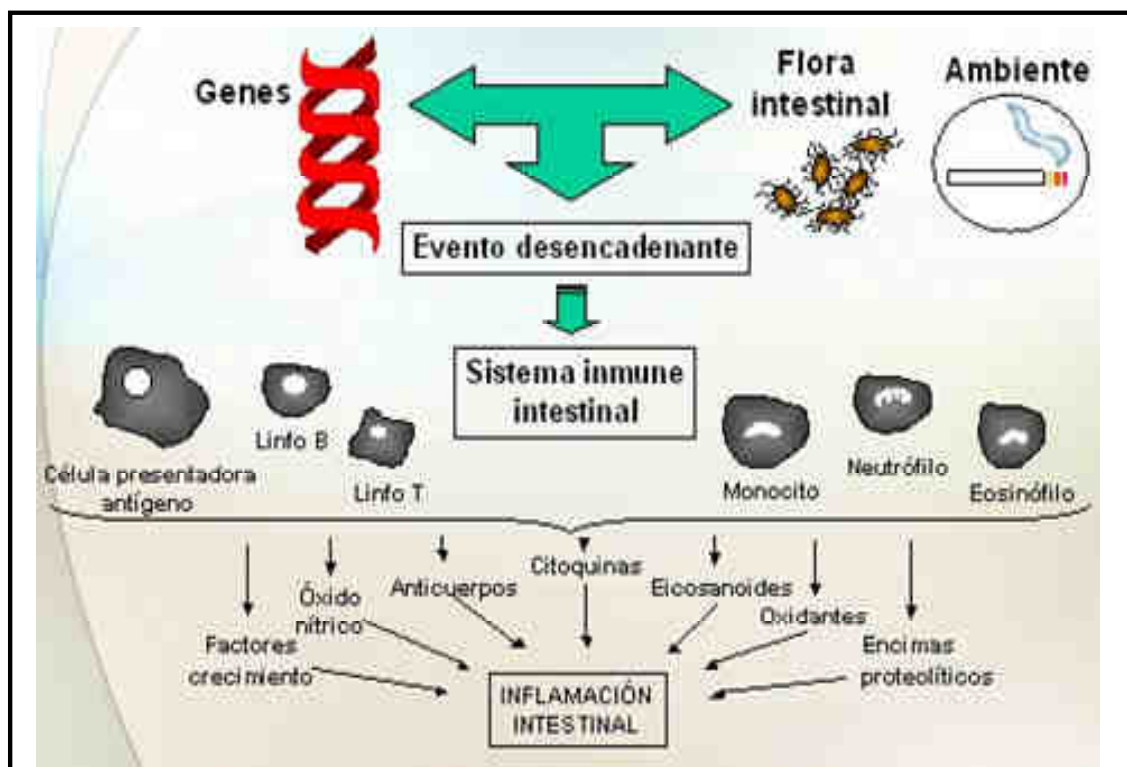
El uso prolongado de anticonceptivos orales podría incrementar el riesgo de sufrir EII y agravar la enfermedad ya creada, aunque no generarla [55, 56]. Un estudio reciente indica que el uso de anticonceptivos orales está asociado con el riesgo de EC y que la asociación con CU se limita a mujeres con historia de fumadoras [57]. Por otra parte, algunos estudios indican que el uso de anticonceptivos orales no incrementa el riesgo de recaídas en mujeres con EII [58, 59]. Se ha propuesto que la relación entre la EII y los anticonceptivos viene dada por la posibilidad de que los anticonceptivos favorezcan la formación de infartos locales a nivel de la microvasculatura intestinal [60].

### 3.4. Apendicetomía

La extirpación del apéndice, especialmente en edades tempranas, conlleva un efecto inmunomodulador que determina la protección frente al desarrollo de CU [61-66]. La apendicetomía realizada antes del desarrollo de CU, supone una reducción en la incidencia de la enfermedad, una mayor edad de debut, una enfermedad menos activa y un mejor pronóstico de la enfermedad en caso de desarrollarse [67-69]. De hecho, el número de individuos sometidos a este tipo de intervención dentro del grupo de pacientes de CU es reducido[11].

### 3.5. Tabaco

La relación entre tabaco y EII es cuando menos peculiar (Figura 2). Se ha descrito que incrementa el riesgo de sufrir EII [70], potencia el desarrollo de EC y empeora la enfermedad [70-73]. No obstante protege frente a la CU [74, 75]. De hecho, se ha utilizado la nicotina como terapia farmacológica demostrándose efectos beneficiosos en la CU [76, 77].



**Figura 2:** Relación entre tabaco y EII [78, 79]



Se desconoce el mecanismo de acción del tabaco y la nicotina en la CU pero podría deberse a un efecto a nivel de la motilidad intestinal y a su efecto antiinflamatorio, ya que el humo del tabaco podría disminuir la secreción de citocinas como IL-8 e IL-1 $\beta$  (Figura 2) [80], junto con la hipoperfusión a nivel rectal [81]. La explicación mecanística en el caso de la EC puede ser la potenciación de la isquemia multifocal gastrointestinal por parte del tabaco y en concreto por el CO contenido en él que impide la vasodilatación de los microvasos implicados en la zona inflamada, lo que da lugar a la aparición de ulceraciones y fibrosis [60, 81].

### **3.6. Estrés**

Hasta 1990 la EII se consideró un trastorno con un elevado componente psicosomático. Entonces, los avances en el estudio de la etiología de la enfermedad hicieron descartar el estrés como causa de la enfermedad, aunque estudios en animales y humanos han demostrado que sí es un factor importante en la evolución de la enfermedad y en la aparición de recaídas [82, 83]. Así, el estrés provoca un aumento de la permeabilidad intestinal, de la motilidad, de la secreción de iones y agua y una alteración en la interacción entre las bacterias y la mucosa, mecanismos que forman parte de las alteraciones de la EII y que pueden contribuir al empeoramiento de la misma [84, 85]. Además se ha demostrado que el efecto del estrés sobre la EII es dependiente de la innervación colinérgica y de los mastocitos [86, 87].

El factor liberador de corticotropina (CF) juega un papel crucial en dicho efecto, como se ha demostrado en diversos experimentos realizados en animales [88, 89]. El incremento en la liberación de CF y de otros neurotransmisores produce la liberación de mediadores por mastocitos, que alteran la permeabilidad y la interacción de bacterias con la barrera epitelial, desencadenando la activación de células inmunes. Algunos estudios han tratado de demostrar el efecto terapéutico de la reducción del estrés en la EII, aunque los resultados son contradictorios [90, 91].

### **3.7. Factores inmunológicos**

El incremento de recursos sanitarios ha resultado ser un factor que incrementa la incidencia de EII, lo que sugiere la implicación de estados no higiénicos en el correcto desarrollo y regulación del sistema inmune [92]. La teoría de la higiene indica que el exceso de ésta da lugar a un déficit en los linfocitos reguladores y a un desequilibrio en la secreción de citocinas antiinflamatorias que pueden contribuir a la aparición de enfermedades inflamatorias [93].

## **4. FISIOPATOLOGÍA: ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

Iniciaremos este apartado introduciendo algunas nociones básicas sobre la inmunidad intestinal y posteriormente la relacionaremos con la fisiopatología de la EII. La mucosa intestinal es una barrera física que separa el lumen, que está en contacto con el mundo exterior, del medio interno. El núcleo de esta barrera es el epitelio intestinal, una monocapa constituida por dos tipos de células principalmente: los enterocitos y las células caliciformes. Los primeros son mayoría y están especializados en funciones de transporte, mientras que las segundas son células secretoras de moco. Las células del epitelio intestinal se encuentran unidas por las denominadas "*tight junctions*". Las bacterias, los virus y los hongos se encuentran confinados en el lumen gracias a esta barrera. La secreción de moco por las células caliciformes, crea un microambiente próximo a la superficie intestinal que limita el contacto de las bacterias con las células intestinales.

Como en el resto del organismo, en la mucosa intestinal se producen respuestas inmunes innatas y adaptativas, pero con ciertas características específicas. Una de ellas es que la respuesta inmune está mediada tanto por células del epitelio intestinal, como por células de la *lámina propia* (la capa de células localizada inmediatamente debajo del epitelio). Además de los mencionados enterocitos y células caliciformes, en el epitelio intestinal se encuentran las células de Paneth y las células productoras de hormonas enteroendocrinas. Los enterocitos y las células de Paneth son las principales

responsables de la inmunidad. Las células de Paneth, localizadas en la base de las criptas, producen péptidos antimicrobianos, limitando así la presencia de bacterias en la base de las criptas. Los enterocitos son esenciales en la inmunidad y aunque su papel está lejos de ser totalmente descrito, sí que se conoce que contribuyen a la respuesta inmune reaccionando directamente con los productos bacterianos. Además, en el epitelio del intestino delgado se encuentran las llamadas placas de Peyer que contienen células M especializadas en muestrear el contenido luminal. Los patógenos intestinales, y quizás también las bacterias probióticas, utilizan las células M como punto de entrada en la mucosa. No obstante, es probable que pequeñas cantidades de bacterias atraviesen la barrera intestinal, por este y otros puntos para facilitar hasta cierto punto el contacto entre microbiota y hospedador (Figura 3).

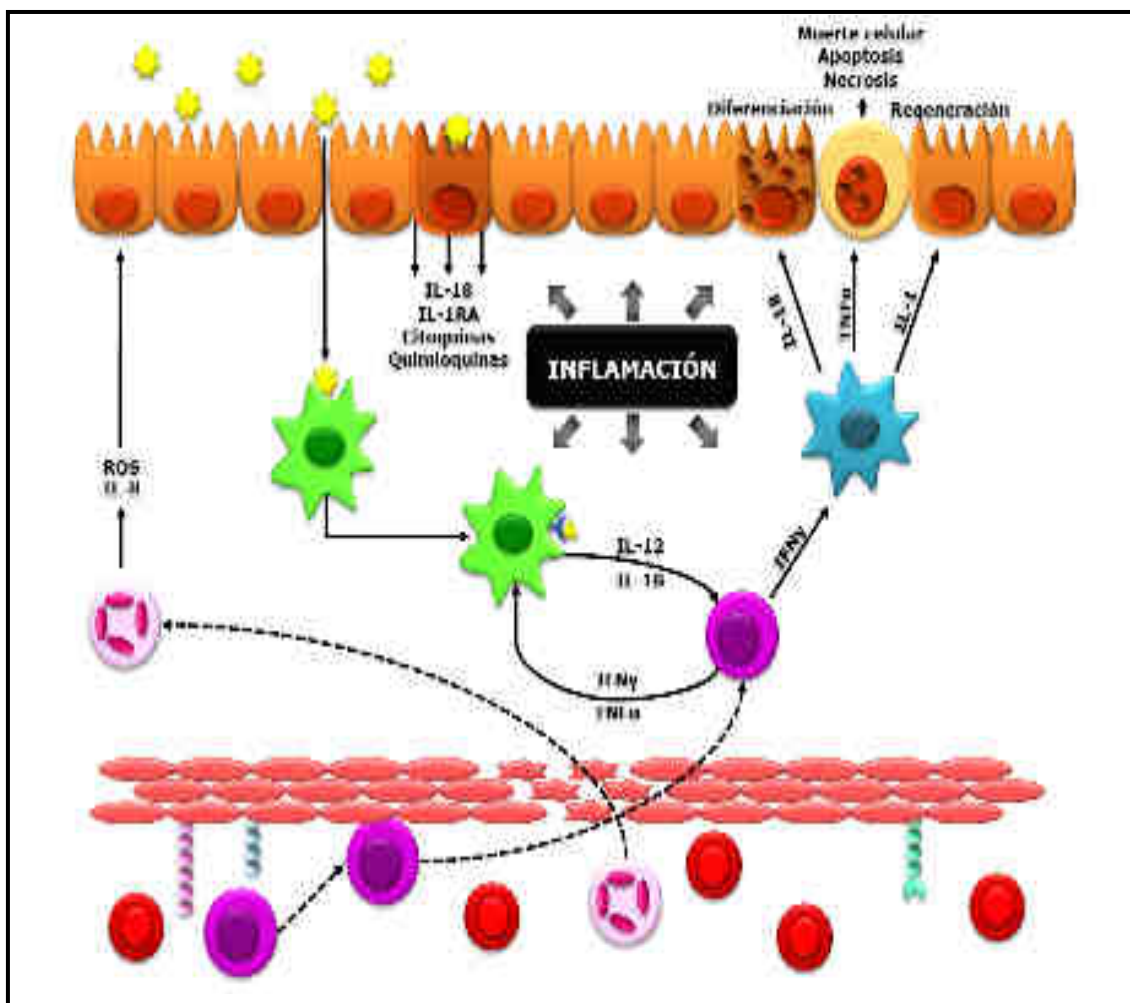


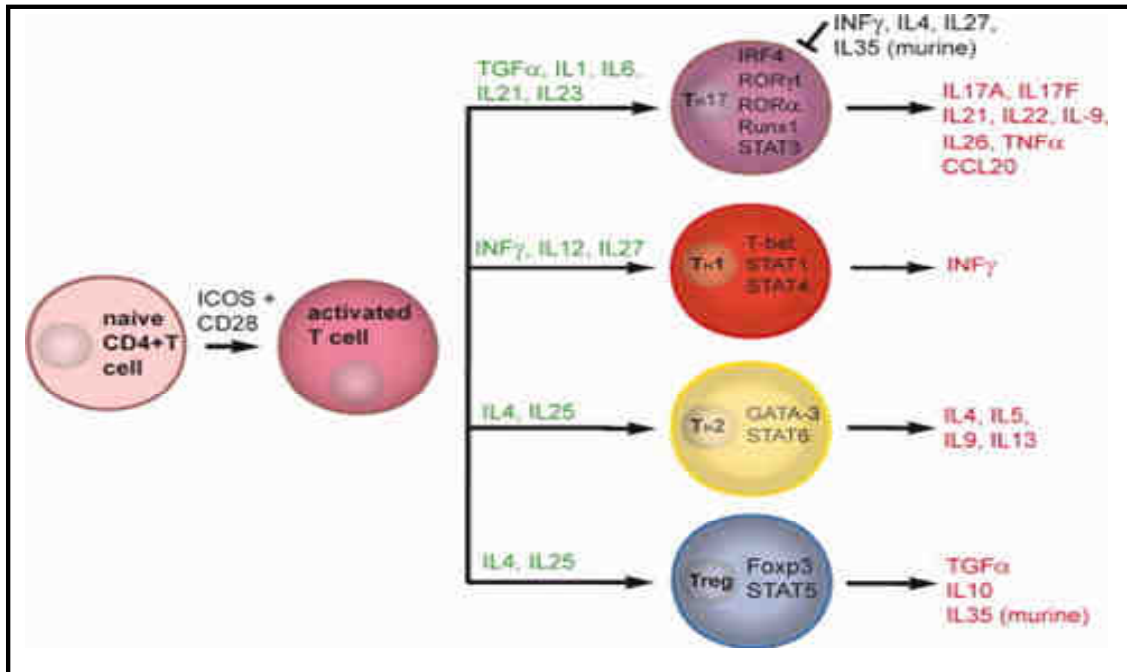
Figura 3: Fisiopatología de EII.

En la *lámina propia*, debajo del epitelio intestinal, macrófagos y células dendríticas contribuyen decisivamente a la respuesta inmune. Las extensiones citoplasmáticas de las células dendríticas se intercalan entre las células epiteliales con el fin de muestrear antígenos y presentarlos a células T de la *lámina propia* y de los folículos linfoides. Las células dendríticas también migran a los nódulos linfáticos para interactuar con las células T (Figura 3). En el epitelio intestinal se encuentran además células T (linfocitos intraepiteliares) que junto con las placas de Peyer/folículos linfoides, y las células T y B (principalmente productoras de IgA) de la *lámina propia* forman un sistema inmune adaptativo.

El mecanismo general de activación del sistema inmune por antígenos lumbinales es el siguiente: Los antígenos lumbinales van a ser captados por las células presentadoras de antígenos (APC), es decir, macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, donde van a ser procesados y presentados a través de las moléculas de MHC-II a los linfocitos T vírgenes para que éstos sean activados. La acción de estos antígenos sobre las APC provoca la liberación de diversas citocinas por parte de estas células. Entre estas citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-18, IL-23 y IL-27), algunas van a promover la polarización de los linfocitos T vírgenes o de tipo Th0 hacia el subtipo Th1 (IL-12, IL-18, IL-23 y TNF- $\alpha$ ), de modo que cuando estos linfocitos sean activados van a presentar un fenotipo Th1 y producirán elevadas cantidades de citocinas proinflamatorias de tipo Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , LT) que participan en la perpetuación de la reacción inflamatoria; o bien hacia el subtipo Th17 que produce IL-17, IL-22 o IL-21 entre otras, y cuya diferenciación depende de la existencia de IL-6 y cantidades reducidas de TGF- $\beta$  (Figura 4) [94, 95]

La inducción de la respuesta Th2 está orquestada por la IL-4, que a su vez, como ocurre en el caso de la respuesta Th1 (Figura 4), es la principal citokina implicada en la respuesta Th2, junto con la IL-5 o la IL-13 [22]. La diferenciación de los linfocitos Th0 hacia células Treg, en la que participa de nuevo el TGF- $\beta$  hace que, una vez activadas, estas células liberen citocinas con carácter antiinflamatorio (IL-10, TGF- $\beta$ ), que tratan de

frenar o contrarrestar la reacción inflamatoria [22], pero que en el contexto de la EII no van a ser suficientes y se van a ver superadas o contrarrestadas por el carácter proinflamatorio de la respuesta.



**Figura 4:** Polarización de células T [22].

Con la misma función protectora o antiinflamatoria podemos encontrar los linfocitos T pertenecientes al subtipo Th3, que producen elevadas cantidades de TGF $\beta$  [22].

A nivel celular en una respuesta inflamatoria, las APC van a presentar por sí mismas un carácter proinflamatorio ya que pueden producir citocinas proinflamatorias con capacidad de activar diferentes tipos celulares, como linfocitos presentes en la *lámina propia* (como ya se ha explicado), células epiteliales intestinales y macrófagos residentes en la mucosa intestinal, propagando y perpetuando así la reacción inflamatoria. La activación de macrófagos y células epiteliales conlleva la producción por su parte de quimiocinas que van a crear un gradiente quimiotáctico que favorece la extravasación y la llegada de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio [22]. También son producidas citocinas

antiinflamatorias como consecuencia de la activación de macrófagos y células epiteliales, como la IL-1ra o la IL-11, que son igualmente incapaces de frenar la masiva inflamación en los pacientes de EII [22].

En la EII se produce activación de la respuesta inmune adaptativa (Figura 3), lo que conlleva la pérdida de tolerancia frente a bacterias comensales entéricas y a una alteración en la respuesta inmunológica. Por tanto se produce un desequilibrio entre los mecanismos activadores que aseguran la protección frente a microorganismos patógenos y los mecanismos inhibidores que evitan la exacerbación de los procesos inflamatorios y permiten la tolerancia oral a los alimentos y a los microorganismos de la flora entérica.

Clásicamente, se consideraba que la EC era producto de la activación de células Th1, mientras que en la CU se producía una respuesta Th2 (Figura 4). Actualmente este concepto ha cambiado tras el descubrimiento de las células Th17 y la observación de que en el intestino inflamado de pacientes con EC tanto la IL-17 como la IL-22 se encuentran elevadas. Por lo que la activación de este tipo de células se ha relacionado con la EC. Por otra parte, la ausencia de IL-4 en la mucosa colónica de pacientes de CU y el incremento de IL-13 e IFN $\gamma$  en estos pacientes han modificado también la teoría clásica. Datos recientes indican que la IL-13 se origina a partir de células T citotóxicas (natural killer; NK) y que actúa sobre células epiteliales haciéndolas disfuncionales. Consecuentemente se ha propuesto que la CU puede ser un desorden derivado del daño superficial del epitelio.

En la mucosa se produce una alteración de la microcirculación, debido a la acción de los mediadores inflamatorios que provocan vasodilatación e hiperemia, lo que favorece la dilatación arteriolar y la consiguiente salida del líquido hacia el intersticio, provocando un edema [96]. Los mismos mediadores inflamatorios van a dañar la función de barrera del endotelio. La contracción de las células endoteliales y el aumento de la permeabilidad vascular empeoran dicha situación, ya que permiten la extravasación de proteínas [97]. A continuación se produce la adhesión de leucocitos a la pared endotelial y la subsecuente migración de dichas células hacia la

mucosa intestinal, en la que participan las moléculas de adhesión expresadas en la superficie de neutrófilos y células endoteliales, como las selectinas o las moléculas de adhesión endotelial [98].

Los leucocitos en el intersticio interactúan con diversas sustancias dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno [99, 100] que van a provocar el daño del epitelio y del intersticio de la mucosa. El paso final en este proceso de migración celular es la formación de abscesos en las criptas. La preservación de la integridad funcional de la mucosa intestinal depende de la capacidad de la misma para defenderse de agentes luminales nocivos y de la reparación cuando existe una lesión. Existe pues un equilibrio entre los mecanismos destructivos y reparativos. El primer paso en el restablecimiento de la continuidad de la superficie epitelial dañada es la restitución, en la que las células epiteliales migran hacia el margen de la herida o lesión [101, 102].

A continuación, la proliferación celular permitirá la sustitución de las poblaciones celulares que se han perdido como consecuencia de la lesión en cuestión. Las poblaciones celulares que se encuentran a nivel subepitelial pueden modular la reparación del daño epitelial de forma indirecta mediante la producción de factores solubles y moléculas de la matriz extracelular, pero además pueden tener un efecto directo debido a la existencia de poros en la membrana basal que permiten la migración de células, por ejemplo desde la *lamina propria*.

El proceso inflamatorio va a inducir una serie de modificaciones de la biología y función de las células epiteliales intestinales. Los síntomas clínicos asociados a la EII debidos a la alteración del epitelio son la diarrea, la pérdida de peso, la malnutrición y los cambios en la homeostasis de fluidos y electrolitos. Por otro lado, la alteración de la función de la barrera epitelial permite o facilita la estimulación del sistema inmune local por parte de los antígenos luminales [103, 104] y por tanto favorece el mecanismo causante en primer término de la inflamación. Existe una relación recíproca entre el epitelio intestinal y el proceso inflamatorio a nivel de la mucosa, pudiendo verse afectados uno y otro en ambos sentidos. Así, durante la inflamación

es posible que moléculas implicadas en el daño de la mucosa asociado a la inflamación (citokinas, factores de crecimiento...) alteren la función de células epiteliales, así como la interacción entre células inmunes y células epiteliales intestinales puede alterar la función epitelial, lo que contribuye a la patogénesis de la enfermedad. Por otro lado, las células epiteliales intestinales pueden contribuir a la respuesta inmune que se desarrolla en la inflamación, ya que los enterocitos actúan como células presentadoras de antígenos [105].

La motilidad intestinal también sufre alteraciones en la colitis, de forma general puede decirse que la motilidad se encuentra disminuida en dicha patología [106]. La inflamación y los mediadores producidos provocan modificaciones en las terminaciones nerviosas del sistema nervioso entérico [107, 108], del mismo modo que el sistema nervioso entérico puede modular la respuesta inflamatoria [109], al igual que lo hacen el sistema nervioso autónomo o el central [107].

Además de la inflamación intestinal, la EII lleva consigo una gran variedad de síntomas que afectan a distintos órganos más o menos distantes del tracto gastrointestinal. La mayor parte de estos síntomas se deben al efecto de las citokinas proinflamatorias producidas en exceso durante la inflamación intestinal. Entre ellos se encuentran la "respuesta de fase aguda", la caquexia o pérdida de peso [110, 111], alteraciones de los hábitos alimenticios como la anorexia [112] o la fiebre [113]. Las consecuencias hematológicas son múltiples: anemia [114, 115]; alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis y aumento de la agregación plaquetaria; o leucocitosis [116]. Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas asociados a la EII, y puede ser que el mayor riesgo observado en algunos estudios se deba al uso de terapia inmunosupresora y no a la propia enfermedad [117, 118].

La EII se asocia con un incremento en el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento del proceso inflamatorio crónico. Dicho riesgo es tanto mayor como la duración, la extensión y la



severidad de la EII [119, 120]. La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo investigada en profundidad en la actualidad. El factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B se presenta como uno de los puntos clave en dicho fenómeno [121], ya que controla la transcripción de genes que codifican para moléculas implicadas en el proceso inflamatorio y que han demostrado una relación con el desarrollo de cáncer, como la enzima inducible ciclooxigenasa2 [122, 123]o la citokina proinflamatoria TNF- $\alpha$  [124, 125]. Así mismo, las rutas que se encuentran por encima de la activación de NF $\kappa$ B pueden jugar un papel importante en el desarrollo del proceso maligno, como por ejemplo la interacción entre los TLR y sus respectivos ligandos que, en ciertos casos dan lugar a la activación de dicho factor de transcripción.

## **5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

La flora intestinal es muy importante, sino necesaria, para el desarrollo de EII. De hecho en animales gnotobioticos (sin flora bacteriana) no es posible inducir inflamación intestinal mediante la administración de ácidos trinitrobencenosulfónico o de sulfato sódico de dextrano. Incluso en ratas y ratones con deficiencia génica en determinadas citocinas (IL-2 y/o IL-10), que desarrollan colitis espontáneamente, y en modelos de transfección de células inmunes, se requiere la presencia de la microbiota para que se desarrolle la colitis. Más concretamente, la colitis no se desarrolla en estos animales si se mantienen en ambientes libre de gérmenes, siendo necesaria la colonización por flora comensal [126]. Otros datos que apoyan ésta teoría es que los antibióticos de amplio especto y los probióticos han demostrado tener efecto en determinados grupos de pacientes de EII, que se ha observado un incremento en el número de bacterias adheridas a la superficie epitelial o intracelulares en el colon de los enfermos de EII y que se han demostrado alteraciones en la microbiota intestinal de pacientes con EII que dan lugar a la presencia de un menor número de bacterias beneficiosas en el intestino de estos individuos [41].

Además, esta descrito que diferentes bacterias y algunos productos naturales y complementarios pueden estimular la respuesta inmune innata porque comienza con la activación de la familia conservada de los receptores tipo Toll (TLR); proteínas transmembrana expresada en la superficie celular (TLR2, TLR4, TLR5) o en el endosoma (TLR7-9) (Tabla 3) [127, 128].

<b>Receptores tipo Toll</b>	<b>Receptor</b>
<b>TLR1</b>	Triacil-lipopéptido bacteriano
<b>TLR2</b>	Lipoproteínas/Lipopéptido. Peptidoglicano y Ácido Lipoteicoico
<b>TLR</b>	ARN viral de doble cadena (dsRNA)
<b>TLR4</b>	LPS Gram negativas
<b>TLR5</b>	Flagelina
<b>TLR6</b>	Diacil-lipopéptido bacteriano
<b>TLR7 y 8</b>	Análogo de cadena simple bacteriano (ssRNA)
<b>TLR9</b>	Motivos CpG de ADN no metilado

**Tabla 3:** *Diferentes tipos de receptores tipo Toll (Toll-like receptor TLRs)*

*In vitro*, la estimulación de los macrófagos con la presencia de lipopolisacárido agonista de TLR4 (LPS) producidos por bacterias Gram-negativas genera un cambio significativo en la expresión génica [129]. Esta respuesta es crítica para afrentar la patogenicidad bacteriana, que incluye la producción de quimiokinas produciendo la migración de los leucocitos hacia el sitio de la infección y las citokinas que inician y controlan la respuesta inmune adaptativa.

### **5.1. Receptores relacionados con la EII**

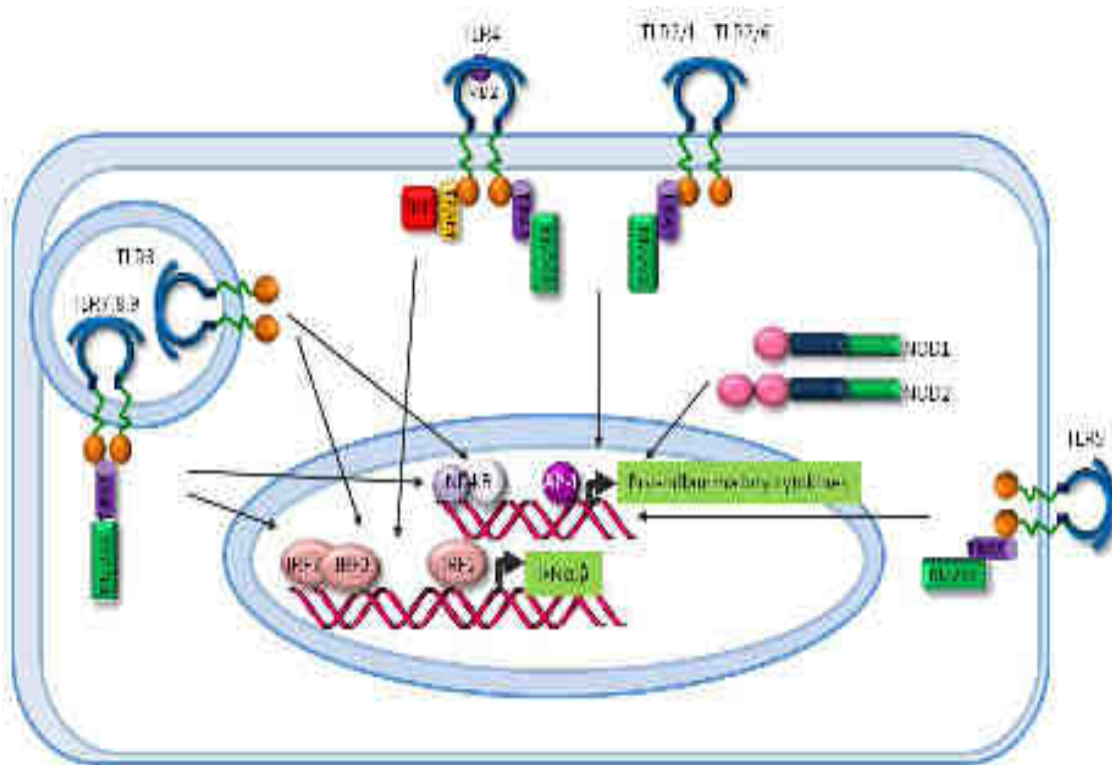
Como se intuye de lo expuesto en el apartado 4 de esta memoria, la inmunidad innata, es en gran parte la encargada de controlar la microbiota del intestino. La inmunidad innata en general se basa en receptores no específicos, en oposición al reconocimiento específico de antígenos que se utiliza en la inmunidad adaptativa. Estos receptores son denominados receptores para el reconocimiento de patógenos (pathogen-recognition

receptors (PPRs)) y se unen a los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)), es decir, no se unen a moléculas específicas sino a tipos de moléculas cuya estructura difiere sustancialmente de la de células eucariotas. Se han sugerido distintas denominaciones para los PAMPs como patrones moleculares asociados a microbios (microbial-associated molecular patterns (MAMPs)), con el fin de enfatizar la patogenicidad de algunos de estos ligandos, o patrones moleculares asociados al daño (damage-associated molecular patterns (DAMPs)), término que engloba a distintas estructuras internas que son producidas en el contexto de la inflamación o el daño tisular y que pueden también unirse a PPRs.

Los PPRs engloban varios tipos de receptores siendo los más estudiados los receptores del tipo Toll y los receptores similares a los dominios de oligomerización y unión a nucleótidos (nucleotide-binding and oligomerization domains (NODs)-like receptors (NLRs)). Los PPRs activan cascadas de señalización que regulan finamente la producción de productos antimicrobianos y de citocinas, dependiendo de las señales producidas por la microbiota intestinal.

### **5.1.1. TLRs**

Los TLRs son proteínas de transmembrana de tipo I expresadas por células del sistema inmune del epitelio intestinal y de la *lamina propria* (Tabla 3), tanto en la superficie celular como en endosomas. En humanos existen al menos 11 miembros de la familia de TLRs que reconocen no solo componentes microbianos, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos derivados de bacterias, virus y parásitos, sino también componentes procedentes de células dañadas del hospedador, como ácidos nucleicos y otros ligandos internos. Los TLRs forman homodímeros o heterodímeros (ver figura 5).

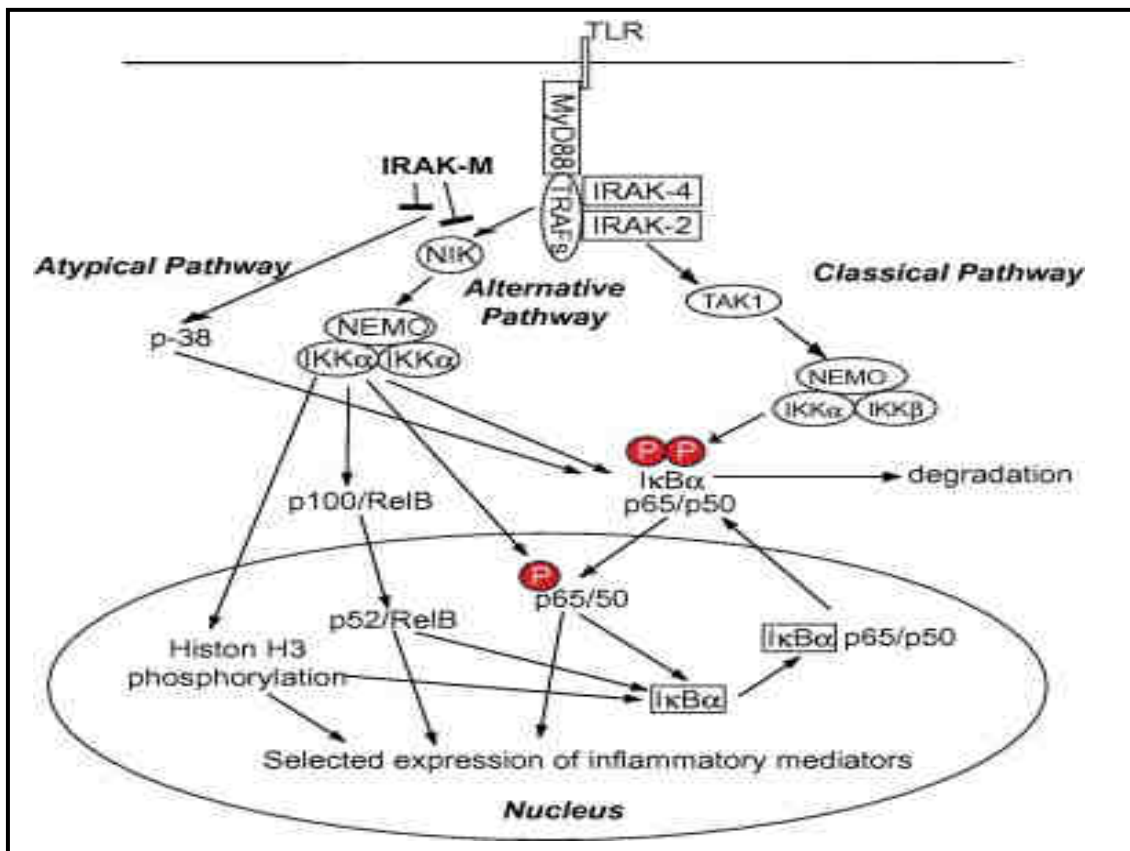


**Figura 5:** Mecanismo general de activación del sistema inmune por los receptores TLR [130].

La unión de estos ligandos a los TLRs conlleva la activación de distintas vías de transducción de señal que implican la activación factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) (figuras 5 y 6), la proteína activadora 1 (AP-1) o distintos factores reguladores de interferón (Interferón regulatory factors, IRFs).

El TLR que más nos interesa en esta Tesis Doctoral es el TLR4 por lo que vamos a explicar su vía de transducción de señal con algo más de detalle. El TLR4 necesita un co-receptor, MD2, para detectar totalmente LPS y proteínas virales. Se conocen 4 proteínas que están implicadas en la transducción de señal por TLR4: MyD88, TIRAP (Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein), TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$ ) y TRAM (TRIF-related adaptor molecule). La activación de TLR4 puede activar repuestas dependientes o independientes de MyD88. La respuesta mediada por MyD88/TIRAP da lugar a la activación de NF- $\kappa B$  y AP-1 y a la producción de citoquinas proinflamatorias. La vía independiente de MyD88 está mediada por TRAM/TRIF e induce factores

reguladores de interferon (IRFs) y la producción de diferentes interferones (Ver figura 6).



**Figura 6:** Vías de traducción de señal activada por los receptores TLR4 [131]

A pesar de que los TLRs se encuentran en células del sistema inmune innato, incluyendo enterocitos, que están obviamente expuestas a un sinnúmero de ligandos, no se produce una respuesta inflamatoria gracias a la fina regulación de esta respuesta. Los TLRs están implicados en la homeostasis intestinal, incluyendo la regulación de la barrera epitelial, mediante la modulación de la producción de IgA, el mantenimiento de la integridad intestinal y la expresión de péptidos antimicrobianos.

La importancia de los TLRs en el mantenimiento de la barrera intestinal ha quedado patente en modelos de colitis inducida por la administración de sulfato sódico de dextrano (DSS). Aunque la pathogenesis del DSS en la colitis no se comprende totalmente, se acepta

que la administración de DSS rompe la barrera intestinal, posiblemente mediante la interacción con lípidos de la superficie, lo que permite a la microbiota acceder a la mucosa intestinal. Se ha demostrado que la administración de ligandos de TLR5, 2, 3 y 9 protege frente a la colitis inducida por DSS, mientras que los animales knock-out para TLR2 y 4 y para MyD88 son más susceptibles a la colitis inducida por DSS [132]. Es más, los ratones knock-out de TLR5 desarrollan colitis espontáneamente. Los resultados obtenidos son opuestos a lo que se debería esperara si los efectos directos de la activación de los TLRs son la producción de citokinas proinflamatorias y sugieren que indirectamente los TLRs limitan la inflamación. Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con anticuerpos monoclonales frente a TLR4 suprime la colitis por DSS [133] y que la activación constitutiva de TLR4 en células del epitelio intestinal en animales transgénicos incrementa la colitis inducida por DSS [132], lo que indica la necesidad de limitar las respuestas para evitar una respuesta inflamatoria excesiva.

La regulación sutil de las respuestas de los TLRs se ejemplifica en el TLR9 (Tabla 3), el cual se expresa en la superficie de células del epitelio intestinal tanto en la membrana apical como en la basolateral. Estudios *in vivo* en líneas celulares de epitelio intestinal han observado que la estimulación basolateral de TLR9 induce una cascada inflamatoria, mientras que la estimulación de la cara apical induce una señal que promueve una respuesta antiinflamatoria, disminuyendo respuestas inflamatorias frente a estímulos basolaterales de distintos TLRs e induciendo por tanto tolerancia [134].

### **5.1.2. NLRs**

Los NLRs son una gran familia de proteínas citoplasmáticas que engloba más de 20 miembros. Entre los NLRs: NOD1 y NOD2 fueron los primeros que se identificaron y son sensores de componentes bacterianos implicados en la modulación de las respuesta intestinal inmune y apoptótica [135].

NOD1 se expresa en células del epitelio intestinal y reconoce el peptidoglucano de bacterias Gram negativas [136]. Un estudio mostró que la señalización mediante NOD1 constituye la principal vía para activar y estimular NF- $\kappa$ B y genes relacionados con NF- $\kappa$ B en células infectadas con patógenos bacterianos intracelulares que no activan TLRs. De este modo, NOD1 proporciona en las células del epitelio intestinal un mecanismo adicional de defensa frente a bacterias entéricas invasivas Gram-negativas que pueden evitar a los TLRs [137].

Como se ha indicado en capítulos anteriores de esta memoria (ver apartado 3.1.), NOD2 se expresa en células del epitelio intestinal, monocitos y células de Paneth. NOD2 reconoce muramildipéptido derivado del peptidoglucano común en bacterias Gram positivas y Gram negativas [138]. NOD2 es necesario para que las células de Paneth secreten péptidos antimicrobianos. Entre los factores genéticos más fuertemente relacionados con la EC se encuentran las mutaciones en el gen NOD2 (ver Tabla 2). Pacientes que tienen estas mutaciones muestran alteraciones en la flora intestinal e incapacidad de eliminar patógenos intestinales. De hecho, los ratones deficientes en NOD2 no son capaces de matar bacterias eficientemente y muestran alteraciones en la microbiota y un incremento en bacterias en el contenido fecal [25]. Es por tanto probable que las mutaciones en NOD2 puedan incrementar la susceptibilidad a la EC, alterando las interacciones entre la microbiota del íleon y la inmunidad de la mucosa [26].

Los NLRs se pueden ensamblar en respuesta a varios estímulos para formar grandes complejos macromoleculares que controlan la activación de la enzima proteolítica caspasa 1. La caspasa-1 a su vez hidroliza los precursores pro- IL-1 $\beta$  y pro- IL-18, proceso crítico para la liberación de las formas activas de estas citocinas que inicia las respuestas proinflamatorias antimicrobianas. Estos complejos son denominados inflamomas. El inflamoma mejor estudiado es el NLRP3. Este inflamoma se activa por gran variedad de PAMPs incluyendo muramildipéptido, RNA bacteriano o lipopolisacárido [139]. Otros activadores del NLRP3 incluyen señales de estrés metabólico (cristales de urato monosódico, glucosa extracelular),

contaminantes medioambientales (silica, amianto) o la radiación ultravioleta [140, 141]. Es interesante destacar que ratones que no expresan componentes del NLRP3 son más susceptibles a la colitis inducida por DSS y que se han descrito mutaciones en NLRP en casos de EC [141-143].

## **5.2. Vías de señalización relacionadas con la EII.**

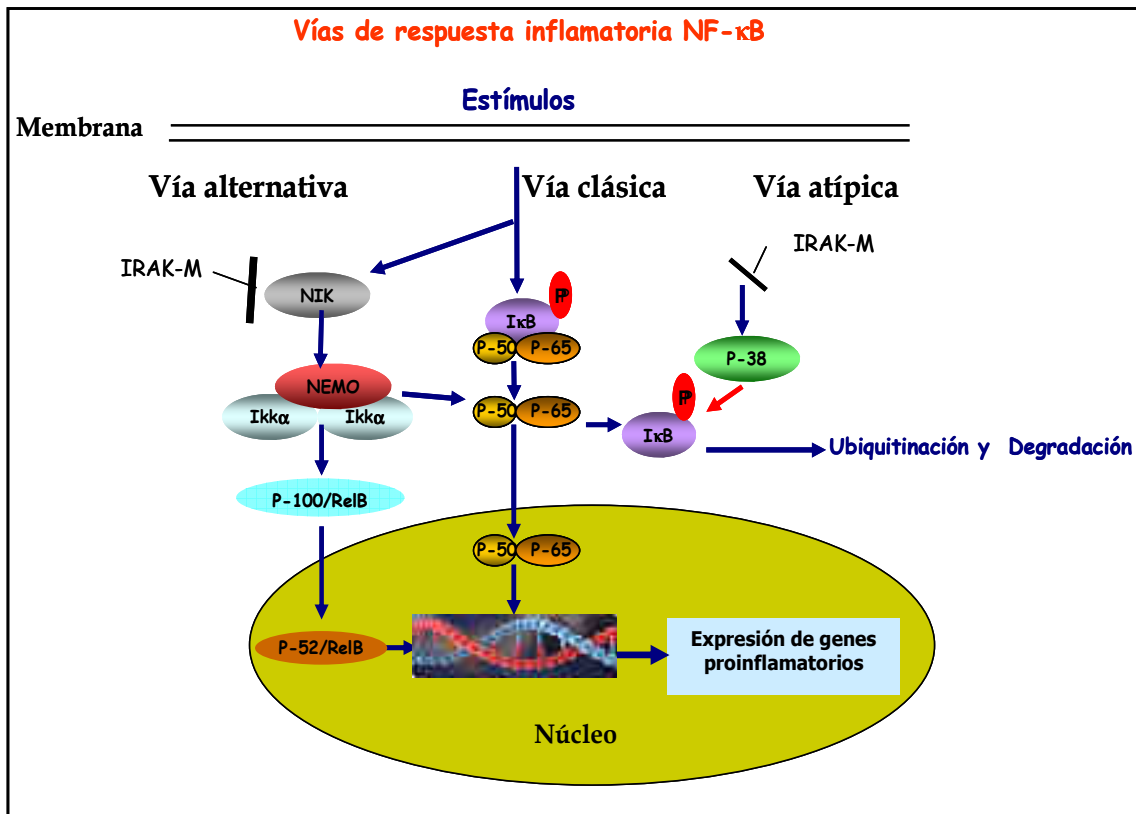
La traducción de señal se inicia mediante la unión de la molécula adaptadora MyD88 al dominio citoplásmico Toll/IL-1R presente en todos los TLRs. La implicación de la IL-1R-quinasas (IRAK4, IRAK1 y TRAF6) activa la señal en cascada que se traducen en la activación de las vías MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) y NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Takeda y Akira, 2004) y también de las vías SMAD, STAT, PPAR.

### **5.2.1. Factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB).**

La expresión de diversos genes genes inducibles e implicados en el desarrollo de la inflamación y en la proliferación celular esta regulada por el factor de transcripción NF-κB [144, 145].

La familia NF-κB o Rel está constituida por 5 péptidos diferentes que se unen entre sí formando dímeros, siendo el prototipo de éstos el formado por p50/p65 (Rel A) [146-150]. La forma inactiva se localizada en el citosol debido a la union del dimero a una proteína inhibidora llamada IκB (α, β o ε) que impide su translocación al nucleo [148, 151-153]. La activación de NF-κB se puede producir por dos vías; la cual, la vía clásica y la vía alternativa, aunque en ambos casos el resultado final es la translocación al núcleo del NFκB [154].





**Figura 7:** Vía de traducción de señal regulada por el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)

La activación de la vía clásica, también conocida como canónica, se lleva cabo por diversos estímulos (citokinas, agentes que provocan daños a nivel del DNA, o microorganismos), dando lugar a la fosforilación de I $\kappa$ B por el complejo IKK (kinasa de I $\kappa$ B), formado por dos subunidades catalíticas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) con capacidad kinasa y una molécula adaptadora llamada NEMO (Figura 7) [155-158]. La fosforilación de I $\kappa$ B provoca su disociación del dímero de proteínas Rel, su posterior poliubiquitinación por E3I $\kappa$ B [159] y su degradación proteolítica por la subunidad 26S del proteasoma [153]. La disociación de I $\kappa$ B deja expuestas las señales de localización nuclear en el dímero, que se transloca al núcleo, donde interacciona con los elementos reguladores de NF- $\kappa$ B presentes en los promotores de diversos genes, dando lugar a la trans-activación de los mismos (figura 7) [160].

En la vía alternativa participan dímeros de p100/RelB, sin embargo, NEMO no es indispensable [149, 161]. Esta vía se activa por diversos estímulos, como la linfotoxina-B que provocan la activación de la kinasa inducida por NF- $\kappa$ B (NIK), la cual fosforila y activa al complejo IKK $\alpha$  que a su vez fosforila la proteína p100, que se procesa y actúa liberando al dímero p52/RelB, que se translocará al núcleo. [162, 163].

Existe un mecanismo de autorregulación de NF- $\kappa$ B en virtud del cual su activación lleva aparejada el aumento en la expresión de I $\kappa$ B, lo que permite que la nueva proteína sintetizada capture los dímeros libres en el citosol o incluso viaje hasta el núcleo para capturar las subunidades que ya han sido activadas y devolverlas al citosol [153], y por tanto regular o controlar el funcionamiento del factor de transcripción y la vía en sí, es decir, un mecanismo de feedback negativo.

NF- $\kappa$ B presenta un papel crucial en el proceso inflamatorio que caracteriza a la EII; Modelos experimentales de colitis en animales muestran una activación de este factor de transcripción, y el bloqueo de NF- $\kappa$ B mediante diferentes estrategias supone una mejora del estado de los animales y de la colitis, como en el modelo de ratones deficientes en IL-10 [164], o modelos de tipo químico como el TNBS [165] o el DSS [166]. Dicha activación también se observa en modelos celulares de epitelio intestinal en un estado activado [167].

Por otro lado, la expresión, así como el estado de activación de NF- $\kappa$ B, se encuentran incrementados en biopsias humanas de pacientes con EII, en concreto, los macrófagos residentes en *lamina propria* y en células epiteliales [164, 168]. En el caso de monocitos-macrófagos, la activación de NF- $\kappa$ B conlleva la producción de citokinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 o IL-23) [164], implicadas en la activación y diferenciación de células inmunes residentes en la *lamina propria*, perpetuando así la reacción inmune [169, 170].

Aunque, a nivel de células epiteliales intestinales esta demostrado que la activación de NF- $\kappa$ B produce la inducción en la producción de mediadores proinflamatorios [171], en los últimos años, se ha añadido un

nuevo posible papel protector en la activación de dicho factor de transcripción en el epitelio intestinal, ya que su inhibición provoca un empeoramiento de la EII en modelos experimentales con ratones transgénicos [172, 173] dependiendo del tipo celular concreto y del estado de desarrollo de la enfermedad.

### **5.2.2. Proteín quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).**

La familia de las MAPKs está compuesta por una serie de proteínas intracelulares con actividad kinasa [174]. El estrés físico, algunas citokinas proinflamatorias y factores de crecimiento activan estas vías mediante la activación de las kinasas de MAPKs aumentando la fosforilación de los proteínas componentes de una cascada de tres reacciones de fosforilación, en la que las kinasas de MAPKs (MAP3K) fosforilan a las kinasas de MAPKs (MAP2K), éstas hacen lo propio con las MAPKs, que finalmente fosforilan al correspondiente sustrato.

La familia MAPKs, esta compuesta por tres familias diferentes: p42/44 extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAP, c-Jun NH2-terminal kinase (JNKs) y p38 MAPK, implicadas en la regulación de diferentes funciones celulares [175, 176].

La vía de p38 MAPK es la mas implicada en la regulación de la respuesta a citokinas y a mediadores proinflamatorios [177]. Su importancia se refleja en el hecho de que a inhibición de la fosforilación llevada a cabo por esta MAPK, mediante un compuesto sintético (CNI-1493), da lugar a la reducción en la producción de citokinas por parte de macrófagos [178]. Es más, esta inhibición ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de varios modelos animales de inflamación [179].

Por otra parte, en la mucosa intestinal de pacientes con EII, la activación de JNK se produce fundamentalmente en zonas con enfermedad activa y se localiza en células intestinales, macrófagos y linfocitos [180, 181], lo que indica una participación de JNK en la patogénesis de la EII,

aunque el mecanismo no está dilucidado hasta el momento. Además, el uso de inhibidores de JNK sólo parcialmente específicos supone una mejora en modelos experimentales de colitis por DSS [180, 182].

### **5.2.3. Vía de transducción de señal JAK-STAT**

La vía de transducción de señal JAK-STAT está formada por tres componentes principales: un receptor de membrana, una kinasa (Janus Kinase, JAK) y una proteína transductora de señal y activadora de la transcripción (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT). En células del sistema inmune se expresan miembros de la familia STAT y por tanto se activan distintas vías JAK-STAT por señales como interferón, interleukinas o factores de crecimiento. JAK se encuentra asociado al lado citoplasmático del receptor. Una vez, reconocido el ligando, se produce la dimerización del receptor y la activación mediante fosforilación de JAK, que se encuentra asociado al lado citoplasmático del receptor. JAK en su estado activado fosforila residuos de tirosina del receptor implicando la unión de STAT, que se fosforilará y dimerizará, quedando estos dímeros libres para trasladarse al núcleo [183, 184].

La activación de los distintos miembros de la familia STAT puede producirse específicamente, una citokina activa la vía o una vía puede ser activada por diferentes estímulos o citocinas. Así, mientras STAT-1 se activa en respuesta a IFN- $\gamma$ , STAT-4 en respuesta a IL-12 o STAT-6 en respuesta a IL-4, la vía de STAT-5 es activada por gran variedad de citocinas y mediadores inflamatorios [185].

La vía JAK-STAT se regula negativamente por distintos mecanismos que incluyen la desfosforilación por tirosina fosfatasas de receptores y STAT activados o la actividad de inhibidores endógenos específicos de JAK-STAT; proteínas con capacidad para limitar la respuesta mediada por citocinas, como las supresoras de la señalización de citocinas (suppressor of cytokine signaling, SOCS) o el inhibidor de STAT inducido (STAT-induced STAT inhibitor, SSI) [186, 187]. Estudios preliminares muestran un aumento en los niveles de SSI-3 en la mucosa de pacientes con EII, tanto EC como CU

[188]. SSI-3 se ha relacionado con la regulación de STAT-3, que se expresa en linfocito Treg y regula procesos antiinflamatorios.

#### **5.2.4. Receptor activado por proliferadores de peroxisomas- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )**

PPAR- $\gamma$  forma parte de la familia de receptores nucleares de hormonas [189, 190]. PPAR- $\gamma$  forma dímeros con el receptor retinoide X (Retinoid X Receptor, RXR) para unirse a elementos de respuesta a PPAR (PPAR Response Elements, PPRE) en los genes diana. PPAR-  $\gamma$  se expresa en altas concentraciones en el colon y juega un papel esencial en la inflamación inducida por bacterias. De hecho se ha demostrado que regula la inflamación tanto en modelos experimentantes de colitis como en pacientes con colitis ulcerosa en los que se ha observado que la expresión colónica de este receptor se encuentra alterada [191]. Ensayos en animales demuestran un efecto antiinflamatorio de las tiazolidindionas, ligandos de PPAR- $\gamma$ , en la colitis en ratones inducida por DSS [192] y TNBS [193].

## **6. MODELOS EXPERIMENTALES**

Los modelos experimentales se diseñan basandose sobre condiciones genéticas (especie, raza y cepa) y ambientales (condiciones mantenimiento durante el protocolo de experimentación) controladas, con el fin de estudiar los múltiples procesos y mecanismos que dan como resultado la EII. Sin embargo, no existe hoy en día un solo modelo que sea capaz de reproducir de forma exacta la enfermedad inflamatoria intestinal en humanos.

Por lo tanto, son muchos los modelos experimentales que se utilizan hasta la fecha para estudiar la EII, y pueden ser clasificados en tres categorías fundamentales y en otras categorías accesorias o secundarias:

- a) Merma en la actividad de linfocitos T reguladores: modelo de transferencia CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup>; ratones deficientes en IL-10; modelo de transferencia de médula ósea o transgénicos para la cadena  $\xi$  del TCR ( $\xi$ 26); ratones

- deficientes para la cadena alfa del receptor de células T o TCR (receptor de células T); ratones deficientes de TGF- $\beta$ .
- b) Excesiva respuesta efectora por parte de células T: ratones transgénicos STAT-4; ratones transgénicos IL-7; ratones *knock in* para TNF- $\alpha$ ; ratones deficientes en A-20; transgénicos para la proteínas B7 relacionado con Fc; ratones transgénicos para el ligando de CD40; modelos espontáneos de colitis (ratones C3H/HeJBir; ratones SAMP1/Yit).
  - c) Alteraciones a nivel del epitelio: ratones deficientes en *mdr1a*; ratones mutantes quiméricos para N-caderina doble negativo; ratones deficientes en *Ga12*; ratones deficientes en el ITF; ratones deficientes en *keratina-8*; modelos químicos o estrés ambiental (DSS, TNBS, oxazolona).
  - d) Otros: ratas transgénicas HLA-B27/B2M; ratones deficientes en WASP; ratones transgénicos para el receptor células T linfopénicos; ratones transgénicos para fucosiltransferasa.

### **6.1 Colitis por ácido trinitro-bencenosulfónico en ratas (TNBS)**

Puede considerarse en cierto modo un modelo híbrido, ya que aunque el daño se provoca mediante la administración de un agente químico que va a inducir una lesión a nivel del epitelio intestinal y que conlleva un exceso en la reacción inmune mediada por células T. A pesar de esta consideración, se engloba dentro de categoría de perturbaciones a nivel del epitelio. La colitis provocada por TNBS fue descrita por Neurath en 1995 y es considerada como un modelo de EC, ya que se caracteriza por una inflamación transmural, pérdida de peso y diarrea, y una respuesta de tipo Th1 exacerbada dirigida por niveles elevados de IL-12 [194]. La inducción de la colitis en roedores se lleva a cabo mediante la administración en forma de enema de una solución de TNBS en etanol al 50%. Previamente, Morris y colaboradores pusieron de manifiesto la importancia del vehículo de dicho preparado intrarrectal, es decir la solución de etanol, ya que permite

la ruptura de la barrera epitelial en la mucosa intestinal, y favorece el contacto del sistema inmune a nivel de la mucosa con la flora entérica [195]. Mientras que el TNBS provoca una reacción inflamatoria regulada por células T y B, actuando como hapteno al unirse de forma covalente a péptidos propios. La administración de una dosis única da lugar a una necrosis aguda de la pared colónica debido al estrés oxidativo, seguida de una inflamación de la mucosa, caracterizada por la producción de citocinas de tipo Th1 [196].

En la mayoría de los casos, la cronicidad en este modelo sólo se consigue a través de un protocolo con administraciones repetidas y periódicas, o mediante un proceso de presensibilización y se caracteriza por la producción de IL-2 e IL-17 [197]; aunque se habla de tres tipos de modelos, agudo, estable y crónico, las condiciones no están sistemáticamente definidos hasta la fecha. En esta reacción inflamatoria, la mucosa va a presentar un infiltrado caracterizado por la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que liberan grandes cantidades de IFN- $\gamma$  e IL-12, pero no IL-4 [194] y de células productoras de IgG e IgM [198].

Los linfocitos T reguladores tienen la capacidad de inhibir la colitis de tipo Th1 desarrollada en este modelo, lo cual queda demostrado en un experimento en el que la administración oral de TNBS previa a la inducción de la colitis inhibe el desarrollo de la enfermedad, debido a la inducción de células CD4<sup>+</sup> reguladoras en la *lamina propria* con capacidad para producir TGF- $\beta$  [198, 199].

## **6.2. Colitis por sulfato de dextrano sódico (DSS)**

En el modelo descrito por Okayasu (1990) [200] la inflamación colónica se consigue mediante la administración, en un porcentaje variable, de un polímero sintético (sulfato de dextrano sódico o DSS) en el agua de bebida. Normalmente, aunque los protocolos pueden diferir en casos concretos, se realizan ciclos en los que se alterna regularmente el DSS con el agua de bebida. Además del modelo agudo, podemos conseguir una

colitis crónica mediante la repetición de ciclos, ya que la enfermedad puede mantenerse en el tiempo.

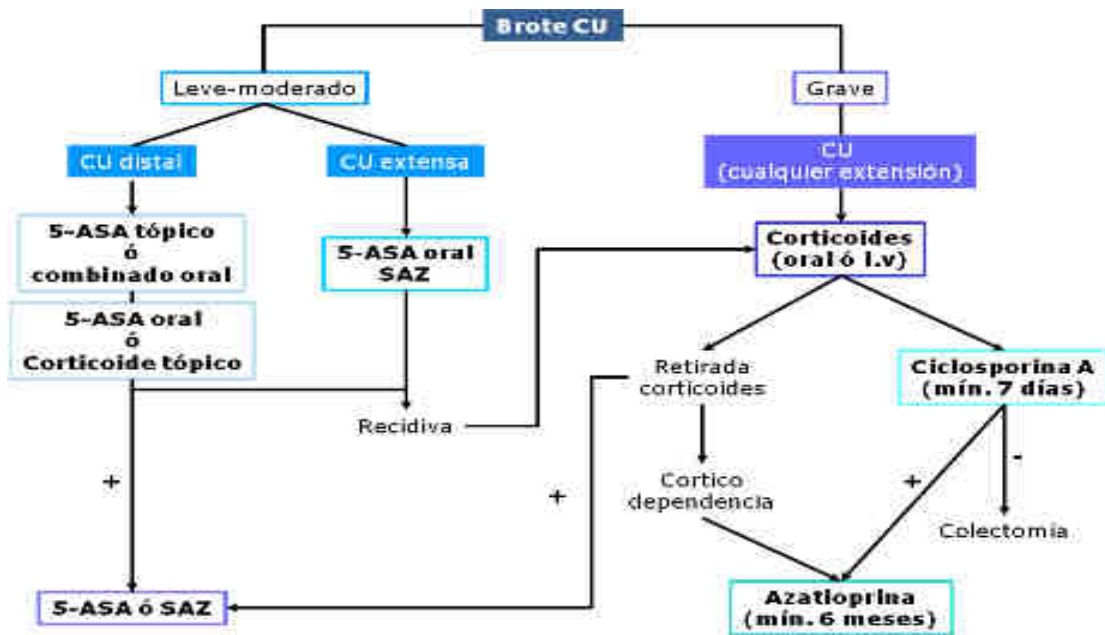
Este modelo crónico puede dar lugar en último término a la aparición de cáncer colorrectal mediante la asociación del DSS a un agente carcinógeno como el azoximetano, de forma similar a lo que ocurre en el caso de la displasia y la CU [201]. La colitis se caracteriza por una lesión extensiva, depleción completa de las criptas y una regeneración lenta del epitelio colónico. En el modelo de inflamación aguda, los animales experimentan diarrea, sangrado rectal y pérdida de peso; mientras que desde el punto de vista histopatológico se observa un daño a nivel de las criptas y de las células epiteliales, infiltración de granulocitos y células mononucleares, edema tisular y ulceraciones. La inflamación colónica, al menos en el caso del modelo agudo, no depende de la respuesta inmune adquirida, y por tanto es inducible independientemente de linfocitos, ya que se produce incluso en animales modificados genéticamente que no poseen este tipo celular (SCID) [202] y además, juegan un papel crucial las citocinas producidas por macrófagos, como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , y la flora bacteriana comensal [126]. En cambio, en la fase crónica se ha demostrado la participación de linfocitos CD4+ en zonas de curación, los cuales producen IFN- $\gamma$  e IL-4 [166]. De este modo, aunque las alteraciones producidas se asemejan a la colitis ulcerosa, es decir, una respuesta de tipo Th2 [203, 204], los últimos datos indican una respuesta mixta Th1/Th2.

## **7. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

### **7.1. Farmacología de la enfermedad inflamatoria intestinal.**

El tratamiento farmacológico es la piedra angular del manejo de la EII y la cirugía queda reservada para las complicaciones o la falta de respuesta al tratamiento farmacológico [205, 206]. La etiología, al menos parcialmente desconocida [22], de la EII impide el establecimiento de una estrategia terapéutica específica frente a una diana farmacológica etiopatogénica en su manejo [205-207].





**Figura 8:** Algoritmo de tratamiento en CU

Así, en la práctica clínica se emplean varios fármacos que producen una supresión inespecífica de los procesos inflamatorios y pertenecen a diferentes grupos farmacológicos (antiinflamatorios (aminosalicilatos y esteroides), antibióticos e inmunomoduladores (azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina y metotrexato) (ver figura 8). El abanico de posibilidades terapéuticas es cada vez más amplio, aunque ninguno de los principios activos usados actualmente es eficaz ni seguro de forma universal, por lo que la investigación en este campo es muy intensa.

### 7.1.1. Aminosalicilatos.

El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), también llamado mesalazina, y diversos fármacos que contienen y liberan dicha molécula han demostrado ejercer un efecto antiinflamatorio en la EII, de forma preferente en CU (ver figura 8), y se han empleado desde hace mucho tiempo, como ocurre en el caso de la sulfasalazina (5-ASA unido a sulfapiridina) [208]. Los aminosalicilatos son útiles, en concreto, en la inducción y en el mantenimiento de la remisión en CU, siendo menos útil en el caso de EC [209]. Dicho efecto depende de la porción 5-ASA [210, 211] que en el caso de la sulfasalzina, va a ser liberada de la sulfapiridina en el colon por medio

de las azoreductasas de la flora intestinal, lo que implica que no sea útil en la EC que se manifieste en el intestino delgado. Para evitar este problema, se han desarrollado formas de liberación controlada de mesalazina (Ver Tabla 4).

Nombre genérico	Especialidad	Liberación del 5-ASA
<b>Sulfasalazina</b>	Salazopirina <sup>®</sup>	Colon
<b>Olsalacina</b>	Rasal <sup>®</sup>	Colon
<b>Mesalacina</b>	Claversal <sup>®</sup>	Íleon (pH>6)
	Lixacol <sup>®</sup>	Íleon distal y colon (pH>7)
	Pentasa <sup>®</sup>	Intestino delgado y colon

**Tabla 4:** *Diversos fármacos fuentes del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)*

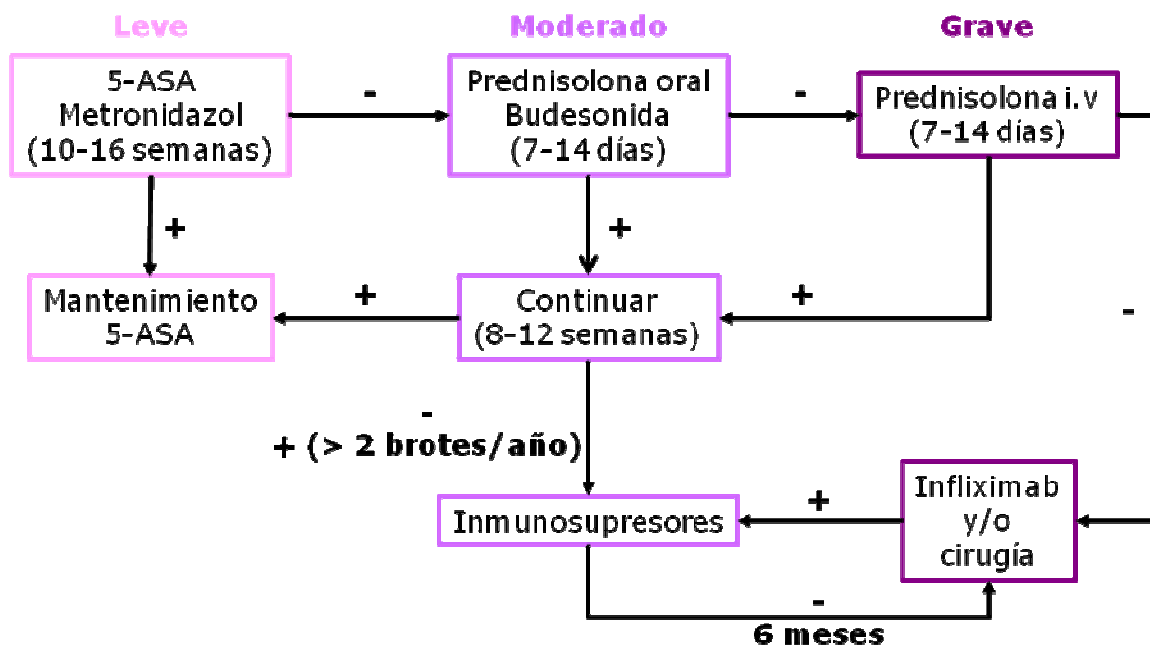
Aunque no está completamente dilucidado, el mecanismo del efecto antiinflamatorio de los aminosalicilatos no se debe fundamentalmente a la modulación de síntesis de prostaglandinas, como ocurre en el caso de los salicilatos [212, 213]. El mecanismo parece residir en la alteración del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la consecuente modificación en la producción de determinados mediadores inflamatorios como citokinas, moléculas de adhesión o enzimas. Así, aminosalicilatos como la sulfasalazina bloquean la actividad NF- $\kappa$ B mediante la inhibición de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  [214], [215], mientras que la molécula de 5-ASA en su forma libre impide la fosforilación de RelA [211]. A esto ha de sumarse la capacidad para eliminar ROS y la inducción de la apoptosis [216, 217]

Por otro lado, los aminosalicilatos pueden poseer mecanismos que contribuyen al efecto antiinflamatorio y que son independientes de la porción 5-ASA, como el bloqueo de la unión de receptores de citokinas *in vitro* ejercido por la sulfasalazina [218] o la olsalazina [219]. Otros efectos son la inhibición de la producción de leucotrienos quimioatrayentes en CU por parte de 5-ASA [220]; o la capacidad de protección frente al daño celular y a la apoptosis inducida por estrés oxidativo ejercida por los

aminosalicilatos sobre el epitelio intestinal [221, 222] y el aumento de la proteína de choque térmico [223]. El efecto final será una reducción en el tráfico leucocitario [224].

Los aminosalicilatos son fármacos bien tolerados, y los efectos adversos ligados a la fracción 5-ASA son moderados y reversibles: mareos, fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas o erupciones cutáneas [225, 226]. Existen ciertos efectos adversos propios de la sulfasalazina debidos a la porción de sulfapiridina, como oligospermia [227] o deficiencia de folato [228]. Existen otros efectos adversos más graves, pero poco frecuentes; así como la posibilidad de nefrotoxicidad debido a niveles elevados de salicilatos en sangre como consecuencia de altas dosis de aminosalicilatos [229, 230].

### 7.1.2 Glucocorticoides



**Figura 9:** Algoritmo de tratamiento en la CU con glucocorticoides

Los glucocorticoides son moléculas sintetizadas mediante la sustitución sobre la estructura del esteroide natural cortisol, siendo la prednisolona y su profármaco la prednisona, junto con la 6-metil

prednisolona los más empleados en el tratamiento de la EII (Ver figura 9), aunque las preparaciones a base de budesonida también se utilizan bastante, por su baja biodisponibilidad que permite la llegada de una menor cantidad a la circulación sistémica y minimizando las reacciones adversas, al menos cuando se utilizan dosis bajas.

Los glucocorticoides en cantidades suprafisiológicas ejercen efectos antiinflamatorios e inmunosupresores [231, 232]. Estos esteroides se introducen en la célula por difusión para unirse al receptor de glucocorticoides citoplasmático, que está unido a la proteína de choque térmico de 90 kDa. El complejo formado sufre una serie de cambios conformacionales que permiten la liberación del glucocorticoide unido al receptor de la citada proteína, permitiendo así la translocación al núcleo, donde el complejo interacciona a través del dominio dedo de zinc con los elementos de respuesta a glucocorticoides de múltiples genes, modulando así la transcripción de los mismos. Además, los receptores de glucocorticoides activados pueden interactuar con otros factores de transcripción en el núcleo y modularse entre ellos de forma recíproca. Entre los genes modulados se encuentran muchos que codifican proteínas con un claro papel en la respuesta inmune y por tanto, en la inflamación, y de ahí se deriva su efecto antiinflamatorio en la EII. Se produce una desviación hacia una respuesta de tipo Th2, un aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$  e inhibición de la producción de citocinas de tipo Th1, de moléculas de adhesión y de enzimas implicadas en la reacción inflamatoria.

La administración prolongada conlleva la aparición de efectos adversos de diverso tipo: metabólicos, inmunitarios, cardiovasculares, cutáneos, osteoarticulares, hormonales, neuropsiquiátricos u oculares. El riesgo se incrementa conforme aumenta la duración de exposición al fármaco y la dosis administrada [233].

Ciertos efectos adversos de los glucocorticoides poseen una especial relevancia en el caso de la EII, como la hiperglucemia, la esteatohepatitis no alcohólica o el riesgo elevado de osteoporosis [234, 235]. La dosis ideal

de glucocorticoides en CU o EC no está establecida sistemáticamente, porque la experiencia individual determina la práctica clínica en este sentido. Aquellos pacientes que presenten la enfermedad con un grado de actividad moderado o grave deben ser tratados en primer lugar con glucocorticoides (por vía intravenosa en los casos graves) para promover la remisión y reducir los casos mortales en la CU severa [236]. Tras la respuesta al tratamiento, la dosis será disminuida gradualmente hasta la retirada del fármaco para evitar efectos adversos por el tratamiento prolongado o la supresión del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, utilizando la terapia alternante cuando sea adecuada. En ese momento se mantendrá la remisión e la enfermedad mediante tratamiento con aminosalicilatos como primer escalón o con inmunosupresores como segundo escalón. En cualquier caso, un porcentaje elevado de los que responden necesitan cirugía al año. La administración rectal de glucocorticoides puede ser beneficiosa ya que supone menores efectos sistémicos, como en el caso de la budesonida en forma de enema [237].

Existe un fenómeno de resistencia o refracteriedad al efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides, mediado por un mecanismo molecular aún desconocido. Así, en estos pacientes no se consigue una remisión de la enfermedad activa. Otro aspecto importante en la utilización de los glucocorticoides es la dependencia. Los pacientes corticodependientes una vez superado la fase activa de la enfermedad mediante el tratamiento con corticoides, sufren una reactivación de la enfermedad cuando se procede a la supresión paulatina del tratamiento. Estas dos características de los glucocorticoides suponen una limitación en su utilización en la práctica clínica.

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

La 6-mercaptopurina y su profármaco la azatioprina son antimetabolitos púricos que se utilizan en el tratamiento del cáncer y que han demostrado propiedades inmunosupresoras. El metabolismo del fármaco puede llevarse a cabo por tres vías diferentes, dos de las cuales dan lugar a metabolitos inactivos, mientras que la tercera, catalizada por la

enzima hipoxantina fosforribosil transferasa, da lugar a los nucleótidos 6-tioguanina, que son los metabolitos activos [238]. Estos productos se acumulan intracelularmente e impiden la síntesis de purinas y ácidos nucleicos y la reparación del ADN, lo que conlleva una inhibición de la división y proliferación celular, siendo éste el mecanismo probable de su acción inmunosupresora.

Los principales efectos adversos debidos a la azatioprina y a la 6-mercaptopurina pueden clasificarse en dos categorías: alergias, que se manifiestan con pancreatitis, fiebre, erupciones, náuseas, diarrea o hepatitis; o toxicidad relacionada con la dosis que puede dar lugar a depresión a nivel de médula ósea y leucopenia, anemia o trombocitopenia, con un mayor riesgo de infecciones oportunistas o neoplasmas. El incremento en el riesgo de padecer cáncer no está confirmado.

Su utilidad en la EII radica en el empleo en los casos de corticodependencia y corticorrefractoriedad. En el caso de la EC, se amplía su empleo a casos de enfermedad extensa (más allá del colon), a la prevención de recurrencias tras la resección quirúrgica y al mantenimiento de la remisión.

#### **7.1.4. Metotrexato.**

Otro fármaco empleado en el tratamiento del cáncer es el metotrexato, cuya estructura es análoga a la del ácido fólico y por tanto actúa como sustrato de la enzima sintasa de folilpoliglutamato, que adiciona restos de ácido glutámico a dicho compuesto [239], lo que favorece la retención del metotrexato a nivel intracelular e incrementa la afinidad del fármaco para unirse a diversas enzimas diana [240, 241]. El metotrexato actúa como un inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa, mientras que los metabolitos poliglutamados del mismo son inhibidores de enzimas que se encuentran corriente abajo de dicha enzima en la vía metabólica del ácido fólico [242, 243].

Globalmente, el metotrexato impide las reacciones sintéticas dependientes de ácido fólico. El efecto antiproliferativo y citotóxico responsable del uso del metotrexato en el cáncer a dosis elevadas no es el responsable fundamental del efecto antiinflamatorio, sino que éste se debe a la inducción de apoptosis de linfocitos T y la inhibición de la activación de los mismos. Su acción es más rápida que con otros inmunosupresores, por lo que se emplea en casos de falta de respuesta a azatioprina o 6-mercaptopurina.

Debido al riesgo de hepatotoxicidad la administración semanal por vía subcutánea es la más utilizada. Así, es rápidamente eliminado en su forma original a nivel renal, mientras que los metabolitos poliglutamados se acumulan intracelularmente en diferentes tejidos, incluida la mucosa intestinal. La exposición prolongada al fármaco puede ocasionar toxicidad, siendo los efectos adversos clasificados en tres categorías: efectos antiproliferativos relacionados con la dosis en médula ósea, epitelio intestinal y folículos pilosos; reacciones idiosincrásicas de hipersensibilidad o de tipo alérgico; y daño hepático debido a los efectos acumulativos de la exposición prolongada. La aparición de los primeros determina la necesidad de disminuir la dosis y de la coadministración de ácido fólico [244]; mientras que las reacciones alérgicas (erupciones y pneumonitis) desaparecen tras la retirada del tratamiento. Al igual que en el caso de los glucocorticoides existe la posibilidad de resistencia a metotrexato, debida a un incremento en la expresión de la enzima diana, o a incremento en la salida del fármaco desde el medio intracelular[245].

### **7.1.5. Ciclosporina y tacrólimo**

Estas dos moléculas con diferente origen comparten un mecanismo inmunosupresor similar; se va a unen a proteínas citoplasmáticas (inmunofilinas), en concreto a la ciclofilina o FKBP12 y el complejo que se forma se une a la calcineurina inhibiendo su actividad fosfatasa. Como consecuencia, se produce impide la activación del factor nuclear de células T activadas (NFAT) que regula la transcripción de citokinas relevantes en la

activación de los linfocitos T, IL-2 e IFN- $\gamma$  [246], bloqueando la activación de dichas células inmunes.

Ambos presentan un estrecho margen terapéutico, con aparición de nefrotoxicidad, así como infecciones oportunistas y procesos malignos. Su uso debe restringirse a pacientes seleccionados de forma concomitante al inicio de otros inmunosupresores más seguros, con un seguimiento de los niveles sanguíneos para la dosificación y monitorización de la posible toxicidad. Así, esta opción terapéutica debe considerarse como un período de transición hacia el tratamiento con otro inmunosupresor con un mejor perfil de seguridad.

#### **7.1.6. Agentes biológicos o terapia biológica**

Los avances biotecnológicos de los últimos años han permitido el desarrollo de posibles dianas terapéuticas en la EII, y en otras enfermedades inflamatorias de carácter crónico como la artritis reumatoide, obtenidas por técnicas de biología molecular. La mayoría de estos fármacos pueden ser considerados "agentes biológicos" o "terapia biológica", materiales biológicos o modificadores de la respuesta biológica, como genes, células, tejidos, vacunas, sueros, y agentes humorales. La principal diferencia con respecto a los tratamientos o fármacos tradicionales es la interferencia con una diana única, lo que hace que la eficacia de dichas moléculas refleje la importancia patogénica de la diana en cuestión. Tres grupos pueden establecerse dentro de la terapia biológica:

**A)** Neutralización de citocinas proinflamatorias: concretamente, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  [247], o el eje IL-12/IL-18/IFN- $\gamma$ . El grupo más ampliamente estudiado es el formado por las moléculas que interfieren con las acciones biológicas del factor de necrosis tumoral o TNF (ver más adelante).

**B)** Aplicación de citocinas antiinflamatorias: fundamentalmente la administración de IL-10 [248, 249], o de IL-11 recombinante humana.

**C)** Interferencia con la activación celular o el tráfico celular: diversas estrategias se recogen en este punto, como los anticuerpos anti-CD4, con resultados poco prometedores, debido a su toxicidad; anticuerpos anti- $\alpha$ 4 [250]inhibidores de vías de transducción de señal, fundamentalmente



MAPquinasas, como el SB203580, que inhibe p38, o NF- $\kappa$ B, mediante diversas estrategias como el bloqueo de la degradación de I $\kappa$ B o de la producción de p65.

**Terapia anti-TNF- $\alpha$ :** Dentro de este grupo terapéutico para la EC existen moléculas sintéticas con actividad anti-TNF- $\alpha$ , que se van a unir a dicha citokina en su forma soluble o unida a la membrana lo que impide la unión a su receptor, y por tanto la ejecución de sus actividades biológicas [251, 252]. El infliximab es un anticuerpo quimérico monoclonal de humano y ratón; el CDP571 es un anticuerpo monoclonal humanizado; y el etanercept es una proteína recombinante humana de fusión que contiene una parte del receptor para TNF. El adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano, lo que evita las reacciones frente a las fracciones procedentes de otra especie, y por tanto es muy útil en pacientes que producen anticuerpos frente al infliximab.

Los principales efectos adversos son el desarrollo de reacciones en la infusión (con infliximab especialmente) y la inducción de anticuerpos. El más empleado en el caso de EC es el Infliximab, que se emplea en la inducción de la remisión en pacientes con EC moderada y que son resistentes a tratamientos convencionales, siendo muy útil en el cierre de fístulas. La administración se repetirá de forma periódica para mantener el estado de remisión de la enfermedad, periodo que transcurre hasta que se consigue el efecto terapéutico cuando comienza un tratamiento con azatioprina o 6-mercaptopurina, ya que el efecto de la molécula anti-TNF no suele durar más de 2-4 meses.

Además de las moléculas con capacidad de unión a TNF- $\alpha$  citadas anteriormente, se han planteado otras estrategias terapéuticas relacionadas que se encuentran en proceso de investigación. Entre ellos, los inhibidores de TNF- $\alpha$  de pequeño tamaño molecular, como los inhibidores de fosfodiesterasas [253, 254], la talidomida [255, 256], o los inhibidores de la enzima convertidora de TNF- $\alpha$ . [257].

### 7.1.7. Terapia génica.

La terapia génica consiste en la introducción de un gen activo y funcional en células somáticas con el fin de expresar o inhibir en ellas una proteína terapéutica, mediante el empleo de un vector vírico [258-262]. Otro ejemplo son los oligonucleótidos antisentido frente a ICAM-1, como el ISIS 2302, cuyos efectos no han podido ser confirmados [263]. La investigación clínica de estos procedimientos se encuentra en un periodo de intensa actividad con el fin de conseguir nuevas estrategias de modo menos costoso y con una eficacia clínica aceptable.

Una vez expuesto el arsenal terapéutico disponible en la actualidad para la EII, a continuación se exponen los algoritmos en el tratamiento de EC y CU de forma independiente. (Ver figuras 10)

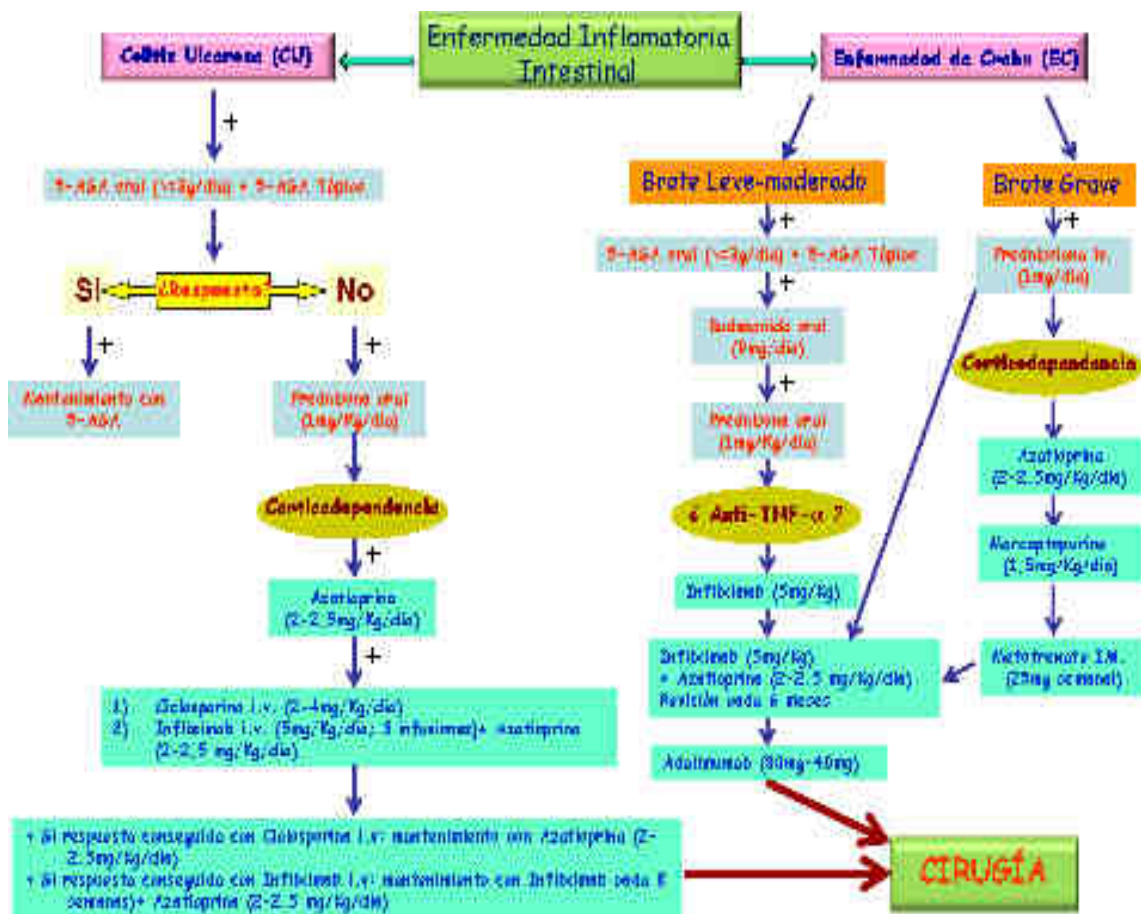


Figura 10: Algoritmo de manejo terapéutico CU y EC

A pesar del amplio abanico de fármacos empleados en el tratamiento de la EII, las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad no son totalmente satisfactorias. En primer lugar, no existe ningún fármaco específico para el tratamiento de esta enfermedad, sino que se utilizan fármacos con carácter antiinflamatorio o inmunosupresor y que, por tanto, van a suprimir la respuesta inmune y las vías inflamatorias de manera global. Esto puede hacer que el individuo presente una merma en la capacidad de defensa, es decir, en su sistema inmune. Por otro lado, los tratamientos farmacológicos empleados se caracterizan por un amplio espectro de reacciones adversas; y en algunos casos, como en el de los glucocorticoides, dan lugar a fenómenos de dependencia. Además, existen situaciones en las que los pacientes no responden a un determinado fármaco, o incluso se hacen refractarios al mismo. Por todo ello, la farmacología de la EII es un campo de intensa investigación y la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas con un mejor perfil de toxicidad está totalmente justificada.

## **8. PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS**

La nutrición juega un papel importante en el manejo de la EII, de hecho hasta un 85% de los pacientes con EII están malnutridos y la pérdida de peso afecta hasta al 80% de los pacientes con EC y a entre un 18-62% de los pacientes con CU [264].

No obstante, no sólo es importante la nutrición en el sentido tradicional, como aporte de nutrientes necesarios para el mantenimiento de las funciones vitales, sino que existe una serie de alimentos funcionales, que pueden contribuir en el tratamiento de la EII. Alimentos funcionales son aquellos contribuyen a la prevención, el manejo o el tratamiento de enfermedades [265]. La búsqueda de alimentos funcionales que puedan contribuir al tratamiento y el manejo de la EII es un campo muy activo de investigación por su seguridad y la ausencia de efectos secundarios. Entre éstos ácidos grasos poliinsaturados de la serie n3[266], polifenoles [266], probióticos [267] y prebióticos [268] son los más estudiados.

El lumen gastrointestinal está habitado por una gran variedad de bacterias que se incrementa en número y diversidad a lo largo del tracto gastrointestinal. Así, la carga bacteriana presente en el intestino humano varía desde  $10^1$  a  $10^3$  unidades formadoras de colonia por gramo de tejido (UFC/g) en el estómago y el duodeno, hasta  $10^{11}$  a  $10^{12}$  UFC/g en el colon. Bacteroides, eubacterias, bifidobacterias, clostridios y lactobacilos son las bacterias más abundantes en el intestino grueso de humanos [269]. Entre la enorme carga de bacterias del tracto gastrointestinal se incluyen bacterias comensales beneficiosas (predominantemente bifidobacterias y lactobacilos) y potencialmente dañinas. El intestino es un lugar confortable para las bacterias que les aporta un microambiente estable y rico en nutrientes, a cambio, las bacterias beneficiosas proporcionan al hospedador nutrientes esenciales (como vitamina K o biotina), colaboran en la digestión de alimentos, previenen la expansión de microorganismos patógenos e incluso cooperan en el desarrollo del intestino y la modulación de la respuesta inmune del huésped.

A pesar de la enorme carga bacteriana y de su diversidad, se mantiene un balance exquisito casi constantemente. En 2008 se propuso el concepto de "normobiosis" para caracterizar una microbiota intestinal normal en la que especies/géneros de microorganismos con beneficios potenciales sobre la salud predominan en número sobre los potencialmente patógenos. Paralelamente se incluyó el término "disbiosis" que caracteriza una microbiota en la que géneros/especies de microorganismos potencialmente patógenos predominan, creando una situación proclive a la enfermedad [270].

### **8.1. Prebióticos**

Los prebióticos son ingredientes no digestibles que afectan beneficiosamente al organismo mediante la estimulación del crecimiento y actividad de bacterias intestinales beneficiosas, mejorando la salud [271]. Entre los prebióticos más utilizados se pueden destacar la inulina, los fructooligosacáridos (FOS), los galactooligosacáridos o las maltodextrinas. Tanto la inulina como los FOS pertenecen a los llamados oligosacáridos de

tipo fructano. Estos oligosacáridos han demostrado estimular selectivamente el crecimiento de bifidobacterias y en algunos casos de lactobacilos, promoviendo un cambio selectivo en la composición de la microbiota intestinal. Recientemente existe un gran interés por la llamada fibra soluble de la leche, compuesta por oligosacáridos complejos que poseen efectos sobre la flora bacteriana incrementando la proporción de bífidos y colaborando al desarrollo de la inmunidad del recién nacido.

El mecanismo clásico de acción de los prebióticos incluye su digestión por la microbiota colónica. La mayoría de las bacterias colónicas son anaerobias estrictas y por tanto obtienen energía mediante fermentación. En la fermentación de prebióticos (carbohidratos) se produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, además de otros compuestos como lactato, piruvato, etanol, metano, etc. Las consecuencias más importantes de esta fermentación son:

1. Los AGCC acidifican el pH del lumen intestinal inhibiendo el crecimiento de patógenos e incrementando la movilidad intestinal.
2. Los AGCC producidos son absorbidos rápidamente a través de la mucosa colónica siendo utilizados como fuente de energía. Así, el acetato se metaboliza principalmente en el músculo, el riñón, el corazón y el cerebro. El propionato en el hígado es un posible substrato gluconeógeno y podría también contribuir a la inhibición de la síntesis de colesterol. Por último, el butirato se metaboliza principalmente por el epitelio intestinal. El butirato es la principal fuente de energía del enterocito y regula tanto la diferenciación como el crecimiento celular.

Por otra parte, la utilización de prebióticos por la microbiota produce un aumento de la misma y por tanto un incremento de la masa fecal que estimula el tránsito intestinal. Algunos de los prebióticos, por ser fibra, también incrementan la masa fecal por absorción de agua.

Existen múltiples evidencias que indican que los prebióticos podrían afectar al sistema inmune y en particular al sistema inmune asociado a intestino. Estos efectos podrían ser consecuencia directa o indirecta del

cambio en la composición y/o en el perfil de fermentación de la microbiota, se ha observado que niños alimentados con prebióticos poseen mayores niveles de IgA en heces [272, 273].

Gran cantidad de estudios han mostrado que los efectos de los prebióticos van más allá de sus efectos fisiológicos a nivel del colon, afectando a todo el organismo y/o contribuyendo a reducir el riesgo de patologías intestinales y sistémicas. Así, por ejemplo se ha constatado en estudios clínicos controlados que los prebióticos reducen la incidencia de enfermedades atópicas y que incluso este efecto persiste más allá del periodo de intervención. De hecho, las dianas fisiológicas y patofisiológicas de los prebióticos, es decir, los efectos asociados con la estimulación del crecimiento y/o la actividad de un número limitado de microorganismos intestinales beneficiosos incluyen [274].

1. Mejora y/o estabilización de la microbiota intestinal
2. Mejora de las funciones intestinales (consistencia, regularidad y volumen de heces)
3. Incremento de la absorción y mejora de la salud ósea (contenido óseo de Calcio, densidad mineral ósea)
4. Modulación de la producción de péptidos gastrointestinal, el metabolismo energético y la saciedad
5. Inicio (después del nacimiento) y regulación/Modulación de las funciones inmunes
6. Mejora de la función intestinal de barrera, reducción de la endotoxemia metabólica
7. Reducción del riesgo de infecciones intestinales
8. Probablemente, reducción del riesgo de obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, etc.
9. Reducción del riesgo y/o mejora del manejo de la inflamación intestinal
10. Reducción del riesgo de cáncer de colon.

Aunque aún existen pocas pruebas, la hipótesis que presentamos en esta Tesis Doctoral y que está avalada por distintos estudios llevados a cabo

en nuestro laboratorio, indicaría que los prebióticos poseen además efectos sobre el sistema inmune intestinal independientes de su efecto prebiótico. Es decir, que los prebióticos serían capaces de interactuar directamente con células de la mucosa intestinal (enterocitos, macrófagos, linfocitos, etc) mediante receptores y modular la respuesta inmune de estas células.

### **8.1.1. Prebióticos e inflamación intestinal**

Como se ha descrito anteriormente, actualmente se cree que la EII es consecuencia de una reacción inmune anormal frente a las bacterias intestinales en personas genéticamente predispuestas. Se ha demostrado que en pacientes con EII existe disbiosis intestinal. De hecho, se han observado menores proporciones de bifidobacterias en las heces de pacientes con EC y con CU activas. De igual modo, en la mucosa de pacientes con ambos tipos de enfermedad se han descrito menores concentraciones de bifidobacterias y mayores concentraciones de bacteroides.

Numerosos estudios en animales utilizando modelos de inflamación intestinal han demostrado que los prebióticos pueden ejercer efectos antiinflamatorios [275]. De hecho, entre otras acciones, se ha demostrado que los prebióticos puede estimular el crecimiento de bifidobacterias, incrementar la producción de IL-10 e inhibir la producción de citocinas proinflamatorias (IL-2 e IFN $\gamma$ ), acciones que podrían contribuir al control de la inflamación. En la última década se han llevado a cabo estudios clínicos que muestran que los prebióticos pueden contribuir a reducir la actividad de la enfermedad. No obstante se necesitan más estudios con mayor número de pacientes, controlados, multicéntricos aleatorios y doble ciego con placebo con el fin de describir mejor sus efectos. Además, es necesario describir mejor su mecanismo de acción tanto en modelos animales como en humanos.

## 8.2. Probióticos

Según la OMS se define como probiótico a "organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador". Entre los organismos mas utilizados como probióticos, destacamos las bacterias lácticas y las bifidobacterias, aunque también se usan bacterias de otros géneros, como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. [276]

Para que un probiótico pueda considerarse como tal, debe cumplir una serie de características. En general, se trata de microorganismos de origen humano, porque presentan mayor facilidad para colonizar el intestino y no son patógenos, si bién, como hemos comentado anteriormente, existen excepciones como *Saccharomyces cerevisiae*. El proceso de replicación debe ser corto y han de ser capaces de adherirse a la mucosa intestinal y modular la respuesta inmune. Deben ser capaces de excluir microorganismos patógenos, y ser resistentes al pH gástrico, enzimas digestivas y acción detergente e inhibidora de las sales biliares, puesto que han de llegar viables al intestino. Igualmente deben ser resistentes a la destrucción por procesos tecnológicos.

Se han propuesto diferentes mecanismos a través de los cuales los probióticos pueden ejercer efectos beneficiosos sobre el tracto gastrointestinal. En primer lugar, estas bacterias son capaces de prevenir la adhesión, establecimiento y posterior invasión de microorganismos enteropatógenos, debido a su capacidad para disminuir el pH en el lumen intestinal mediante la producción de ácido grasos de cadena corta (AGCC), principalmente lactato, propionato y butirato, como consecuencia de su capacidad fermentativa sobre la fibra dietética [277-279], y de promover la secreción de bacteriocinas o peróxido de hidrógeno [280-283] y/o estimular la producción de mucinas. En segundo lugar, los probióticos son capaces de mejorar la función de la barrera epitelial, disminuyendo la permeabilidad intestinal, produciendo AGCC e incrementando la producción de moco, lo que conlleva a un incremento de la integridad de la barrera epitelial [284-286]. Finalmente, se ha descrito que los probióticos son capaces de ejercer



acciones inmunomoduladoras ya que al localizarse a nivel intestinal y ser capaces de interactuar con el epitelio de la mucosa, actúan sobre inmunidad específica e inespecífica ejerciendo efectos beneficiosos sobre el hospedador. Entre los mecanismos descritos, podemos destacar la capacidad que presentan algunos probióticos de activar al sistema inmune intestinal mediante la producción de inmunoglobulinas específicas tipo A [287], activación de células K ("natural killer") [288-290], aumento de la capacidad fagocítica de leucocitos intestinales [290-292], aumento de la producción de linfocitos B y de la secreción de IgA [293] e IgG [294], así como el incremento de la producción de citocinas como IL-2, IL-6 o TNF- $\alpha$  [295, 296]. Otros probióticos tienen la capacidad de aumentar la producción de citocinas protectoras como la IL-10 o el TGF- $\beta$ , o de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias [297-301].

Aunque se ha propuesto que el uso de probióticos está asociado a un gran número de efectos beneficiosos en humanos, como la mejora de la intolerancia a la lactosa, reducción de la hipercolesterolemia y protección frente a enfermedades inflamatorias, infecciosas y alérgicas [302], la cepa probiótica ideal todavía no se ha identificado, dada la variabilidad de efectos obtenidos entre cepas de la misma especie, las condiciones de su empleo y la dosis. Entre las distintas patologías intestinales frente a las que los probióticos parecen presentar efectividad se encuentran: diarrea, intolerancia a la lactosa, enfermedad inflamatoria intestinal y úlcera gastroduodenal [303-306].

### **8.2.1. Probióticos e inflamación intestinal**

El uso de probióticos en el tratamiento de la EII es bastante controvertido. Se ha propuesto que en pacientes con EII, los probióticos actúan restaurando el equilibrio de la microbiota colónica y de este modo ayudan a prevenir y controlar la enfermedad. Son numerosos los estudios llevados a cabo en modelos experimentales de inflamación intestinal que demuestran la efectividad de una gran variedad de probióticos [307], sin embargo, los estudios llevados a cabo en humanos son menos abundantes.

Ensayos clínicos realizados con *Escherichia coli Nissle 1917* [308]o la mezcla de probióticos VSL#3 [309]demuestran la utilidad de estos productos en el mantenimiento de la fase de remisión de la enfermedad y previniendo posibles recaídas, fundamentalmente en las formas activas mas severas de EII. Diversos estudios demuestran que *Eschericchia coli Nissle 1917* es capaz de desplazar a *E. coli* enteroinvasivo y de inhibir la expansión de células T a través de la señal de TLR2 [310, 311], y que la mezcla VSL#3 actua incrementando la producción de IL-10 e inhibiendo la de INFγ por células T y parece ser efectiva en el mantenimiento de la remisión de la pouchitis crónica [309]. Se ha evaluado también la eficacia del tratamiento probiótico en colitis ulcerosa activa, demostrándose que la eficacia de la cepa de *E. coli nissle 1917* es similar a la de la mesalazina en la iducción de la remisión [312].

En cuanto al uso de probióticos en la prevención y tratamiento de la EC, son muy pocos los estudios llevados a cabo. Se ha demostrado que la asociación de *Saccharomyces boulardii* con mesalamina disminuye la incidencia de recaídas en pacientes con EC [313]y que la administración oral de *Lactobacillus salivarius UCC118* reduce de manera significativa el índice de actividad de la enfermedad en pacientes con EC de carácter leve a moderado. Sin embargo, también es importante indicar que existen otros estudios en los que los probióticos han demostrado no ser eficaces [314, 315].

### **8.3. Simbióticos**

El término *simbióticos* se refiere a aquellos productos que contienen probióticos y prebióticos. En sentido estricto debería ser reservado a productos en los que el componente prebiótico selectivamente favorece al componente probiótico (por ejemplo oligofructosa y bifidobacterias) [316], mejorando la supervivencia de las bacterias probióticas y estimulando la actividad de las bacterias endógenas del hospedador [317-320].

### 8.3.1. Simbióticos e inflamación intestinal

Una opción para el tratamiento de la EII es el uso de *simbióticos* en un intento de favorecer la sinergia de ambos tratamientos alcanzando efectos mayores que con el uso aislado de ambos. Sin embargo aún solo disponemos de varios estudios preliminares con mejoría de parámetros endoscópicos e inflamatorios. Uno de los estudios más novedosos del efecto de los simbióticos en la EII, fue el realizado por Furrie *et al.*, (2005) en el cual mezcló prebiótico con *B. longum* en un estudio randomizado doble-ciego obteniendo como resultado la disminución de  $\beta$ -defensinas, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , así como una disminución de la inflamación en las biopsias de los pacientes [321]. De igual modo, en otro estudio se hizo una combinación de FOS y *Lactobacillus paracasei*, obteniendo un incremento de *lactobacillus* y *bifidobacteria* y un descenso de *clostridium* y *enterobacterium* [322]. Sin embargo, los resultados obtenidos en EC con Synbiotic, 2000 (una mezcla de cuatro *lactobacillus*, *-Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei 19*, *Lactobacillus plantarum* más una mezcla de cuatro fibras de plantas bioactivas betaglucano, inulina, pectina y almidón resistente, en total 10 g de fibra vegetal) demuestran que no previene la recurrencia tras cirugía [323].

## 9. ACTIVE HEXOSE CORRELATED COMPOUND (AHCC)

El Active Hexose Correlated Compound (AHCC) es un suplemento nutricional obtenido del cultivo del micelio del hongo Shitake (*Lentinus edodes*)[324]. Este producto, manufacturado en Japón por la empresa (Amino Up Chemical Co, Ltd (Sapparo, Japan), está compuesto principalmente por carbohidratos (70% del peso seco), aunque también contiene proteínas (13%), grasas (2%) y fibra (2%), Del contenido en carbohidratos cabe destacar que aproximadamente el 20% de los mismos son  $\alpha$  1-4 glucanos (15.8g/100g de producto). La relativa alta concentración de  $\alpha$  1-4 glucanos de bajo peso molecular (aproximadamente 5000 Da) hace que sean más fácilmente absorbibles en el tracto gastrointestinal. Se ha propuesto que estos glucanos son los responsables de los efectos beneficiosos del AHCC [325-330].

El alto contenido en carbohidratos, nos hizo pensar que el AHCC podría ser un producto útil como probiótico y que por tanto podría tener efectos antiinflamatorios en un modelo animal de inflamación intestinal. Estas aplicaciones no habían sido estudiadas hasta el inicio de este estudio. El AHCC posee propiedades y características que le hacen ser interesante como suplemento nutricional. De hecho, varios estudios han demostrado que se tolera bien en humanos como suplemento nutricional y como agente terapéutico [327, 331] y se ha venido utilizando desde hace años en Asia y América del Norte. Son ya muchos los estudios que han demostrado que la administración oral de AHCC posee una gran variedad de efectos terapéuticos, incluyendo efectos anticancerosos tanto en modelos animales como en estudios clínicos [328, 329], la prevención de la aparición de diabetes inducida por estreptomycin en modelos animales [332, 333] y la mejora de la respuesta inmune [330, 334, 335]. Las actividades beneficiosas del AHCC han sido atribuidas a sus propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes [330, 336]. A continuación resumiremos los conocimientos más relevantes sobre este suplemento nutricional.

### **9.1. AHCC e infecciones**

Se ha descrito ampliamente que el AHCC modula la actividad del sistema inmune frente a patógenos, incluyendo tanto virus como bacterias. Los estudios llevados a cabo hasta la fecha incluyen agentes como el virus de la gripe (H1N1), el virus de la gripe aviar (H5N1), el virus del Nilo occidental, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida Albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) [337-340].

En general estos estudios, llevados a cabo en modelos murinos, muestran que el AHCC incrementa la tasa de supervivencia después de la infección con el agente patógeno [340]. En el caso por ejemplo de la infección con el virus de la gripe (H1N1) [337], ratones jóvenes (6-8 semanas) infectados con el virus y que recibieron AHCC durante los 7 días

previos a la infección y durante la infección, mostraron una mayor tasa de supervivencia y mantuvieron su peso durante el tiempo del estudio. Además, se observó que la suplementación con AHCC produjo un incremento en la actividad de células NK, así como una menor infiltración tisular de linfocitos y macrófagos en el pulmón.

## **9.2. AHCC y cáncer**

Después de los suplementos con *Agaricus blazei*, el AHCC es, en Japón, el producto más utilizado en medicina alternativa por los pacientes con cáncer [341]. La mayor parte de los estudios llevados a cabo con este suplemento alimenticio están relacionados con esta enfermedad e indican que este compuesto puede tener efectos inmunoestimuladores sobre la inmunidad innata y que pueden incluso inhibir el crecimiento de tumores [324].

En 2006, Gao y cols demostraron que pretratando con AHCC a ratones a los que inocularon células de melanoma F16F0 o células tumorales del timo EL4, disminuía el desarrollo del tumor e incluso disminuía el tamaño del mismo. Éste hallazgo fue asociado con un incremento de la proliferación de células T CD4+, CD8+, de la producción de IFN $\gamma$  por células CD8+ y con un incremento de las células NK y Células T  $\gamma$ - $\delta$  [330]. Experimentos adicionales *in vitro* demostraron que el AHCC inhibía el crecimiento de las líneas celulares tumorales K562 y Raji [330].

Los principales estudios en humanos han sido realizados en pacientes con cáncer hepatocelular. En un estudio llevado a cabo por Matsui y Col. [328] se incluyeron pacientes operados de cáncer de hígado que recibieron en el postoperatorio AHCC (n=113) y pacientes controles que no recibieron este suplemento (n=156). Los resultados mostraron que la tasa de recurrencia de tumores malignos fue significativamente menor (34% vs 66%) y que la supervivencia fue significativamente mayor en el grupo de pacientes tratados con AHCC (80% vs 52%). Otro estudio llevado a cabo con pacientes de cáncer de hígado avanzado, estudió si el AHCC podía mejorar su prognosis. En este estudio se incluyeron 44 pacientes de los cuales 34

recibieron AHCC y 10 se incluyeron en el grupo control. La ingesta de AHCC prolongó la supervivencia de los pacientes y mejoró su calidad de vida [342].

El AHCC se utiliza como terapia alternativa con el fin de atenuar los efectos secundarios de la quimioterapia y se ha descrito que puede incluso incrementar el efecto de ésta. Matsushita y cols. estudiaron el efecto de la coadministración de fármacos anticancerígenos y AHCC [329]. Los resultados obtenidos mostraron que cuando se administraba AHCC junto a citarabina a ratones disminuía la pérdida de pelo. Por otra parte la administración conjunta de AHCC con metortrexato y/o mercaptopurina, disminuía el daño hepático disminuyendo la concentración de albúmina sérica, así como el nivel de enzimas metabolizadoras.

En un estudio realizado con ratones sanos Hirose y cols. [343] estudiaron el efecto de la administración de AHCC con cisplatino demostrando que el peso y tamaño de los tumor de colon en ratas tratadas con cisplatino y AHCC era menor que en las que se le administraba cisplatino únicamente. La administración de AHCC también atenuó los efectos secundarios específicos generados por el cisplatino; la nefrotoxicidad y la aplasia medular fueron menores en los animales tratados con AHCC. Matsushita [329] , estudió los efectos de la administración conjunta de AHCC y tegafur/uracilo, en ratas SHR que padecen hipertensión congénita y depresión de células T. En este estudio se indujo a las ratas un adenocarcinoma de mama con células SST2. Los animales que recibieron AHCC presentaron un menor diámetro y peso del tumor primario, así como menor número de nódulos axilares metastásicos. Además, se observó un aumento de producción de óxido nítrico y de TNF- $\alpha$  en el grupo tratado con AHCC.

Por último, se han llevado a cabo varios estudios con el fin de estudiar posibles interacciones del AHCC con tratamientos convencionales. Mach y col.[344] , estudiaron las vías de metabolización del AHCC y comprobaron que era metabolizado principalmente por el CYP 2D6, por la administración fármacos metabolizados por esa misma vía, como es el caso de la dexametasona, debería monitorizarse. No se observó en este estudio metabolización del AHCC mediante el resto de citocromos estudiados

(CYP450 3A4, 2C8 y 2C9), principales metabolizadores de los fármacos anticancerígenos [344].

### **9.3. Efectos del AHCC sobre el sistema inmune**

Se ha sugerido que la suplementación con AHCC incrementa la inmunidad innata, más concretamente que incrementa la actividad de células NK tanto en humanos como en roedores [330]. En un estudio realizado por Uno [345] se estudió el efecto de AHCC administrado a 38 pacientes con diferentes tumores. Tras seis meses comprobaron que los niveles séricos de IL-12, IFN- $\gamma$ , y la actividad de las células NK en sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina, volvían a niveles comparables a los de pacientes sanos. Estos resultados son compatibles a los observados por [346] en un estudio en que administraron AHCC a pacientes con diferentes tipos de tumores. Cuando se comprobaron los niveles de células NK a los 3 y 6 meses se describió que las células NK tenían un 20% mayor de ratio con respecto al resto de células de la serie blanca.

Por otra parte, se ha descrito que este suplemento alimenticio activa los macrófagos e incrementa el número de células dendríticas, la inmunidad innata y consecuentemente la inmunidad adaptativa. Así, en un estudio en el que se administró AHCC (3g/día) a individuos sanos durante un mes, se observó un incremento en los niveles de células dendríticas de estos individuos [347]. En estudio no se observaron cambios en la actividad de células NK.

En cuanto a los efectos del AHCC sobre la inmunidad adaptativa, se ha observado que induce la proliferación, la diferenciación y la estimulación de linfocitos T. Concretamente, en un estudio en voluntarios humanos sanos mayores de 50 años, se observó que el consumo de AHCC incrementaba la frecuencia de células T CD4+, CD8+ productoras de interferón  $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [348]. Otro estudio llevado a cabo en monocitos humanos indicó que el AHCC incrementa la diferenciación a células Th17 y Th1, induciendo consecuentemente la producción de IL17 e IFN $\gamma$ , mediante el incremento de la producción de IL1- $\beta$  en macrófagos [349].

Por otra parte, se han descrito también efectos sobre linfocitos B. De hecho, estudios recientes han mostrado que el AHCC puede mejorar la respuesta humoral tras la vacuna de la gripe tipo B [339].

Además, en el modelo de infección en animales por el virus del Nilo occidental, se describió que la suplementación con AHCC incrementaba los niveles séricos de anticuerpos IgG específicos frente a este virus [338].





### **III. OBJETIVOS**

### **III. OBJETIVOS**

En este trabajo de Tesis doctoral los objetivos específicos fueron:

- I. Caracterización del efecto antiinflamatorio a nivel intestinal del Active Hexose Correlated Compound (AHCC) y estudio de su posible acción como prebiótico en el modelo de colitis inducida por TNBS en ratas.
  
- II. Caracterización de las vías de señalización implicadas en el reconocimiento del AHCC y en su efecto inmunomodulador en células epiteliales del intestino y en macrófagos.
  
- III. Optimización de un método para la detreminación de las enzimas mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en la misma muestra de tejido.

## **IV. RESULTADOS**

## **CAPÍTULO I.**

*El Active Hexose Correlated Compound (AHCC) actúa como prebiótico y es antiinflamatorio en ratas con colitis inducida por TNBS.*

## **CAPÍTULO I**

### **El Active Hexose Correlated Compound actúa como prebiótico y es antiinflamatorio en ratas con colitis inducida por TNBS.**

*Abdelali Daddaoua, Enrique Martínez-Plata, Rocío López-Posadas, José María Vieites, Mercedes González, Pilar Requena, Antonio Zarzuelo, María Dolores Suárez, Fermín Sánchez de Medina, Olga Martínez-Agustín.*

El Active Hexose Correlated Compound (AHCC), es un producto obtenido del cultivo del micelio de varias especies de hongos de la familia Basidomicete, el cual contiene oligosacáridos. En éste trabajo hemos estudiado el efecto antiinflamatorio del AHCC en ratas, usando modelo de colitis generado por el ácido trinitrobenzilsulfónico (TNBS). Las ratas recibieron AHCC en dos dosis (100 o 500 mg/Kg y día), empezando dos días antes de la inducción de la colitis con TNBS y fueron sacrificadas 6 días después del tratamiento con TNBS. El estado de las ratas fue analizado por métodos morfológicos y bioquímicos. El efecto del AHCC sobre la microbiota del colon fue estudiado mediante el estudio del perfil bacteriano tras siembra de heces mediante técnicas de cultivo estándar. A nivel morfológico la administración del AHCC atenuó la inflamación colónica, mejorando la pérdida de peso, el daño macroscópico, la extensión de necrosis. el peso del colon, la relación peso /longitud del colon, la actividades mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina, la concentración de glutatión, la expresión de citocinas proinflamatorias y quimioquinas (IL-1 $\beta$ , antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), TNF- $\alpha$  y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) y de las mucinas 2-4, así como el factor trebol 3 (Tefoil Factor 3, TFF3. La magnitud del efecto antiinflamatorio fue similar a la sulfasalazina a dosis 200 mg/Kg. En el estudio de la microflora colónica, se observó en las ratas tratadas con AHCC un mayor recuento de bacterias aerobias y ácidas lácticas, así como un mayor número de bifidobacterias. Por el contrario, el recuento de Clostridios fue menor que en el grupo tratado con TNBS. Por todo ello, nuestros resultados indican que AHCC tiene efecto antiinflamatorio, y podría usarse como prebiótico en el diseño de preparados alimenticios para pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

*(J Nutr. 2007; 137(5):1222-8)*

## Active Hexose Correlated Compound Acts as a Prebiotic and Is Antiinflammatory in Rats with Hapten-Induced Colitis<sup>1,2</sup>

Abdelali Daddaoua,<sup>3</sup> Enrique Martínez-Plata,<sup>3</sup> Rocío López-Posadas,<sup>4</sup> José María Veites,<sup>3</sup> Mercedes González,<sup>4</sup> Pilar Requena,<sup>3</sup> Antonio Zarzuelo,<sup>4</sup> María Dolores Suárez,<sup>3</sup> Fermín Sánchez de Medina,<sup>4</sup> and Olga Martínez-Augustín<sup>3\*</sup>

<sup>3</sup>Departments of Biochemistry and Molecular Biology and <sup>4</sup>Pharmacology, University of Granada, Granada 18071, Spain

### Abstract

Active hexose correlated compound (AHCC) is a product prepared from the mycelium of edible *Basidiomycete* fungi that contains oligosaccharides. Here we have studied the antiinflammatory effect of AHCC in the trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model of colitis in rats. Rats received AHCC (100 or 500 mg/kg) daily starting 2 d before (pretreatment) colitis induction and were killed 6 d after the TNBS challenge. The status of the rats was assessed by morphological and biochemical methods. The effect of AHCC on the colonic microflora was also assessed by studying the bacteria profile in feces by standard culture techniques. AHCC administration attenuated colonic inflammation, improving rat weight, food intake, damage score, extension of necrosis, colonic weight, colonic weight-to-length ratio, myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities, glutathione concentration, and the expression of proinflammatory cytokines and chemokines (IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, TNF, and monocyte chemoattractant protein-1) and of mucins 2–4 and trefoil factor 3. The magnitude of the antiinflammatory effect of AHCC was similar to that of sulfasalazine (200 mg/kg). The study of colonic microflora indicated that rats treated with AHCC had higher aerobic and lactic acid bacteria counts as well as higher bifidobacteria counts, whereas clostridia were reduced when compared with the TNBS group. Therefore, our results indicate that AHCC is antiinflammatory and could be useful as a prebiotic to design functional foods for inflammatory bowel disease patients. *J. Nutr.* 137: 1222–1228, 2007.

### Introduction

Active hexose correlated compound (AHCC)<sup>5</sup> is a product prepared from the mycelium of edible *Basidiomycete* fungi that contains oligosaccharides (~74% of AHCC, ~20% being of the  $\alpha$ -1,4-glucan type), amino acids, lipids, and minerals (1). The acetylated forms of the  $\alpha$ -1,4-glucan type of oligosaccharides have low molecular mass (5 kDa) and are considered the main active ingredient of AHCC (2–4).

AHCC has been well tolerated both as a human nutritional supplement and as a therapeutic agent (1,5). Furthermore, several studies have proven that the oral administration of AHCC has a wide variety of therapeutic effects, including anticancer effects both in animal models and in clinical trials (2,3,6–8), prevention of the onset of diabetes induced by streptozotocin in animal models (9), prevention of liver injury produced by CCL<sub>4</sub> in mice (10), and improvement of the immune response (7,11,12). The anticancer activity of AHCC has been ascribed to its immunomodulatory and antioxidant properties (4,7,13).

Inflammatory bowel disease (IBD), which comprises ulcerative colitis and Crohn's disease, is characterized by the chronic and relapsing inflammation of the intestine, resulting in diarrhea, abdominal pain, and a variety of other symptoms. There are important differences with regard to pathophysiology and treatment between both IBD types. Namely, ulcerative colitis affects exclusively the large intestine at the mucosal level, whereas Crohn's disease is characterized by transmural inflammation and may involve any segment of the gastrointestinal tract. The importance of IBD as a health problem lies in its impact on the patient's quality of life and its substantial prevalence, which has increased in the last few years.

Although the etiology of IBD is currently unknown, it has become clear that the intestinal flora is determinant in the

<sup>1</sup> Supported by grants of the Instituto de Investigación Carlos III (PID61651 and PID61626). Pilar Requena and Rocío López-Posadas are funded by the Spanish Ministry of Science and Technology. This research group belongs to CIBEREHD.

<sup>2</sup> Author disclosures: A. Daddaoua, no conflicts of interest; E. Martínez-Plata, no conflicts of interest; R. López-Posadas, no conflicts of interest; J. M. Veites, no conflicts of interest; M. González, no conflicts of interest; P. Requena, no conflicts of interest; A. Zarzuelo, no conflicts of interest; M. D. Suárez, no conflicts of interest; F. Sánchez de Medina, no conflicts of interest; and O. Martínez-Augustín, no conflicts of interest.

<sup>5</sup> Abbreviations used: AHCC, active hexose correlated compound; AHCC100, experimental group that received 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> AHCC; AHCC500, experimental group that received 500 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> AHCC; AP, alkaline phosphatase; C, control group; IBD, inflammatory bowel disease; IL-1ra, IL-1 receptor antagonist; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MPO, myeloperoxidase; MUC, mucin; S2, experimental group that received sulfasalazine (100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>); T, TNBS group; TFF-3, trefoil factor-3; TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: omar@ugr.es.

development of the events that ultimately give rise to the relapses (14). Thus, IBD probably represents an uncontrolled and exacerbated response to luminal antigens that are innocuous for the normal population (15). Although IBD can often be successfully managed pharmacologically, the drugs used, such as corticoids, aminosalicilates, or azathioprine, have a plethora of serious adverse effects that limit their application. Hence, the search for new treatments with a low profile of adverse effects is much warranted (16). One such strategy involves the use of prebiotics and/or probiotics, with the objective of modulating the intestinal flora to promote the growth of host-friendly bacteria and inhibit the proliferation of potentially harmful microorganisms (15), although other mechanisms may be relevant in this regard (17).

Several studies have shown that oligosaccharides obtained from different sources (18,19) have an antiinflammatory effect in models of intestinal inflammation. Here, we present evidence of the colonic antiinflammatory effect of AHCC in a rat model of experimental intestinal inflammation induced by the hapten trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS).

## Materials and Methods

Except where indicated, all reagents and primers were obtained from Sigma. We purchased Taq polymerase from Amersham Biosciences. AHCC was provided by Amino Up Chemical.

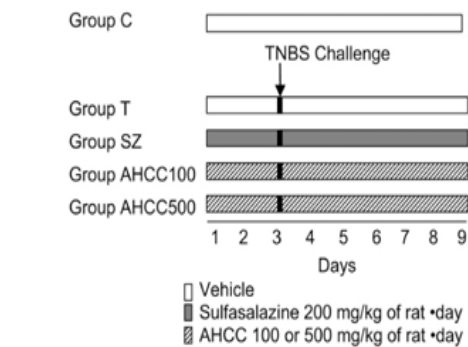
**Rats.** Female Wistar rats (200–250 g) obtained from the Laboratory Animal Service of the University of Granada were used, housed in macrolon cages, and maintained in our laboratory in air-conditioned animal quarters with a 12-h light-dark cycle. Rats were given free access to tap water and food. Diet composition (Panlab A04) was (wt:wt) 15.4% protein, 2.9% fat, 60% carbohydrates, 3.9% fiber, 5.3% minerals, and 12% moisture.

This study was carried out in accordance with the Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes of the European Union (86/609/EEC).

**Induction of colitis.** Colitis was induced by the method of Morris et al. (20) with minor modifications. Briefly, rats were fasted overnight and anesthetized with halothane. Under these conditions, rats were given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 mL of 50% ethanol (v:v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus. The mechanism of TNBS-induced colitis involves reaction of the hapten with host tissue proteins, generating a variety of new antigens in situ as well as the production of free radicals. Rats were kept in a head-down position for an additional 30 s and returned to their cage.

**Experimental design.** Rats were randomly assigned to 5 different groups ( $n = 6$ ). Four groups [(T), SZ, AHCC100, and AHCC500] (Fig. 1) received the TNBS challenge to induce colitis as described above, and 1 group [control (C)] was given 0.25 mL of PBS intrarectally. Groups SZ, AHCC100, and AHCC500 received sulfasalazine (200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) or 100 or 500 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> AHCC in 1% methylcellulose orally, starting 2 d before the TNBS challenge, while groups T and C received the vehicle. Rats were treated until 6 d after the TNBS challenge, when the inflammatory response most closely resembles the human condition (21). An esophageal catheter was used to deliver all treatments. We determined food intake, water intake, and body weight every day.

**Assessment of colonic damage.** Rats were killed by cervical dislocation and the entire colon was removed, placed on an ice-cold plate, cleaned of fat and mesentery, and blotted on filter paper. Each specimen was weighed and its length measured under a constant load (2 g). The large intestine was longitudinally opened and scored for visible damage on a 0–25 scale according to the following criteria: adhesions (0–3), obstruction (0–2), thickening (0–2), hyperemia (0–3), fibrosis (0–



**FIGURE 1** Experimental design. Groups T, SZ, AHCC100, and AHCC500 received the TNBS challenge to induce colitis and group C was given 0.25 mL of PBS intrarectally. Groups SZ, AHCC100, and AHCC500 received sulfasalazine (200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 100 or 500 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> AHCC in 1% (w:v) methylcellulose p.o., starting 2 d before the TNBS challenge, whereas groups T and C received the vehicle. Rats were treated until 6 d after the TNBS challenge.

3), necrosis (0–5), and scarring and deformation (0–7) (22). The colon was subsequently divided longitudinally in several pieces for biochemical determinations. One of these pieces was used to measure TNF production, as indicated below. The sample for total glutathione content determination was immediately weighed and frozen in 1 mL of 5% (w:v) trichloroacetic acid (see below). The other fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at –80°C until used.

To determine the production of TNF, the fragments were weighed and incubated with cell culture medium (DMEM supplemented with inactivated bovine fetal serum [10% (v:v)], glutamine (2 mmol/L), penicillin (100 kU/L), streptomycin (0.1 g/L), and amphotericin B (2.5 mg/L) at 37°C for 24 h. After centrifugation (7000 × g; 10 min), the supernatants were used to determine the concentration of TNF by ELISA (Biosource). Myeloperoxidase (MPO) activity was measured according to the technique described by Krawisz et al. (23), using 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in Tris (pH = 6.0) for tissue homogenization and *o*-dianisidine dihydrochloride (533 μmol/L) as chromogen. The results are expressed as MPO milliunits per milligram wet tissue. Total glutathione content was quantitated with a recycling assay using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid as chromogen and glutathione reductase to regenerate oxidized glutathione (24). Results were expressed as nanomoles per milligram wet tissue. Alkaline phosphatase (AP) activity was measured spectrophotometrically, using disodium nitrophenylphosphate (5.5 mmol/L) as substrate in 50 mL glycine buffer with 0.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (pH = 10.5) (25). Results are expressed as units per milligram protein.

**RT-PCR.** RT-PCR was used to examine the expression of mucins (MUC) 2, 3, and 4, trefoil factor 3 (TFF3), IL-1β, IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), TNF, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Total RNA was extracted with Trizol (Life Technologies). A total of 5 μg of RNA per sample was subjected to reverse transcription using the First-Strand cDNA Synthesis kit (Amersham Biosciences). PCR amplification was performed using 1 μL of cDNA for a final PCR volume of 25 μL. The expression of the ribosomal 18 S unit was routinely examined as a loading standard. Rat primers were as follows: MUC2 (sense 5'-GCT CAA TCT CAG AAG GCG ACA G-3'; antisense 5'-CCA GAT AAC AAT GAT GCC AGA GC-3'); MUC3 (sense 5'-CAC AAA GGC AAG AGT CCA GA-3'; antisense 5'-ACT GTC CTT GGT GCT GAA TG-3'); MUC4 (sense 5'-CGT ACT AGA GAA CTT GGA CAT G-3'; antisense 5'-GGT AGG AGA ACT TGT TCA TGG-3'); TFF3 (sense 5'-ATG GAG ACC AGA GCC TTC TG-3'; antisense 5'-ACA GCC TTG TGC TGA CTG TA-3'); IL-1β (sense 5'-AAT GAC CTG TTC TTT GAG GCT G-3'; antisense 5'-CGA GAT GCT GCT GTG AGA TTT GAA G-3'); IL-1ra (sense 5'-GAG TCA GCT GGC CAC CCT G-3'; antisense

Active hexose correlated compound and rat colitis 1223



5'-CAC TGC TTC CCG AAT GTC TGA C-3'); TNF (sense 5'-TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG-3'; antisense 5'-CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC-3'); MCP-1 (sense 5'-CAC TAT GCA GGT CTC TGT CAC G-3'; antisense 5'-CTG GTC ACT TCT ACA GAA GTG C-3'); ribosomal 18 S unit (sense 5'-CCA TTG GAG GGC AAG TCT GGT G-3'; antisense 5'-CGC CGG TCC AAG AAT TTC ACC-3'). The cycle numbers and hybridization temperatures for each PCR were as follows: 23 cycles and 56°C (for MUC2, MUC3, and TFF3); 27 cycles and 57°C (for MUC4, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, MCP-1, and TNF); 17 cycles and 60°C (for the ribosomal 18 S unit). To set up the PCR conditions, different amounts of colonic RNA from a pool of samples were amplified using different numbers of cycles (data not shown). After the PCR amplification, 5  $\mu$ L of each reaction was resolved in 2.5% (w:v) agarose gels. Bands were quantitated with NIH software (Scion Image).

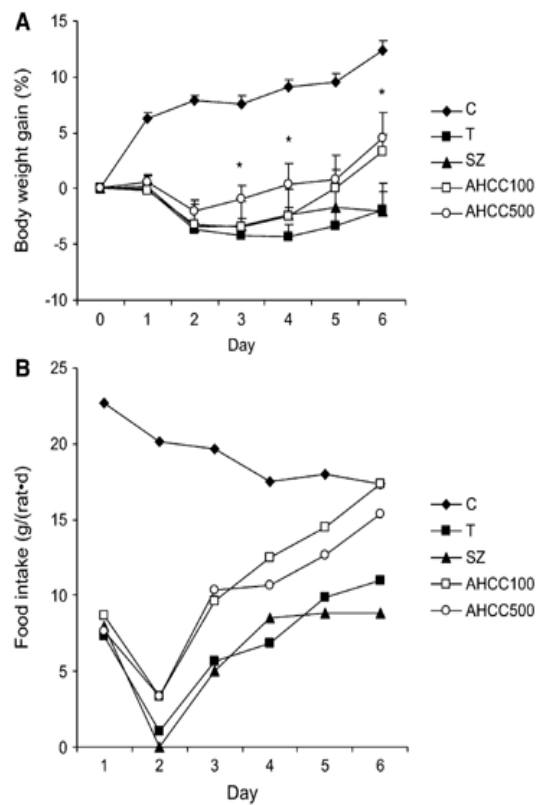
**Bacteriological analysis of feces.** A sample of feces was collected the day rats were killed and stored at -80°C until analysis. A total of 0.1 g of fecal material was weighed and homogenized with 0.9 mL PBS buffer containing 0.05% cysteine. A dilution series (10<sup>-1</sup>-10<sup>-6</sup>) was made and 10- $\mu$ L aliquots of the dilutions were plated on the different culture media: agar-blood (aerobes), MacConkey (enterobacteria), Wilkinson (anaerobes), Rogosa (lactic acid bacteria), Beerens (bifidobacteria), and reinforced clostridium agar medium (clostridia). The plates were subsequently incubated aerobically or anaerobically at 37°C for 3 d and all the colonies appearing on the appropriate dilution were counted. The results were expressed as the logarithm of the number of colony forming units.

**Statistical analysis.** The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences in means were tested for significance by 1-way ANOVA and a posteriori Fisher's least significance test except for bacterial counts that were analyzed by Kruskal-Wallis ANOVA. All analyses were the SigmaStat program (Jandel). Significance was set at  $P < 0.05$ .

**Results**

As expected, colitic rats suffered anorexia and loss of body weight (Fig. 2). In addition, the administration of TNBS resulted in an increased damage score as a consequence of the observed mucosal erosion, epithelial necrosis, submucosal fibrosis, and edema. This was further reflected by an increase in colon weight and the colon weight-to-length ratio (Table 1). Colon pretreatment of rats with the higher dose of AHCC resulted in less pronounced anorexia and significantly increased relative body weight gain after the TNBS challenge (Fig. 2). At the macroscopical level, the administration of AHCC produced a decrease in the extent of necrosis, damage score, colon weight, and colon weight-to-length ratio (Table 1). Furthermore, the AHCC100 and AHCC500 groups were similar to the SZ group (Fig. 2; Table 1). This group of rats pretreated with SZ (200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), an antiinflammatory drug, was included in the study as a positive control to assess the real therapeutic effect of AHCC.

The alterations induced by inflammation in the T group were reflected in the biochemical parameters assayed, with increases in the proinflammatory cytokines and chemokines IL-1 $\beta$ , IL-1ra, MCP-1, and TNE, as well as in MPO (a marker of neutrophilic



**FIGURE 2** Relative body weight gain (A) and food intake (B) after the TNBS challenge in rats. (A) Weight gains are relative to the day of TNBS challenge. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . \*Different from T,  $P < 0.05$ . All groups differed from C,  $P < 0.05$  (not shown). (B) Means of 6 rats per group and cage are shown.

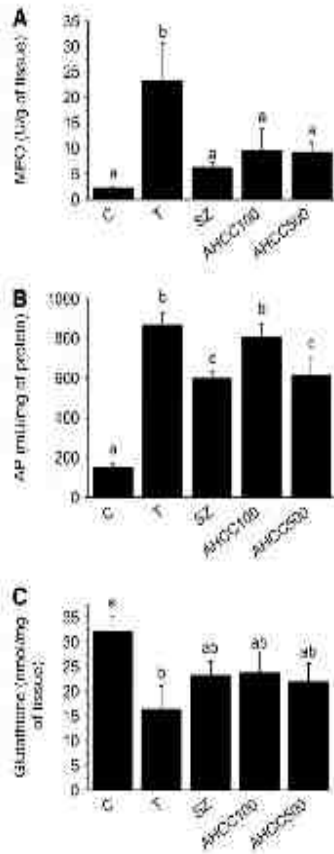
infiltration) and AP [a marker of inflammation (25)] activities (Figs. 3 and 4). Furthermore, the levels of glutathione, an endogenous antioxidant agent, were reduced in colitic rats (Fig. 4C). The administration of AHCC greatly affected the biochemical variables studied, indicating a reduction in the inflammatory status. Thus, as assayed by RT-PCR (Fig. 4), the administration of AHCC, independently of the dose studied, produced a dramatic reduction in the expression of IL-1 $\beta$ , IL-1ra, and TNF, which were normalized to control levels, as well as of MCP-1 (Fig. 4). These data are further supported by the decrease in the production of TNF by colon samples incubated in cell culture medium for 24 h (Fig. 5).

MPO activity also diminished with the administration of AHCC at both doses, whereas AP values were only slightly reduced and only at the highest dose assayed. Glutathione levels

**TABLE 1** Macroscopic indices of rat colonic inflammation in the different experimental groups<sup>1</sup>

	C	T	SZ	AHCC100	AHCC500
Colon weight, g	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
Colon weight/length, mg/cm	56.8 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	163.5 $\pm$ 9.4 <sup>a</sup>	127.3 $\pm$ 12.9 <sup>b</sup>	116.5 $\pm$ 10.7 <sup>b</sup>	119.6 $\pm$ 12.7 <sup>b</sup>
Extent of necrosis, cm	—	4.3 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	2.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	2.6 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
Damage score	—	10.8 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	6.2 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	7.3 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  for all groups. Means for a row without a common letter differ,  $P < 0.05$ .



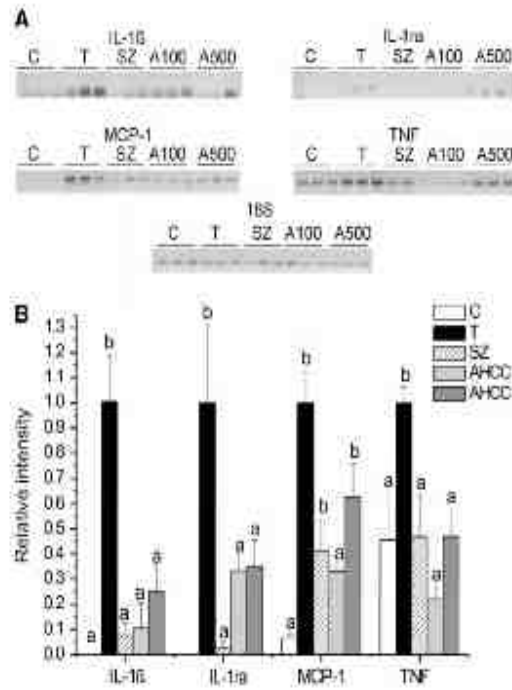
**FIGURE 3** Effect of AHCC pretreatment of rats with TNBS colitis on the colonic activities of MPO (A) and alkaline phosphatase (B) as well as on the colonic glutathione concentration (C). Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . Means for a variable without a common letter differ,  $P < 0.05$ .

for all treated groups were between those of the C and T groups. In all cases, the effect of AHCC was comparable to that of sulfasalazine. To assess the effect of the treatment with AHCC on mucosal barrier defense, MUC and TFF3 expression was measured by RT-PCR. The induction of colitis produced an increment in the expression of MUC2-4 and TFF3 (Fig. 6). Pretreatment of rats with AHCC resulted in a normalization of these values, comparable again to that of sulfasalazine (Fig. 6).

To further investigate the mechanism of action of AHCC in the intestinal inflammation, a series of bacterial cultures were performed to determine its effect on fecal microbiota (Table 2). The administration of TNBS resulted in alterations in the microflora profile, decreasing both aerobic bacteria and lactic acid bacteria and increasing clostridia. AHCC normalized aerobic, clostridial, and lactic acid bacterial counts. In addition, AHCC increased the count of bifidobacteria. In contrast, sulfasalazine had no effect on aerobes or lactic acid bacteria, although its impact on bifidobacteria was more robust than that of AHCC.

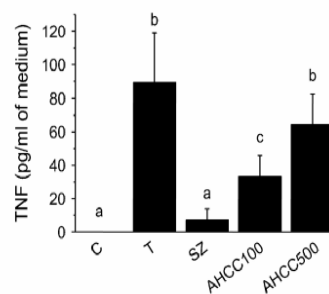
## Discussion

*Basidiomycete* mushrooms are usual components of the diet and AHCC is a product extracted from a myceloid of these



**FIGURE 4** Effect of AHCC pretreatment on the colonic expression of IL-1 $\beta$ , IL-1ra, MCP-1, and TNF in rats with TNBS colitis. Expression levels were determined by RT-PCR. Representative gels (A) and densitometric analysis using 18 S RNA as control (B) are shown. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . Means for a variable without a common letter differ,  $P < 0.05$ . AHCC100; AHCC100; A500; AHCC500.

mushrooms. AHCC is composed mainly of oligosaccharides (~74%) and is enriched in low molecular weight acetylated  $\alpha$ -glucans. The biological effects of AHCC observed so far have been attributed to this glycan fraction (2,3,7). Because oligosaccharides from different sources are useful in the treatment of intestinal inflammation in several animal models (18,19), we hypothesized that AHCC could have therapeutic potential in IBD. Inflammation propitiates an increase in intestinal permeability, which may grant access to bacteria and/or bacterial products to the intestinal mucosal milieu, thus inducing or perpetuating an inflammatory immune response. Oligosaccharides may reduce inflammation by promoting the growth of the



**FIGURE 5** Effect of AHCC pretreatment on the production of TNF in colon fragments from rats with TNBS colitis. Fragments were weighed and incubated with cell culture medium for 24 h, then TNF was measured in the culture medium. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . Means for a variable without a common letter differ,  $P < 0.05$ .



both IL-1 $\beta$  and IL-1ra. On the other hand, the importance of TNF in IBD is illustrated by the fact that anti-TNF antibodies are widely used to treat ulcerative colitis and Crohn's disease. (37). Interestingly, AHCC administration reduced the mRNA levels of IL-1 $\beta$ , IL-1ra, and TNF, an effect comparable to that of sulfasalazine. However, the mechanism of this effect is probably different in both instances (see below).

Because prebiotics reportedly modulate MUC expression in the intestine (18,38), we assessed the MUC expression profile, as well as TFF3, by RT-PCR. The latter is a peptide implicated in the maintenance and healing of the intestinal mucosa, and MUC are a family of highly glycosylated proteins that, together with inorganic salts and water, form the mucus that protects epithelial surfaces, including the gastrointestinal tract. Colitis induction produced an increase in both TFF3 and MUC expression, indicating an epithelial reaction to heal mucosal wounds (39,40). The treatment with AHCC (and sulfasalazine) normalized these values, consistent with the less severe mucosal damage observed in these groups.

Finally, we explored the effect of AHCC on intestinal microflora by performing a bacteriological analysis of feces. It is generally accepted that intestinal microflora plays an important role in the pathogenesis of the intestinal inflammation and of IBD in particular. In fact, the mucosal inflammation characteristic of IBD is the culmination of a cascade of events and processes that promote barrier disruption and increase the absorption of luminal antigens from food and microorganisms, and bacterial products that stimulate different types of cells in the lamina propria to produce and release different proinflammatory mediators. Therefore, mucosal inflammation can be considered a self-perpetuating process in which disruption of the epithelial layer and absorption of luminal antigens play a central role. On the other hand, as stated above, prebiotics have been reported to promote the growth of host-friendly bacteria, reducing the growth of potentially harmful microorganisms. Our results indicate that the administration of TNBS decreased fecal aerobes, particularly lactic acid bacteria, and increased the counts of clostridium compared with the control group. The mechanism whereby TNBS modulates colonic flora is unknown and deserves further investigation. AHCC was able to normalize the microflora profile, increasing the counts for aerobic bacteria, lactic acid bacteria, and bifidobacteria while decreasing those of clostridium compared with the TNBS group. In contrast, sulfasalazine treatment only affected bifidobacteria and clostridia. Although sulfasalazine has some flora-modulating activity, this is not considered an important mechanism of action for this drug (41). Hence, the main determinants of AHCC antiinflammatory activity are likely to be the actions on aerobes and lactic acid bacteria. However, alternative mechanisms for AHCC unrelated to their prebiotic characteristics cannot be excluded based on the present data.

We tested 2 different doses of AHCC (100 and 500 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), which are in the high range for pharmacological products but in the low to midrange for nutritional/prebiotic products. Both doses were largely comparable in terms of anti-inflammatory efficacy. Although it may be worth testing lower doses of AHCC, the absence of apparent toxic effects and the therapeutic equivalence to sulfasalazine in this preclinical model makes it unlikely that the overall therapeutic value will be improved.

In conclusion, AHCC is antiinflammatory when administered as a pretreatment in the TNBS model of rat colitis, a widely used preclinical model of IBD. Its mechanism of action could be related to its ability to promote the presence of beneficial colonic

microflora (aerobic and lactic acid bacteria and bifidobacteria) while reducing clostridia. Therefore, this compound may be a valuable addition to current therapeutic alternatives to treat IBD. Further studies are warranted to validate this approach and to explore other possible mechanisms of action.

#### Acknowledgment

The authors thank Amino Up Chemical (Sapporo, Japan) for kindly providing us with the AHCC.

#### Literature Cited

- Kidd PM. The use of mushroom glucan and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev*. 2005;5:4-27.
- Matsui Y, Uhara J, Satoi S, Kaibori M, Yamada H, Kitade H, Imamura A, Takai S, Kawaguchi Y, et al. Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J Hepatol*. 2002;37:147-50.
- Matsushita K, Kuramitsu Y, Ohiro Y, Obara M, Kobayashi M, Li YQ, Hosokawa M. Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly. *Anticancer Drugs*. 1998;9:343-50.
- Ye SF, Ichimura K, Wakame K, Ohe M. Suppressive effects of active hexose correlated compound on the increased activity of hepatic and renal ornithine decarboxylase induced by oxidative stress. *Life Sci*. 2003;74:593-602.
- Ghoneum M, Wimbley M, Salem F, McKlain A, Attallah N, Gill G. Immunomodulatory and anticancer effects of active hemicellulose compound (AHCC). *Int J Immunother*. 1995;11:23-8.
- Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycete mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol*. 1999;19:65-9.
- Gao Y, Zhang D, Sun B, Fujii H, Kosuna K, Yin Z. Active hexose correlated compound enhances tumor surveillance through regulating both innate and adaptive immune responses. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;55:1258-66.
- Bass NM. It could have been something they ate: functional food and the treatment of liver cancer. *J Hepatol*. 2002;37:147-50.
- Wakame A. Protective effects of active hexose correlated compound (AHCC) on the onset of diabetes induced by streptozotocin in the rat. *Biomed Res*. 1999;20:145-52.
- Sun B, Wakame K, Mukoda T, Toyoshima A, Kanazawa T, Kosuna K. Preventive effects of AHCC on carbon tetrachloride induced liver injury in mice. *Nat Med*. 1997;5:310-5.
- Aviles H, Belay T, Vance M, Sun B, Sonnefeld G. Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *J Appl Physiol*. 2004;97:1437-44.
- Aviles H, Belay T, Fountain K, Vance M, Sun B, Sonnenfeld G. Active hexose correlated compound enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *J Appl Physiol*. 2003;95:491-6.
- Ye SF, Wakame K, Ichimura K, Matsuzaki S. Amelioration by active hexose correlated compound of endocrine disturbances induced by oxidative stress in the rat. *Endocr Regul*. 2004;38:7-13.
- Mahida YR, Rolfe VE. Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:331-41.
- Thompson-Chagoyan OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr*. 2005;24:339-52.
- Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000;118:S68-82.
- Obermeier F, Strauch UG, Dunger N, Grunwald N, Rath HC, Herfarth HH, Scholmerich J, Falk W. In vivo CpG DNA/TLR9 interaction induces regulatory properties in CD4+CD62L+T-cells which prevent intestinal inflammation in the SCID-transfer model of colitis. *Gut*. 2005;54:1428-36.
- Daddaoua A, Puerta V, Requena P, Martinez-Ferez A, Guadix E, Sanchez de Medina F, Zarzuelo A, Suarez MD, Boza JJ, et al. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr*. 2006;136:672-6.

19. Hoentjen F, Welling GW, Harmsen HJ, Zhang X, Snart J, Tannock GW, Lien K, Churchill TA, Lupicki M, et al. Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:977-85.
20. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 1989;96:795-803.
21. Palmen MJ, Dieleman LA, van der Ende MB, Uyterlinde A, Pena AS, Meuwissen SG, van Rees EP. Non-lymphoid and lymphoid cells in acute, chronic and relapsing experimental colitis. *Clin Exp Immunol.* 1995;99:226-32.
22. Rivera E, Flores I, Rivera E, Appleyard CB. Molecular profiling of a rat model of colitis: validation of known inflammatory genes and identification of novel disease-associated targets. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:950-66.
23. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984;87:1344-50.
24. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981;77:373-82.
25. Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Ballester I, Nieto A, Galvez J, Zarzuelo A. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:2317-26.
26. Blaut M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr.* 2002;41 Suppl 1:111-6.
27. Knol J, Boehm G, Lidestri M, Negretti F, Jelinek J, Agosti M, Stahl B, Marini A, Mosca F. Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed preterm infants. *Acta Paediatr.* 2005; Suppl 94:31-3.
28. Bakker-Zierikzee AM, Alles MS, Knol J, Kok FJ, Tolboom JJ, Bindels JG. Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life. *Br J Nutr.* 2005; 94:783-90.
29. Dinoto A, Suksomcheep A, Ishizuka S, Kimura H, Hanada S, Kamagata Y, Asano K, Tomita F, Yokota A. Modulation of rat cecal microbiota by administration of raffinose and encapsulated *Bifidobacterium breve*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:784-92.
30. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS. Human milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr.* 2005;135:1304-7.
31. Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. Prebiotic galacto-oligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infect Immun.* 2006;74:6920-8.
32. Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, Capretti R, Orazio G. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatr Res.* 2006;59:377-82.
33. McHugh KJ, Collins SM, Weingarten HP. Central interleukin-1 receptors contribute to suppression of feeding after acute colitis in the rat. *Am J Physiol.* 1994;266:R1659-63.
34. El-Haj T, Poole S, Farthing MJ, Ballinger AB. Anorexia in a rat model of colitis: interaction of interleukin-1 and hypothalamic serotonin. *Brain Res.* 2002;927:1-7.
35. McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, McCormick PA, Sheahan K, Baird AW. Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res.* 2001;50:491-5.
36. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 1993;54:167-227. 73.
37. D'Haens G, Daperno M. Advances in biologic therapy for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2006;8:506-12.
38. Schley PD, Field CJ. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr.* 2002;87 Suppl 2:S221-30.
39. Podolsky DK. Mechanisms of regulatory peptide action in the gastrointestinal tract: trefoil peptides. *J Gastroenterol.* 2000;35 Suppl 12:69-74.
40. Buisine MP, Desreumaux P, Leteurtre E, Copin MC, Colombel JF, Porchet N, Aubert JP. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut.* 2001;49:544-51.
41. Hartley MG, Hudson MJ, Swarbrick ET, Grace RH, Gent AE, Hellier MD. Sulphasalazine treatment and the colorectal mucosa-associated flora in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996;10:157-63.

1228 Daddaoua et al.

## **CAPÍTULO II**

*El suplemento nutricional Active Hexose Correlated Compound (AHCC) posee acciones inmunomoduladoras directas sobre las células epiteliales intestinales y macrófagos que implican TLR/MyD88 y la activación de la vía NF-kB/MAPK.*

## **CAPÍTULO II**

### **El suplemento nutricional Active Hexose Correlated Compound (AHCC) posee acciones inmunomoduladoras directas sobre las células epiteliales intestinales y macrófagos que implican TLR/MyD88 y la activación de la vía NF- $\kappa$ B/MAPK.**

*Abdelali Daddaoua, Enrique Martínez-Plata, Mercedes Ortega-González, Borja Ocón, Carlos J. Aranda, Antonio Zarzuelo, María D. Suárez, Fermín Sánchez de Medina, Olga Martínez-Augustín.*

Active Hexose Correlated compound (AHCC) es un suplemento nutricional inmunoestimulante. Hasta la fecha, los efectos y los mecanismos de acción de AHCC sobre las células epiteliales intestinales o monocitos han sido pobremente descritos. Con el fin de estudiar estos efectos y mecanismos de acción, se adicionó AHCC al medio de cultivo de células epiteliales intestinales (células IEC-18 y HT-29) y de monocitos (células THP-1) y se determinaron, mediante ELISA, los niveles de secreción de citocinas proinflamatorias. Con el fin de caracterizar las vías de transducción de señal implicadas se utilizaron inhibidores de las vías de NF $\kappa$ B y de MAPKs. En células IEC-18 los receptores TLR4 y MyD88 fueron silenciados utilizando shRNA. Los resultados indicaron que la suplementación con AHCC induce la secreción de Gro $\alpha$  y MCP-1 en células IEC-18, la secreción de IL-8 en células HT-29. Estos efectos dependen mayoritariamente de la activación de la vía de traducción de señal de NF $\kappa$ B, y parcialmente de la activación de la vía de las MAPKs con la implicación de MyD88 y TLR4. En las células THP-1, el AHCC estimuló la secreción de IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La inducción de la secreción de IL-8 dependió de la activación de JNK y NF $\kappa$ B. Por lo tanto, AHCC ejerce efectos inmunoestimulantes en las células epiteliales intestinales y monocitos implicando la activación del complejo TLR4/MyD88 y las vías de traducción de señal NF $\kappa$ B/MAPK.

*(Food Chem. 2013; 136 (3-4):1288-95)*

# The nutritional supplement Active Hexose Correlated Compound (AHCC) has direct immunomodulatory actions on intestinal epithelial cells and macrophages involving TLR/MyD88 and NF- $\kappa$ B/MAPK activation

Abdelali Daddaoua<sup>a</sup>, Enrique Martínez-Plata<sup>b</sup>, Mercedes Ortega-González<sup>c</sup>, Borja Ocón<sup>d</sup>, Carlos J. Aranda<sup>c</sup>, Antonio Zarzuelo<sup>d</sup>, María D. Suárez<sup>c</sup>, Fermín Sánchez de Medina<sup>d</sup>, Olga Martínez-Augustín<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Environmental Protection, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain

<sup>b</sup>Pharmacy Department, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain

<sup>c</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology II, CIBERehd, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

<sup>d</sup>Department of Pharmacology, CIBERehd, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 29 May 2012

Received in revised form 31 July 2012

Accepted 5 September 2012

Available online 23 September 2012

### Keywords:

AHCC

Enterocyte

Macrophage immunomodulatory

NF $\kappa$ B

TLR4

## ABSTRACT

Active Hexose Correlated Compound (AHCC) is an immunostimulatory nutritional supplement. AHCC effects and mechanism of action on intestinal epithelial cells or monocytes are poorly described. AHCC was added to the culture medium of intestinal epithelial cells (IEC18 and HT29 cells) and monocytes (THP-1 cells) and assessed the secretion of proinflammatory cytokines by ELISA. Inhibitors of NF $\kappa$ B and MAPKs were used to study signal transduction pathways while TLR4 and MyD88 were silenced in IEC18 cells using shRNA. It was found that AHCC induced GRO $\alpha$  and MCP1 secretion in IEC18 and IL-8 in HT29 cells. These effects depended on NF $\kappa$ B activation, and partly on MAPKs activation and on the presence of MyD88 and TLR4. In THP-1 cells AHCC evoked IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion. The induction of IL-8 depended on JNK and NF $\kappa$ B activation. Therefore, AHCC exerts immunostimulatory effects on intestinal epithelial cells and monocytes involving TLR4/MyD88 and NF $\kappa$ B/MAPK signal transduction pathways.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Active Hexose Correlated Compound (AHCC) is a nutritional supplement used in Japan and other Asian countries, as well as in the United States, as a dietary supplement to boost immune function (Matsushita et al., 1998; Yagita, Maruyama, Wakasugi, & Sukegawa, 2002). It is a mixture of polysaccharides, amino acids and lipids enriched in  $\alpha$ -1,4-linked glucans (Kidd, 2000; Matsui et al., 2002; Matsushita et al., 1998) and it is derived from the mycelia of species of Basidiomycetes mushrooms: Shintake (*Lentinus edodes*) and Shimeji (*Lyophyllum shimeji*). AHCC has been the

subject of multiple *in vitro*, *in vivo* and clinical studies in the last few decades (Aviles, Belay, Vance, Sun, & Sonnenfeld, 2004; Daddaoua et al., 2007; Gao et al., 2006; Turner & Chaudhary, 2009; Ye, Wakame, Ichimura, & Matsuzaki, 2004; Yin, Fujii, & Walshe, 2010). Studies in mouse models have shown that AHCC stimulates the immune system modulating the response against pathogens and increasing the survival following infections in mice (Ritz, 2008). These studies include a variety of infectious agents like influenza, *Pseudomonas aeruginosa* or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Ritz, 2008). An intestinal anti-inflammatory effect of AHCC dependent probably on its prebiotic effect has also been described in rats (Daddaoua et al., 2007). AHCC has been used widely in immunocompromised patients, especially those with cancer, in order to hasten patient recovery from antineoplastic therapy (Kidd, 2000; Matsui et al., 2002; Matsushita et al., 1998; Shah et al., 2011; Sumiyoshi et al., 2010; Turner & Chaudhary, 2009). Recent research indicates that AHCC enhances the immune response by multiple mechanisms, including augmented macrophage and natural killer cell proliferation (Matsushita et al., 1998; Nishioka, Akao, & Wakame, 2009; Ritz, Nogusa, Ackerman, & Gardner, 2006) and a higher production of various cytokines by macrophages and T

**Abbreviations:** AHCC, Active Hexose Correlated Compound; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GRO $\alpha$ , growth regulated oncogene  $\alpha$ ; IL, interleukin; IECs, intestinal epithelial cells; IRAK, IL-1 receptor-associated kinase; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, mitogen activated protein kinase; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; NF $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; TLR, Toll-like receptor; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ ; TRAF6, tumour necrosis factor receptor associated factor 6.

\* Corresponding author. Address: Department of Biochemistry and Molecular Biology II, CIBERehd, School of Pharmacy, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958 241305; fax: +34 958 248960.

E-mail address: [omartine@ugr.es](mailto:omartine@ugr.es) (O. Martínez-Augustín).

0308-8146/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.039>



lymphocytes (interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin (IL)-8, IL-1 $\beta$ , tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ , IL-2 and IL-12) (Yin et al., 2010).

Intestinal mucosal immunity is thought to be modulated by cytokine release from intestinal epithelial cells, but it is unclear how this crosstalk actually works, especially in relation to the influence of luminal factors, including nutrients and various dietary compounds. Moreover, luminal bacteria are considered to play a pivotal role in this regard, and the microbiota clearly influences intestinal epithelial cell (IEC) gene expression. In IECs the nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) is a key player in maintaining intestinal barrier integrity since its stimulation is important for defensin production (Voss et al., 2006). Upon activation by various stimuli, NF $\kappa$ B transcriptionally regulates many cellular genes involved in early inflammatory responses, including cytokines, suggesting a possible role in inflammatory bowel disease (IBD) pathogenesis. However, this activation may be also important to contain effectively the luminal microorganisms and prevent bacterial translocation. Thus the mucosal immune system acts as a double edged sword in the interphase between the lumen and the internal milieu.

Colonic bacteria are probably handled in the intestinal mucosa to a great extent by innate immunity mechanisms, which involve ligand by bacterial products of receptors devoted to the recognition of microbe-associated molecular patterns. These include the Toll-like receptors (TLRs). One of the TLRs that has received most attention is TLR4. *In vitro*, monocyte stimulation with the TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS) generates a significant change of gene expression (Frost, Nystrom, & Lang, 2002; Nau et al., 2002; Shoham, Huang, Chen, Golenbock, & Levitz, 2001), including the production of chemokines and cytokines. After recognition of microbial ligands, TLR signalling is initiated by binding of the adapter molecule MyD88 to the cytoplasmic Toll/interleukin-1 receptor (IL-1R) domain present in all TLRs. Recruitment of IL-1R-associated kinases (IRAK4, IRAK1 and tumour necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6)) results in activation of the mitogen activated protein kinases (MAPK) and NF $\kappa$ B pathways (Akira & Takeda, 2004).

The effects of AHCC on intestinal epithelial cells and monocytes/macrophages have been poorly studied. Some reports indicate immune enhancing effects on macrophages, but the molecular mechanism of action involved has been not assessed. Both intestinal epithelial cells and monocytes/macrophages are involved in the intestinal innate immune response. The study of the effects and mechanism of action of AHCC on these cell types would contribute to support its use as a nutritional supplement. This study aimed to determine the impact of AHCC on IEC (IEC18 and HT29 cells) and monocyte (THP-1) activation. The results show that AHCC has *in vitro* immunoenhancing effects stimulating the secretion of cytokines (growth regulated oncogene  $\alpha$  (GRO $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$ ) in cells, acting not only on the NF $\kappa$ B pathway but also by combining several inflammatory response pathways.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Except were indicated culture media and reagents were purchased from Sigma (Barcelona, Spain).

### 2.2. Cell culture and treatment

The following cell lines were used in this work: IEC18 rat intestinal epithelial cells (ECACC 88011801), HT-29 human intestinal epithelial cells (ECACC 91072201) and THP-1 human monocytic cells (ECACC 88081201). The cells were cultured in DMEM

(25 mM glucose) and RPMI-1640 medium, respectively, supplemented with heat-inactivated foetal bovine serum (10% v/v), 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin and 2 mM glutamine.

### 2.3. AHCC preparation

AHCC was provided by Amino Up Chemical (Sapporo, Japan). The AHCC manufacturing process has been described elsewhere (Miura, Kitadate, Nishioka, & Wakame, 2010). Commercial AHCC was freshly prepared by dissolving the original powder in complete DMEM at a final concentration of 5 mg/ml. After 10 min of sonication to ensure total dissolution, it was passed through 0.22  $\mu$ m filters and used immediately.

### 2.4. Effect of AHCC on cytokine secretion

Cytokine secretion (GRO $\alpha$  and MCP-1 for IEC18 cells, IL-8 for HT29 cells and IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8 for THP-1 cells) was measured in the 24 h supernatant of cells treated with AHCC (0.05, 0.5 and 5 mg/ml). In some cases, specific pathway inhibitors were added prior to AHCC treatment (see below). Cytokines were quantitated by ELISA (Biosource Europe, Nivelles, Belgium and BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), following the protocols recommended by the manufacturers.

### 2.5. Characterisation of the signal transduction pathways using the NF $\kappa$ B and MAPK inhibitors

The cells were treated as above using the concentration of 5 mg/ml of AHCC, after the addition of specific inhibitors, including Bay 11-7082 (I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation), PD98059 (ERK1/2 MAPK), SB203580 (p38 MAPK), SP600152 (JNK MAPK) and wortmannin (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K). These inhibitors of intracellular signalling were added to the culture 60 min before the addition of 5 mg/ml of AHCC to cells. All inhibitors were used at a concentration of 10  $\mu$ M except wortmannin, which was used at 1  $\mu$ M.

### 2.6. Western blot

For Western blot experiments IEC18, HT-29 and THP-1 cells were cultured with AHCC for different periods of time (0, 15, 30, 60, 90 min, 3, 6 and 24 h), then the cells were collected and processed as described. Briefly, the samples were homogenised in lysis buffer (0.1% w/v SDS, 0.1% w/v sodium deoxycholate, 1% v/v Triton X-100 in PBS) with protease inhibitor cocktail 1:100 (v/v). Then homogenates were sonicated and centrifuged at 7000g for 5 min at 4 °C. Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid assay (Smith et al., 1985). Samples were boiled for 5 min in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE, electroblotted to activated PVDF membranes (Millipore, Madrid, Spain), and probed with the corresponding antibodies. The bands were detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer, Waltham, MA) and quantitated with NIH software (Scion Image). The composition of the Laemmli buffer (5 $\times$ ) was: 312 nM SDS, 50% v/v glycerol, 1% v/v 2-mercaptoethanol, 22.5 mM EDTA trisodium salt, 220 mM Tris and traces of bromphenol blue (pH = 6.8). The primary antibodies used were from Cell Signalling (Danvers, MA) except the JLA20 antibody against  $\alpha$ -actin, which was obtained from the Development Studies Hybridoma Bank, developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences.

2.7. Gene silencing

IEC18 cells were transfected in some experiments with shRNA specific for MyD88 and TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, Houston, TX) for gene knockdown, following the manufacturer's instructions. Briefly, IEC18 cells were plated in 96 well plates and grown for 24 h until 50% of confluence. Before infection, IEC18 medium was supplemented with penicillin (100 mg/ml) and cells were incubated for 24 h. Control, MyD88 and TLR4 shRNA silencing experiments were separately performed with polyplexes (1 µg/ml) for 24 h, added to the culture medium and incubated overnight. On the third day, fresh medium was substituted for penicillin free, penicillin containing medium and the cells were cultured until 72 h post-infection. IEC18 cells were stimulated with *Salmonella* (10<sup>7</sup> CFU) for 24 h, and treated with a range of 0.1–10 µg/ml of polyplexes dihydrochloride.

2.8. Statistical analysis

All results are expressed as mean ± SEM. Differences among means were tested for statistical significance by one-way ANOVA and a post-hoc least significant difference presented (p < 0.05). All analyses were carried out with the SigmaStat 9.0 program (Systat, San Jose, CA). Differences were considered significant at p < 0.05.

3. Results

3.1. AHCC induces cytokine secretion in IEC18 in a concentration dependent fashion

The effect of AHCC on IEC18 was tested by examining the production of GRO $\alpha$  and MCP-1 by the cells in response to the cells to IEC18 grown in suspension in standard culture conditions. AHCC was added at three different concentrations (0.05–0.5 and 5 mg/ml) and cytokine levels were measured after 24 h. It has induced IEC18 secreted a significant stimulatory effect (Fig. 1A).

First, it was aimed to confirm the stimulatory effect of AHCC on human IECs, namely IEC18. The data shown in Fig. 1A in IEC18 that IL-8 (considered the human orthologue of rodent GRO $\alpha$ ) was induced in a concentration dependent fashion in these cells. The observed effect at 5 mg/ml was maximal and the potency of the effect was similar to that observed in IEC18 cells.

3.2. AHCC evoked cytokine secretion in IEC18 cells depends on Nf $\kappa$ B, PI3K and p38 MAPK

It was aimed to identify the signal transduction pathways involved in cytokine induction by AHCC using a pharmacological approach. As shown in Fig. 2A, the NF $\kappa$ B inhibitor Bay11-7082 completely obliterated GRO $\alpha$  and MCP-1 secretion in IEC18 treated IEC18 cells, suggesting a determining role of NF $\kappa$ B transcription factor. In addition, there was a maximal inhibitory effect of the PI3K blocker wortmannin on GRO $\alpha$  (Fig. 2B, p < 0.05), but not MCP-1. While the block of MAPK pathways (Fig. 2B) a significant involvement of the p38 MAPK is suggested by the marked suppression of the AHCC response obtained with the specific inhibitor SB203580. The specific JNK inhibitor SP600125 had a weak but significant effect on GRO $\alpha$  secretion but appeared to fully prevent MCP-1 release. There was no significant change with the use of PD98059, an ERK1/2 blocker.

3.3. AHCC induces cytokine secretion in IEC18 cells via MyD88 and TLR4

In order to test the possible involvement of MyD88 and TLR4 in AHCC effects in IEC18 cells, the respective gene expression was

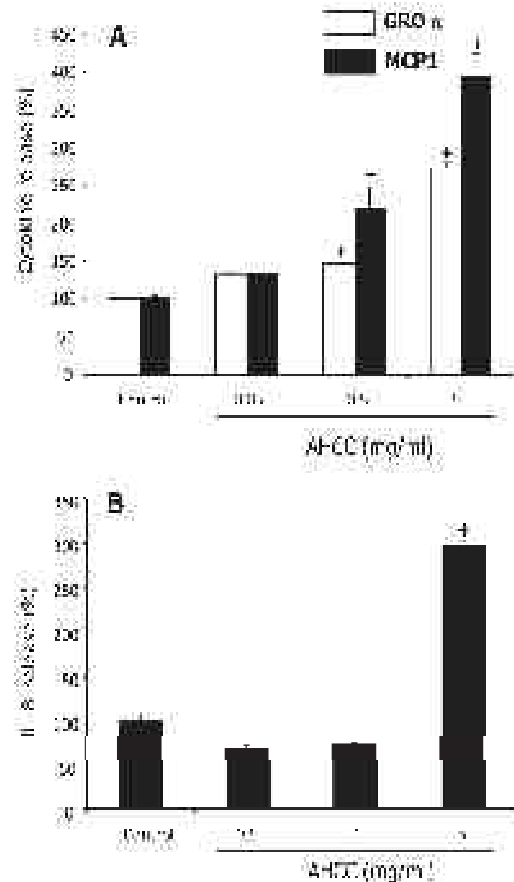


Fig. 1. Effect of AHCC on cytokine secretion in IEC18. (A) Effect on the secretion of GRO $\alpha$  and MCP-1 by IEC18 cells. (B) Effect on IL-8 secretion by IEC18 cells. Different concentrations of AHCC were added to the culture medium and cytokine concentration in the culture medium was measured by ELISA after a 24 h incubation. Results are expressed as mean ± SEM of three different experiments (n = 3 in each experiment). \*p < 0.05 vs. control (C).

knocked down with specific shRNAs and cytokine secretion was compared to that obtained with control shRNA treated cells. The results are shown in Fig. 3. LPS used as positive control for MyD88/TLR4 dependent cytokine secretion, elicited a strong response under control conditions which was reduced significantly with either shRNA. MyD88 knockdown resulted in a 60% inhibition of both GRO $\alpha$  and MCP-1 secretion (Fig. 3A). TLR4 silencing had however a much more powerful effect on LPS-induced MCP-1 release than on GRO $\alpha$  (Fig. 3B). The effect of 2–00 µg/ml of AHCC on cytokine secretion was only half of that obtained with 10 µg/ml of LPS, in line with previous experiments. However, this effect was almost completely obliterated when MyD88 or TLR4 expression was downregulated.

3.4. AHCC induces cytokine secretion in THP-1 cells in a concentration dependent fashion

The effect of AHCC in THP-1 cells, a human monocyte cell line, grown in suspension in standard conditions was tested. IL-8 was also increased in these cells but with a higher potency than in IECs, since the effect was quite marked at the low concentrations of 0.05 and 0.5 mg/ml (Fig. 4). IL-8 and TNF- $\alpha$  were also

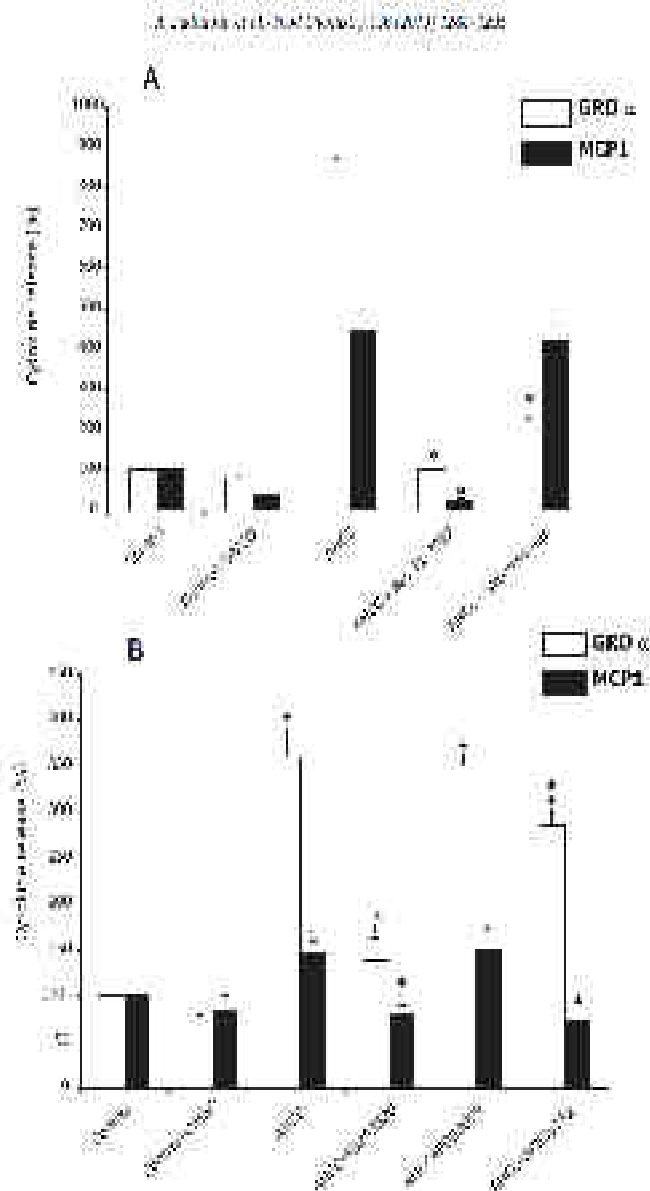


Fig. 4. Efecto de GRD y MCP1 en HT-29 y HCT-29 sobre la actividad de NF- $\kappa$ B. Células de colon proliferantes fueron tratadas con GRD o MCP1 con o sin ERK y se midió la actividad de NF- $\kappa$ B en el citosol. (A) En el control (Control) (sin ningún estímulo) se midió la actividad de NF- $\kappa$ B en el citosol de HT-29 y HCT-29. (B) Efecto de GRD y MCP1 sobre la actividad de NF- $\kappa$ B en HT-29 y HCT-29. \* $p < 0.05$  vs. control.

de regulados por NF- $\kappa$ B en células cancerosas (sumando al 50% de las) (Fig. 4B and C).

En consecuencia, el efecto regulador negativo de ERK en la actividad de NF- $\kappa$ B.

En el HT-29, Kuroki et al. (2004) demostró que la activación de NF- $\kappa$ B en células de colon proliferantes resulta en la producción de IL-8, un mediador proinflamatorio (Kuroki et al., 2004). We assessed the functional status of these pathways in HT-29 and HCT-29 cells exposed to GRD and MCP1 + ERK and phospho-specific antibodies and the effect of specific inhibitors of IL-8 synthesis (Fig. 5).

As shown in Fig. 5, HT-29 cells showed elevated p38 $\alpha$  (p38 $\alpha$ ), p38 $\beta$  (p38 $\beta$ ) and p38 $\gamma$  (p38 $\gamma$ ) in HT-29 cells (Fig. 5). p38 $\alpha$  is phosphorylated by ERK1 and is the main catalytic subunit of NF- $\kappa$ B, resulting in the

cytosol and nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B dimer. ERK1/2 can inhibit the phosphorylation and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in HT-29 cells (Kuroki et al., 2004). We assessed the functional status of the IL-8 response in HT-29 cells. MCP1 treatment induced a strong increase in the mRNA levels of the specific chemokine IL-8 under p38 $\alpha$ -ERK1/2. The effect of ERK1/2 inhibitor SB203580 was maximal, so that no additional increase was possible.

The inhibitor was similar in HCT-29 cells (Fig. 6), except that ERK1/2 phosphorylation in p38 $\alpha$  and ERK was observed that in p38 $\alpha$  and p38 $\beta$  is intense. Despite this observation, the effect of ERK1/2 inhibitor was more pronounced than that of p38. The ERK inhibitor SP60125 was the only agent that prevented in HT-29 cells. ERK1/2 evoked IL-8 synthesis, even combined with ERK1/2 inhibitor, but not with p38 $\alpha$ -ERK1/2.

242

A. Soudaine et al. / *Food Chemistry* 136 (2013) 236–250

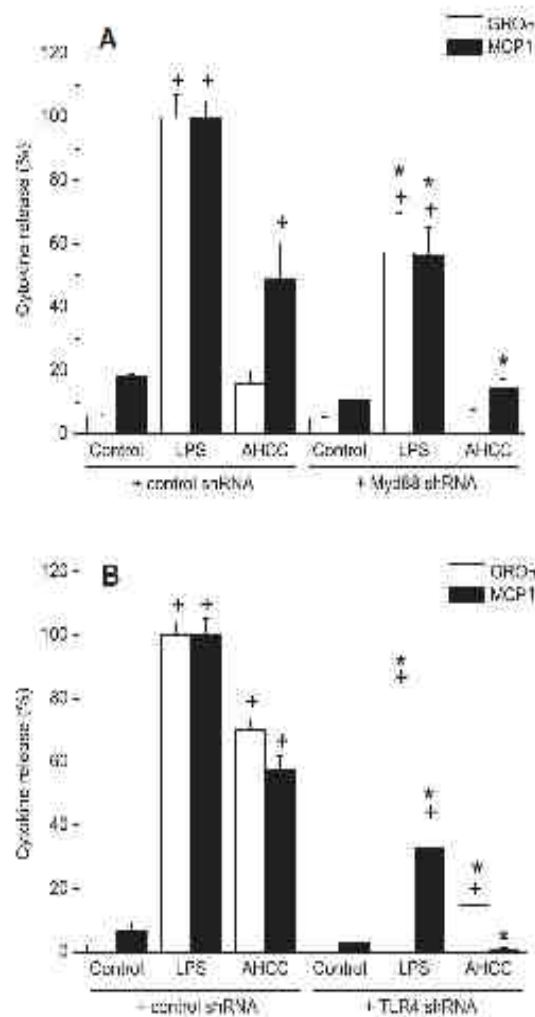


Fig. 3. Effect of Myd88 and TLR4 gene knockdown on AHCC-evoked cytokine secretion in IEC18 cells. IEC18 cells transfected with shRNA for Myd88 (A) or TLR4 (B) or a control vector were treated with AHCC (5 mg/ml) and cytokine concentration was measured in the culture medium. IEC18 cells were included in a control (100% basal secretion) (3863 and 7323 pg/ml (A and B, respectively); MCP1 basal secretion was 30327.7 and 21298.7 pg/ml (A and B, respectively);  $p < 0.05$  vs. the respective control;  $^* p < 0.05$  vs. control shRNA).

4. Discussion

AHCC is used widely in humans in a number of countries and it has been extensively studied in animal models. Interest in AHCC is growing, on the basis of the advantages of nutritional supplements in the management of human disease. In particular, AHCC has well documented immunomodulatory properties and the possible role of AHCC in inflammatory bowel disease treatment was of particular interest. Our group originally studied the colon anti-inflammatory properties of this agent based on its high content in non-absorbable glioids, which suggested prebiotic properties. Using the rat *Trinitrobenzenesulfonic acid* model of colitis, AHCC showed significant therapeutic effects that were associated to the expected modulation of colonic microbiota, with increased bifidobacteria and lactic acid bacteria and decreased clostridia (Daddaoua et al., 2007), thus AHCC does appear to function as a

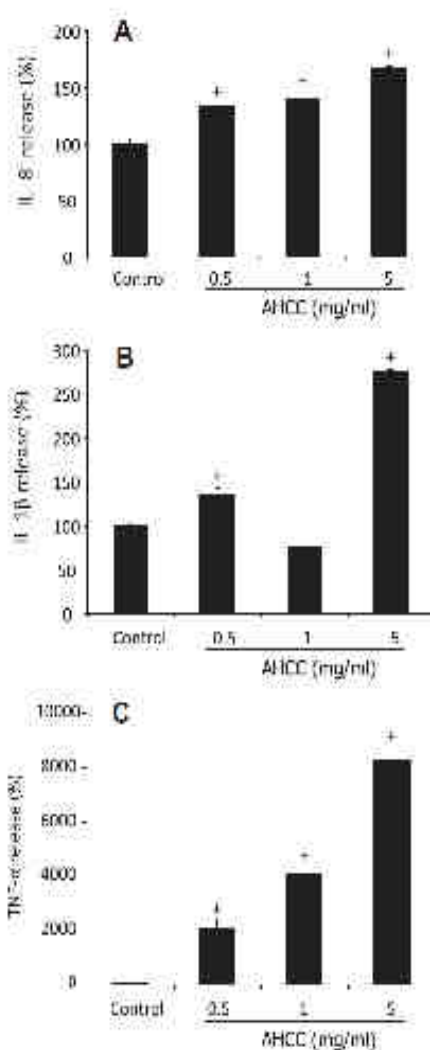


Fig. 4. Effect of AHCC on pro-inflammatory cytokine secretion. IEC18 cells (2 × 10<sup>6</sup>) were treated with different concentrations of AHCC (0.5, 1 or 5 mg/ml) and cytokine concentration measured in the culture medium by ELISA after 24 h incubation. Results are expressed as mean ± SEM of three different experiments ( $n = 3$  in each experiment);  $^* p < 0.05$  vs. control (5).

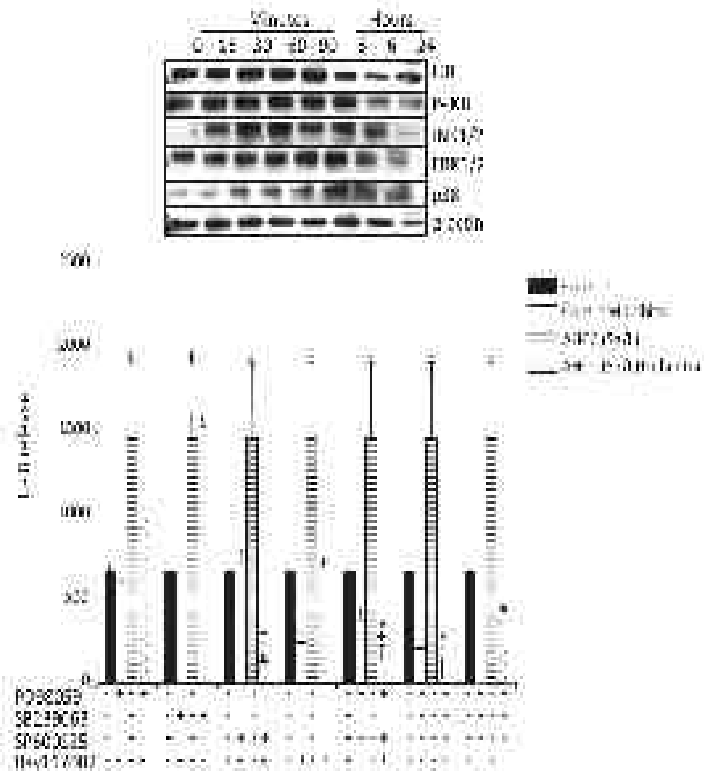
prebiotic. However, these data do not exclude the possibility that AHCC may have additional, unrelated mechanisms of action in intestinal inflammation. Hence the present study aims to respond to this question by assessing effects exerted by AHCC *in vitro* in the complete absence of bacteria (or bacterial components).

Our results confirm that AHCC produces immunomodulatory effects in epithelial cell lines of both rat and human origin (IEC18 and HT-29). IEC18 cells were selected because they are non-mutagenic and they can be used to study changes in signal transduction using transfection techniques (Beitke & Ley, 2004; Lopez-Fernandez et al., 2010). HT-29 cells were used additionally with two objectives: first, to confirm that AHCC has effects on colonic cells (IEC18 cells have ileal phenotype), and second, to extend our observations to human cells. Of course, intestinal epithelial cells were initially focused on because these are an obvious putative target of intraluminal agents such as AHCC. Of note, AHCC stimulated rather than decreased the secretion of proinflammatory cytokines.



1004

J. Neuroinflamm. 2019, 16:1004



**Figure 1:** Effect of SR22903 on L-tryptophan release. A series of Western blot images (representing the addition of SR22903 to the cell culture medium) was carried out at 0, 15, 30, 60, and 90 min after the addition of LPS. The amount of L-tryptophan released by the cells was measured by HPLC. The results are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , compared to the vehicle-treated group. IL1, IL1 receptor; pIL1, phosphorylated IL1; pIL1R1, phosphorylated IL1R1; p38, phosphorylated p38.

In conclusion, the main objective of this study was to determine the effect of SR22903 on the release of L-tryptophan by microglia, starting the cascade of downstream signaling steps leading to IL1/IL1R1 activation and the secretion of pro-inflammatory cytokines.

The results on the effect of SR22903 on the release of L-tryptophan by the treatment of a chronic inflammatory disease through experimental models, this mechanism is complex, but the hypothesis that an immunosuppressive agent may result in immunosuppressive immune system for not really work on the level of the immune response, but on the level of the immune modulation and a partial immunosuppressive response. This mechanism may be secondary to a primary effect of the immunosuppressive treatment. Here, we observed that control and suppression of neuronal apoptosis expression of IL1 $\beta$  leads to a decrease in IL1 $\beta$  protein and SR22903 treatment is related to a decrease in the total protein produced in acute inflammatory response (Nouri et al., 2015). In a previous study, SR22903 treatment has been shown to be protective in experimental colitis arising in a pro-inflammatory human (Nouri et al., 2018). Previously, clinical research in mice using supraplatelet membrane (SR22903) and SR22903 in the treatment of IL1 $\beta$  in colitis. The main therapeutic response to SR22903 treatment in the colon is associated with accumulation of platelet membrane (SR22903) in the colitis. These findings are in line with the effect of SR22903 on the release of L-tryptophan by microglia. SR22903 may work by SR22903 being a natural ligand for TLR1 and TLR2.

Finally, it is worth mentioning that SR22903 is a very specific molecule because the side effects of the immunology in acute

system chemotherapy affects the treatment with patients, immunosuppressive and side effects of highly acute. With the use of SR22903, SR22903 will be a very effective immunosuppressive agent with effects on the immune system. SR22903 may also provide a mechanism of cellular expansion for its beneficial effects on the management of disease, combined by chemotherapy in patients with cancer.

#### Funding sources

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2016-61482, SAF2018-04832, SAF2018-122022 and SAF2018-122812) by Fundación Alicia Kopeloff (SAF2018-04832) and by the Fundación Ramón Arellano (SAF2018-04832) funded by the Instituto Salud Carlos III.

#### References

1. Nouri, A., et al. (2018) The effect of SR22903 on the release of L-tryptophan by microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 1-10.

2. Nouri, A., et al. (2018) The effect of SR22903 on the release of L-tryptophan by microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 1-10.

3. Nouri, A., et al. (2018) The effect of SR22903 on the release of L-tryptophan by microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 1-10.

4. Nouri, A., et al. (2018) The effect of SR22903 on the release of L-tryptophan by microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 1-10.

5. Nouri, A., et al. (2018) The effect of SR22903 on the release of L-tryptophan by microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 1-10.

1666. K. C. Johnson, G. L. King, G. J. Wilson. Efeito da terapia de acoplamento larval em ovos de insetos fitófagos: uma revisão sistemática. *Journal of Applied Ecology*. 2003, 40(3): 477-486.
1667. Y. Kato, T. Inoue, T. Ito, T. Inoue, S. & M. T. 2000. Antifeedant activity of essential oils from *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia miltiorrhiza* against the larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Chemical Ecology* 26(12): 1379-1384.
1668. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1669. R. H. & A. 2000. *Behavioral Ecology: An Evolutionary Approach*. 2nd ed. 427.
1670. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1671. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1672. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1673. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1674. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1675. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1676. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1677. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1678. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1679. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1680. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1681. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1682. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1683. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1684. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1685. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1686. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1687. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1688. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1689. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1690. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1691. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1692. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1693. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1694. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1695. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1696. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1697. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1698. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1699. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.
1700. J. M. 2000. *Neurotransmission: Molecular Biology and Pharmacology*. 4th ed. 427.

### **CAPÍTULO III.**

*Determinación de las actividades mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en la misma muestra de tejido intestinal.*



### **CAPÍTULO III**

#### **Determinación de las actividades mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en la misma muestra de tejido intestinal.**

*Isabel Romero-Calvo, Fermín Capitán, Patricia Martínez-Moya, Mercedes Ortega-González, **Enrique Martínez-Plata**, Mercedes González, Elena Puerta, María Dolores Suárez, Antonio Zarzuelo, Olga Martínez-Augustín, Fermín Sánchez de Medina.*

La caracterización de la inflamación intestinal, se lleva a cabo de forma rutinaria mediante la determinación de la actividad mieloperoxidasa, necesitando para dicha determinación una muestra de tejido. La actividad fosfatasa alcalina es otro marcador de inflamación que está empezando a ser utilizado, cuya determinación necesita otra muestra. Dado que otras técnicas utilizadas en la caracterización de la inflamación intestinal, como son Western-Blot o qRT-PCR, necesitan muestras extras, podría ser ventajosa la medida de fosfatasa alcalina y de mieloperoxidasa en la misma muestra de tejido. En éste trabajo se utilizan dos modelos preclínicos de colitis para poner a punto un método mediante el que se pueden determinar las dos actividades en la misma muestra.

*(Analytical Biochemistry. 2013., En revisión)*

## Measurement of myeloperoxidase and alkaline phosphatase in the same intestinal sample

Isabel Romero-Calvo<sup>1</sup>, Fermín Capitán<sup>2</sup>, Patricia Martínez-Moya<sup>2</sup>, Mercedes Ortega-González<sup>1</sup>, Enrique Martínez-Plata<sup>3</sup>, Mercedes González<sup>1</sup>, Elena Puerta<sup>1</sup>, María Dolores Suárez<sup>2</sup>, Antonio Zarzuelo<sup>1</sup>, Olga Martínez-Augustín<sup>2</sup>, Fermín Sánchez de Medina<sup>1\*</sup>.

### Institutional affiliation

Departments of <sup>1</sup>Pharmacology and <sup>2</sup>Biochemistry and Molecular Biology II, CIBERehd, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain.

<sup>3</sup>Pharmacy Department, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain.

### Corresponding author

\*Fermín Sánchez de Medina. Department of Pharmacology. School of Pharmacy, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain. Phone: 34958 241747. Fax: 34 958 248964. Email: fsanchez@ugr.es

### Grant support

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01432 and AGL2008-04332), the Fundación Ramón Areces and Junta de Andalucía (CTS-164 and CTS-6736). IRC and PMM are funded by Ministerio de Ciencia e Innovación. MO is funded by the University of Granada. CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

**Keywords:** intestinal inflammation, myeloperoxidase, alkaline phosphatase.

## Abstract

Assessment of intestinal inflammation is routinely achieved by measurement of myeloperoxidase activity, a technique that requires a dedicated tissue sample. Alkaline phosphatase is another inflammatory marker that is being used, which demands a separate sample. Because other techniques widely used, such as Western blot or RT-PCR, need additional samples, it would be advantageous to measure myeloperoxidase and alkaline phosphatase activity in the same piece of tissue. Here we validate this approach briefly using two common colitis models.

**Abbreviations:** AP, alkaline phosphatase; MPO, myeloperoxidase; TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid; DSS, dextran sulfate sodium.

Myeloperoxidase (MPO) activity is widely used as a marker of inflammation in animal experimentation, and particularly in preclinical models of intestinal

inflammation. MPO is expressed by leukocytes (mainly neutrophils), where it catalyzes the formation of hypochlorous acid from chloride and hydrogen peroxide, thus augmenting the microbe killing potential of these cells [1]. Since neutrophils are actively attracted to inflammatory sites as part of the acute response and MPO is not expressed in significant amounts by other cell types (except in little amounts by macrophages and other leukocytes), its measurement is a good method to evaluate the magnitude of the inflammatory response, at least in the acute setting. This usually involves taking a colonic sample, often full length, and devoting it solely for MPO quantitation.

On the other hand, alkaline phosphatase (AP) is emerging as a valuable inflammatory marker in the intestine. The inflamed intestine displays a higher AP activity due both to the influx of leukocytes, which bear AP of the tissue nonspecific type, and to the induction of AP in enterocytes [2; 3]. The latter is a complex response to oxidative stress

neutrophils. The enzymatic reaction was performed in 50 mM sodium phosphate buffer with 0.0005% hydrogen peroxide and 0.168 mg/ml  $\alpha$ -dianisidine as substrate. MPO is expressed as U/g. This is the established MPO method.

Alkaline phosphatase (AP) activity was measured spectrophotometrically using disodium p-nitrophenylphosphate as substrate in a 50 mM glycine buffer with 0.5 mM  $MgCl_2$  (pH=10.5), as described [3; 9] and expressed as mU/mg protein [10]. The samples were homogenized normally in saline.

Our objective was to be able to measure MPO and AP activity (and levamisole sensitivity of the latter) in the same piece of tissue, but the impact of the respective homogenization buffers is unknown. Thus we took 3 longitudinal samples in each animal and used one for MPO and another for AP determination using the established techniques, and the third for combined MPO and AP measurement. In the latter case homogenization took place in an HTAB buffer based on 50 mM Tris instead of sodium phosphate, in order to avoid a direct competitive interference with the subsequent AP determination.

All reagents were supplied by Sigma (Barcelona, Madrid). The results were analyzed by Pearson correlation using the SigmaStat program (Jandel Corporation, San Rafael, CA). Statistical significance was set at  $P<0.05$ .

As expected, colitic animals experienced body weight loss and diarrhea, occasionally accompanied by fecal blood. The large bowel was shortened and thickened and showed signs of necrosis and hemorrhage. These features are consistent with previous observations by several investigators, including our own group.

TNBS dissolved in 0.25 mL of 50%

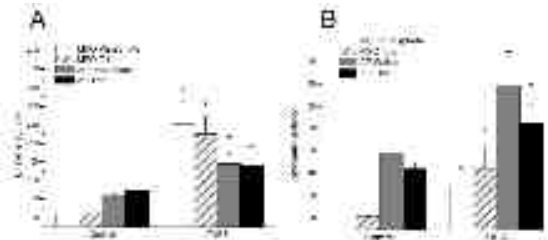


Figure 1. MPO and AP activity measured in TNBS (A) and DSS (B) rat colitis with the classical combined method. MPO activity in the \* $P<0.05$  vs control.

Fig. 1 shows the MPO and AP values obtained in the control and colitic groups in the TNBS and DSS model measured by the classical ('Phosphate') and the new ('Tris') method. Colonic inflammation in both cases was associated with substantial and significant increases in both parameters, which were very similar with either technique. More importantly, when both measurements were compared directly, there was a good correlation (Fig. 2).

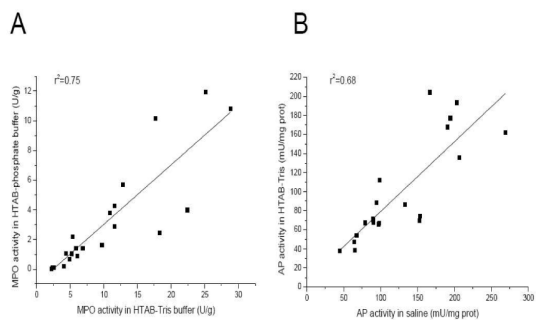


Figure 2. Correlation of MPO (A) and AP (B) activity data obtained with the classical and combined method.

Thus for the AP data (Fig. 2B) linear regression analysis showed a slightly depressed slope ( $0.7\pm 0.1$ ) and an intersect that was not significantly different from zero ( $6.0\pm 15.5$ ). The regression coefficient was 0.68, reflecting the significant dispersion of the data, although the correlation (Pearson analysis) was much higher (0.83,  $p<0.001$ ). This dispersion is explained by the heterogeneity that is inherent to the use of different tissue samples, because the comparison of MPO or AP measure by the same technique in adjacent colonic strips from azurophilic granules in

shows a similar degree of dispersion (not shown). AP levamisole sensitivity was also comparable (not shown). Similar correlation was obtained for MPO (Fig. 2A).

Therefore, we conclude that the measurement of both MPO and AP in the same intestinal sample is suitable using the substitution proposed here.

## References

- [1] J.E. Krawisz, P. Sharon, and W.F. Stenson, Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87 (1984) 1344-1350.
- [2] F. Sanchez de Medina, O. Martinez-Augustin, R. Gonzalez, I. Ballester, A. Nieto, J. Galvez, and A. Zarzuelo, Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 68 (2004) 2317-26.
- [3] R. Lopez-Posadas, R. Gonzalez, I. Ballester, P. Martinez-Moya, I. Romero-Calvo, M.D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin, and F. Sanchez de Medina, Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis* 17 (2011) 543-56.
- [4] R.F. Goldberg, W.G. Austen, Jr., X. Zhang, G. Munene, G. Mostafa, S. Biswas, M. McCormack, K.R. Eberlin, J.T. Nguyen, H.S. Tatlidede, H.S. Warren, S. Narisawa, J.L. Millan, and R.A. Hodin, Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008) 3551-3556.
- [5] A. Tuin, K. Poelstra, A. de Jager-Krikken, L. Bok, W. Raaben, M.P. Velders, and G. Dijkstra, Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut* 58 (2009) 379-87.
- [6] G.P. Morris, P.L. Beck, M.S. Herridge, W.T. Depew, M.R. Szewczuk, and J.L. Wallace, Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96 (1989) 795-803.
- [7] R. Lopez-Posadas, P. Requena, R. Gonzalez, M.D. Suarez, A. Zarzuelo, F. Sanchez de Medina, and O. Martinez-Augustin, Bovine glycomacropeptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *J Nutr* 140 (2010) 2014-9.
- [8] I. Ballester, A. Daddaoua, R. Lopez-Posadas, A. Nieto, M.D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin, and F. Sanchez de Medina, The bisphosphonate alendronate improves the damage associated with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Br J Pharmacol* 151 (2007) 206-15.
- [9] O.A. Bessey, O.H. Lowry, and M.J. Brook, Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *J. Biol. Chem.* 164 (1946) 321-329.
- [10] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76-85.



## **V. DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO I y II

Una de las líneas más importantes de nuestro grupo de investigación durante los últimos 20 años ha sido el estudio de productos que puedan ser de utilidad en el tratamiento de la EII [130, 215, 326, 350-363]. La teoría más aceptada en la actualidad indica que la EII puede ser resultado de una reacción inmune anormal frente a las bacterias intestinales en personas genéticamente predispuestas [130, 215, 326, 350-363]. En pacientes con EII se han descrito alteraciones de la flora intestinal, que unidas al incremento de la permeabilidad que propicia el acceso de las bacterias y productos bacterianos a la mucosa intestinal, induce o perpetúa una respuesta inmune inflamatoria [130]. Los prebióticos podrían reducir la inflamación favoreciendo el crecimiento de flora intestinal normal e inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos [40, 364, 365]. Los prebióticos más utilizados (inulina, fructooligosacáridos y galactooligosacáridos) son oligosacáridos resistentes a la digestión en el intestino que además de favorecer el crecimiento de la flora beneficiosa, se pueden unir a bacterias inhibiendo su unión a las células intestinales y su consecuente translocación. Numerosos estudios en animales utilizando modelos de inflamación intestinal han demostrado que los prebióticos pueden ejercer efectos antiinflamatorios [275, 326, 353, 354, 357].

El AHCC es un producto obtenido del cultivo del micelio del hongo de la familia Basidomicete (*Lentinus edodes*) [324], rico en glúcidos (70% del peso seco). En nuestro afán por estudiar nuevos compuestos que pudieran poseer efectos prebióticos, nos llamó la atención el AHCC por su alto contenido en glúcidos, y nos pareció interesante estudiar su posible efecto antiinflamatorio y prebiótico en el modelo de colitis inducida mediante la administración de TNBS a ratas. En animales, no se produce EII y no existe un modelo perfecto de esta enfermedad, por lo que son múltiples los modelos que se han desarrollado que reproducen distintos aspectos de la enfermedad (ver apartado 6 De esta memoria). La administración de TNBS disuelto en etanol por vía anal a ratas induce la erosión del intestino (provocada por la administración del etanol), y una reacción inmune

inducida por la formación de complejos proteicos con el TNBS, actuando este último como hapteno. El resultado es una inflamación mediada por células T (preferente mente del tipo Th2 y Th17), semejante a la que se produce en la EC [366]. Este es un modelo agudo, fácilmente reproducible y barato que se utiliza ampliamente en la investigación sobre EII [195].

Nuestros resultados indicaron que la administración de AHCC produce un efecto antiinflamatorio en el modelo preclínico de inflamación intestinal inducida por TNBS. Es más, este efecto fue similar o incluso mayor que el de la sulfasalazina (SAZ), un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la EII. Uno de los aspectos que más nos llamó la atención del tratamiento con AHCC fue su efecto beneficioso tanto en la ganancia de peso como en la ingesta de comida de los animales, en contraste con la SAZ, que no mostró efecto a este nivel. Este efecto podría relacionarse con los mayores niveles de IL-1 $\beta$  asociados con el tratamiento con AHCC en comparación con los de las ratas que recibieron SAZ, ya que la IL-1 $\beta$  participa en la respuesta anorexigénica de éste modelo animal. No obstante, la validación de esta hipótesis requeriría la cuantificación en sangre de los niveles de la proteína.

El efecto antiinflamatorio del AHCC y de la SAZ se caracterizó en el colon por la reducción del área afectada y del edema intestinal, la disminución en la MPO y la reducción de citocinas proinflamatorias. La infiltración leucocitaria es característica de las lesiones intestinales en la EII. La evolución natural de la colitis generada inducida por TNBS conlleva la sustitución progresiva de los neutrófilos por linfocitos y macrófagos [367], Nuestros resultados indicaron que ambos tratamientos (SAZ y AHCC) indujeron una reducción de la actividad MPO y una inhibición importante de la síntesis de MCP-1. La reducción en la actividad de MPO puede ser interpretada como un signo de una menor infiltración neutrofílica, ya sea como resultado de un menor daño tisular o por una resolución acelerada de la respuesta inflamatoria. MCP-1, es producida por células endoteliales, células de músculo liso y macrófagos, y es una de las principales citocinas implicadas en el reclutamiento de monocitos. Aunque los bajos niveles del mRNA que codifica MCP-1 en el colon son consistentes con una reducción en



la infiltración de monocitos, no podemos asegurar este punto sin haber llevado a cabo determinaciones histológicas directas. No obstante, es interesante resaltar que MCP-1 se encuentra incrementada en paciente con EII y que sus niveles de expresión se encuentran directamente relacionados con la gravedad de la inflamación [368].

Otro marcador de inflamación intestinal alterado por la administración de AHCC fue la actividad fosfatasa alcalina (FA). Estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación hace unos años demostraron que la FA es un marcador sensible de inflamación [369]. La actividad FA se incrementa en el intestino como resultado de la infiltración leucocitaria y de una mayor actividad enzimática en el epitelio intestinal, que se asocia a su vez con un cambio en la isoforma de FA inducido por estrés celular [370]. El resultado de la administración de AHCC (500 mg/kg), fue una disminución de los niveles de FA a valores similares a los del grupo tratado con SAZ, indicando una vez más el efecto antiinflamatorio dosis dependiente de AHCC. El hecho de que el efecto se observó a dosis altas y no cuando se administraron dosis más bajas del producto nos hace suponer que podrían existir mecanismos adicionales a la dosis de 500 mg/kg. Por otro lado, tanto el grupo de AHCC como el de SAZ mostraron concentraciones de glutatión (GSH) en el colon intermediss en comparación con las de los grupos control y TNBS. Aunque en el análisis estadístico no se pudo establecer un efecto significativo cuando se compararon los grupos tratados con el grupo TNBS, parece probable que los tratamientos tendiesen a mejorar la defensa antioxidante.

Tanto la IL-1 $\beta$  como el TNF son citocinas proinflamatorias que juegan papeles importantes tanto en la EII como en la colitis inducida por la administración de TNBS. La bioactividad de la IL-1 $\beta$  está parcialmente regulada por el inhibidor endógeno IL-1ra que bloquea el receptor de IL-1 e impide la unión del agonista [371]. Las células mononucleares son la principal fuente tanto de IL-1 $\beta$  como de IL-1ra. Por otra parte, la importancia de TNF en la EII se ilustra por el hecho de que los anticuerpos anti-TNF se utilizan ampliamente para tratar la CU y EC. La administración de AHCC redujo los niveles de ARN mensajero de IL-1 $\beta$ , IL-1ra y TNF, un

efecto comparable al generado por la SAZ, sin embargo, el mecanismo de este efecto es probablemente diferente en ambos casos.

Con respecto al posible efecto prebiótico del AHCC, se conoce la implicación de los prebióticos en la modulación de la expresión de mucinas (MUC) en el intestino, por lo que nos planteamos evaluar el perfil de expresión de MUC y TFF3, mediante RT-PCR. El TFF3 es un péptido implicado en el mantenimiento y la curación de la mucosa intestinal, y las MUC forman parte de una familia de proteínas altamente glicosiladas que, junto con sales inorgánicas y agua, forman el moco que protege las superficies epiteliales, incluyendo el tracto gastrointestinal. En el caso de una colitis se induce la expresión tanto de TFF3 y MUC, siendo esta una respuesta del epitelio para curar heridas desarrolladas en la mucosa. En nuestro trabajo el tratamiento con AHCC y SAZ normalizó estos valores, lo que concuerda con el menor daño observado en la mucosa intestinal.

A nivel microbiológico, se analizó el efecto de la AHCC en la microflora intestinal, mediante un análisis bacteriológico de heces, partiendo de la hipótesis aceptada, según la cual, la microflora intestinal juega un importante papel en la patogénesis de la inflamación intestinal y de la EII. De hecho, y como se ha comentado con anterioridad, la inflamación característica de la EII es la culminación de una serie de acontecimientos y procesos que promueven la ruptura de la barrera y aumentan la absorción de microorganismos, de productos bacterianos y de antígenos luminales, estimulando diferentes tipos de células en la *lamina propria* que a su vez producen y liberan diferentes mediadores proinflamatorios. Por tanto, la inflamación de la mucosa puede ser considerada como un proceso de auto-perpetuación, en lo cual la interrupción de la capa epitelial y la absorción de los antígenos luminales desempeñan un papel central. Por otra parte, se ha observado que los prebióticos promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas para el hospedador, mientras que reducen el crecimiento de microorganismos potencialmente perjudiciales. Los resultados obtenidos indican que la administración de TNBS disminuyó el crecimiento de las bacterias aerobias fecales, en concreto de bacterias del ácido lácticas, y aumentó los recuentos de clostridios en comparación con el

grupo control. El AHCC fue capaz de normalizar el perfil de la flora colónica, aumentando las bacterias aerobias (bacterias ácido lácticas) y las bifidobacterias, mientras que los niveles de clostridios disminuyeron en comparación con el grupo tratado con TNBS. Contrastan con estos datos los obtenidos cuando las ratas fueron tratadas con SAZ. Este tratamiento afectó solamente a los recuentos de bifidobacterias y de clostridios. Aunque se ha descrito que la SAZ posee algunos efectos sobre la flora bacteriana, éste no se considera un mecanismo de acción importante para este fármaco [372].

En este estudio hemos probado dos dosis diferentes de AHCC (100 y 500 mg/kg/d), que son dosis relativamente altas para productos farmacológicos pero bajas o medias para productos nutricionales y prebióticos. Ambas dosis son ampliamente comparables en términos de eficacia antiinflamatoria. Aunque podría ser interesante estudiar dosis más bajas de AHCC, la ausencia de efectos tóxicos aparentes y la equivalencia terapéutica a la SAZ en este modelo preclínico hace improbable que mejorase el efecto terapéutico.

En resumen, según nuestros datos, el AHCC posee efectos antiinflamatorios cuando se administra como pretratamiento a ratas con colitis inducida por la administración de TNBS, un modelo preclínico de EII ampliamente usado. El mecanismo de acción del AHCC podría estar relacionado con su capacidad de incrementar la presencia de microbiota beneficiosa (bacterias ácido lácticas y bifidobacterias), y de reducir la presencia de clostridios. Así pues creemos que el AHCC podría ser una adición valiosa a las alternativas terapéuticas actuales para la EII. No obstante, es obvio que se necesitan más estudios para validar estos resultados y para explorar mecanismos de acción independientes de su acción prebiótica que no pueden ser descartadas. En este sentido nos planteamos evaluar la acción de AHCC *in vitro*, lo que nos proporciona unas condiciones de experimentación más controladas, que incluyen la ausencia completa de bacterias y de componentes bacterianos. Los experimentos llevados a cabo *in vitro*, se recogen en el capítulo II del apartado de Resultados de esta memoria. La idea de que el AHCC pueda tener efectos independientes de su acción prebiótica viene abalada por distintos estudios

que ha documentados sus propiedades inmunomoduladoras directas. Así es sabido que el AHCC puede favorecer la proliferación de macrófagos y células NK (citas) e incrementar la producción de distintas citokinas (IFN $\gamma$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-1RA y TNF) por macrófagos y células T [330, 334, 348, 349].

Los resultados obtenidos en nuestros estudios confirman que el AHCC posee efectos inmunomoduladores sobre células del epitelio intestinal tanto de origen humano como de rata (IEC18 y HT-29). Las células IEC18 fueron seleccionadas porque no son de origen tumoral y pueden ser utilizadas para estudiar cambios en la traducción de señal utilizando técnicas de transfección [370, 373, 374]. Las células HT-29 fueron también utilizadas con dos objetivos: primero, confirmar que AHCC tiene efectos en células colónicas (las células IEC18 tienen fenotipo ileal) y segundo, extender nuestras observaciones a células humanas. Inicialmente nos centramos en las células epiteliales intestinales por ser diana la diana putativa obvia de agentes intraluminales como el AHCC. Es interesante resaltar que, aunque cabría esperar lo contrario dado su efecto antiinflamatorio *in vivo*, el efecto predominante del AHCC fue el de estimular la secreción de citokinas proinflamatorias. Este efecto, dependiente de la concentración, fue máximo a 5 mg/ml. Es más, la magnitud de la respuesta fue bastante grande, ya que fue aproximadamente la mitad de la magnitud alcanzada con 10  $\mu$ g/ml de LPS.

A continuación, formulamos la hipótesis de que, por su gran contenido en azúcares, el AHCC podría ser ligando putativo de TLR4. Los TLRs son receptores de productos bacterianos y el TLR4 reconoce entre otros productos al LPS [130]. La activación del TLR4 estimula la producción de citokinas y quimiocinas proinflamatorias mediante la activación de NF- $\kappa$ B [130]. Con el fin de comprobar nuestra hipótesis decidimos silenciar la expresión de TLR4 y de MyD88 en células IEC18, mediante la utilización de shRNA. MyD88 es una proteína adaptadora implicada en los efectos de todos los TLRs excepto de TLR3, aunque hay efectos mediados por TLRs que son independientes de MyD88 [130]. Como era de esperar, los efectos del LPS fueron significativamente inhibidos cuando se inhibió la expresión de MyD88 o de TLR4. De igual modo, el silenciamiento inhibió los efectos del

AHCC. Es interesante destacar, que la inhibición de los efectos del LPS fue menos prominente que la de los efectos del AHCC. Esto podría ser debido a una incompleta inhibición de la expresión de los genes, unida a una estimulación más fuerte por parte del LPS que del AHCC. Por otra parte, el silenciamiento de MyD88 tuvo un mayor efecto inhibitor que el de TLR4 cuando se adicionó AHCC. Este hecho puede reflejar que el AHCC podría también estimular otros receptores dependientes de MyD88.

MyD88 se une a varias proteínas intermedias, incluyendo IRAK1/4, TRAF6 y TAK1, que convergen en la activación del complejo IKK, lo que da lugar a la fosforilación I $\kappa$ B- $\alpha$  y a la liberación de los dímeros activos de NF- $\kappa$ B. Utilizamos inhibidores de la fosforilación de la cascada de las MAPKs, de PI3K y de NF- $\kappa$ B con el fin de caracterizar la vía de transducción de señal posterior a la activación de TLR4 y MyD88. Nuestros resultados, consistentes con la estimulación de TLR4/MyD88, indican que es necesaria la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  para que se produzca la respuesta a AHCC, que estaría por tanto mediada en última instancia por NF- $\kappa$ B. Por otra parte, nuestros datos indican que aunque las vías de transducción de señal de MAPKs y PI3K están implicadas, éstas parecen jugar un papel secundarios (excepto en el caso de la vía de la PI3K y la secreción de GRO $\alpha$ ), ya que el efecto de Bay11-7082 es máximo. Los efectos de la sobre HT29 fueron muy similares, aunque la relevancia de la cascada de las MAPKs fue mayor, de modo que la inhibición completa pudo lograrse mediante la inhibición de la fosforilación de éstas kinasas.

Aunque se espera que sólo la superficie del epitelio intestinal esté en contacto con agentes luminales como bacterias y productos bacterianos o nutriente, incluyendo el AHCC, la interacción con otros tipos celulares presentes en la mucosa, debajo de la superficie del epitelio intestinal, no puede ser excluída, especialmente en situaciones en las que la función de barrera se encuentre alterada y la permeabilidad intestinal se encuentre incrementada, como en la EII. Por tanto, estudiamos los efectos del AHCC sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en monocitos/macrófagos utilizando la línea celular THP-1. Como se había observado en células epiteliales, la adición de AHCC al medio de cultivo de las células THP-1

produjo un incremento dosis dependiente en la secreción de citokinas proinflamatorias. Estos resultados coinciden con otros publicados recientemente que muestran que el AHCC induce la producción de IL-1 $\beta$  en monocitos humanos promoviendo las respuestas Th17 y Th1, e incrementando por tanto la inmunidad intestinal [349]. Por otra parte, un estudio *in vivo* indicó que el AHCC incrementa la frecuencia de células T CD4(+), CD8(+) produciendo de manera independiente IFN $\gamma$ , TNF o ambas a la vez [348]. Aunque este estudio utilizó un tipos de células, sus datos coinciden con el incremento de la producción de TNF inducido por AHCC descrito en esta Tesis Doctoral.

El estudio farmacológico de la transducción de señal en células THP-1 mostró resultados similares a los descrito para células IEC18 y especialmente para células HT29, es decir, que el efecto de AHCC depende casi por completo de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  y/o de la activación de MAPKs, especialmente de JNK.

Podemos concluir que nuestros resultados sugieren que el AHCC activa TLR4 en células del epitelio intestinal y en monocitos, activando casacadas de señales que llevan a la activación de NF- $\kappa$ B y a la secreción de citokinas proinflamatorias.

¿Cómo puede la activación de la respuesta proinflamatoria observada *in vitro* ser compatible con el efecto antiinflamatorio observado en los experimentos de colitis en ratas? Ambos efectos son compatibles con la hipótesis de que la EII puede ser consecuencia no de un sistema inmune sobreactivado, sino de uno relativamente débil. La incapacidad de la barrera intestinal para contener la flora bacteriana puede dar lugar a la traslocación y a una respuesta inflamatoria. Por tanto la inflamación puede ser secundaria a un defecto primario en la defensa de la mucosa. En concordancia con esta hipótesis, Nenci y col (2007) [172] observaron que la supresión condicional de IKK- $\gamma$  (también conocido como modulador esencial de NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, essential modulator, NEMO)) o de IKK- $\alpha/\beta$  resultaba en una activación reducida de la vía de NF- $\kappa$ B y en una potente respuesta inflamatoria [172]. En un estudio diferente, la administración de el factor estimulador de

colonias de macrófagos y granulocitos (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) ha demostrado proteger frente a la colitis actuando sobre la inmunidad innata [375]. Por otra parte, se ha descrito que los ratones knock out para GM-CSF son más susceptibles a la inducción de colitis [376]. De manera similar, la falta de expresión de CXCL1, considerada la principal quimioquina responsable del reclutamiento de neutrófilos al colon, se asocia con una mayor colitis [377]. En línea con estos resultados, la depleción de neutrófilos agrava por sí sola la colitis (Juhl *et al*, 2007). El AHCC podría por tanto, como mecanismo independiente de su efecto prebiótico, incrementar la inmunidad y por tanto la función de barrera y la defensa de la mucosa.

Como se ha comentado anteriormente, el AHCC ha sido utilizado para mejorar los efectos secundarios de la quimioterapia en pacientes con cáncer. La quimioterapia afecta a la mucosa intestinal produciendo mucositis y pérdida de la integridad de la mucosa [378]. Aunque es difícil trasladar los efectos *in vitro* a efectos *in vivo*, la acción del AHCC sobre la barrera mucosal podría también proporcionar una explicación molecular y celular de sus efectos sobre el manejo de los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia en pacientes con cáncer.

## CAPÍTULO III

La actividad MPO se utiliza ampliamente como marcador de inflamación en animales de experimentación y particularmente en modelos preclínicos de inflamación intestinal[379]. Ésta enzima es expresada por leucocitos (principalmente por neutrófilos) y cataliza la formación de ácidos hipocloroso a partir del ión cloruro y de peróxido de hidrógeno, aumentando la capacidad de aniquilar microbios de estas células [379].

La AP posee al menos 4 isoformas en humanos: la inespecífica de tejido o isoforma de hueso/hígado/riñón (TNAP), además de la isoforma intestinal (IAP), la de placenta, y la de células germinales (o la *placental-like*), que se expresan predominantemente en estos tejidos. La IAP es la isoforma expresada por el intestino delgado y la isoforma TNAP se expresa en el intestino grueso. Se ha postulado que la AP podría contribuir a la regulación de la defensa intestinal desfosforilando antígenos bacterianos y regulando la translocación bacteriana.

La fosfatasa alcalina, es una enzima que se expresa en el intestino inflamado por leucocitos y por enterocitos, cuyo papel parece estar relacionado, entre otros procesos, con la desfosforilación del antígenos bacterianos y la regulación de la translocación bacteriana [361, 380, 381].

Nuestro grupo de investigación describió hace algunos años, que la actividad fosfatasa alcalina (AP) podría ser un buen marcador de inflamación intestinal ya que se encuentra incrementada el colon de modelos preclínicos de colitis [369]. Existen al menos 4 isoformas de AP en humanos. En el intestino delgado se expresa fosfatasa alcalina intestinal, mientras que la isoforma no específica de tejido se expresa en el intestino grueso. Ésta isoforma tiene a su vez 3 isoformas que difieren a nivel de mRNA y en sus glucosilaciones. Nuestro grupo de investigación ha descrito que la isoforma no específica de tejido es la responsable del incremento de la actividad observado en el colon de los modelos animales y en células del epitelio intestinal (referencia 2 del artículo, [370]). En estos experimentos observamos que no sólo se produce un incremento en la expresión de esta



isoforma, sino que también hay cambios en sus patrones de glucosilación que la hacen más sensible a inhibidores como el levamisol. Nuestros datos coinciden con distintos trabajos que han descrito una disminución en la isoforma intestinal, pero un incremento en la actividad AP en el colon de pacientes con EII [381, 382].

Por tanto, la actividad de la enzima como su sensibilidad a la inhibición por levamisol son buenos marcadores de inflamación en el intestino.

Normalmente, las determinaciones de AP y de MPO en muestras colónicas procedentes de experimentos animales requiere la utilización de muestras separadas. Este hecho se debe a que los tampones en los que se han de homogenizar las muestras según los métodos descritos son diferentes [370, 379, 383, 384]. En el caso de la determinación de la actividad MPO, el tampón que se utiliza se denomina HTAB (pH=6) y contiene 50 mM de tampón fosfato sódico adicionado de un 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, mientras que en el caso de la AP el tampón utilizado es un tampón glicina (50mM) adicionado de cloruro magnésico (0,5mM). Este tampón se ajusta a un pH alcalino (10,5), que es el pH óptimo para la actuación de la enzima.

En un experimento típico de colitis *in vivo* el colon es pesado y medido, determinándose el daño macroscópico mediante un score. A continuación el colon se divide longitudinalmente para estudios histológicos y para la determinación de MPO y de otros parámetros que incluyen actividad AP, síntesis de citokinas, determinaciones mediante qRT-PCR, determinación de glutatión, etc. Cada una de estas determinaciones implica la homogeniczación de una pieza de tejido y la cuantificación por separado, lo que supone tiempo y esfuerzo. En este estudio utilizamos muestras longitudinales de colon de ratas a las que se indujo colitis mediante la administración de TNBS o de mediante la administración de DSS, con el fin de estudiar si se pueden determinar las actividades MPO y AP en la misma muestra. Este método no sólo supondría el ahorro de muestra, sino que

también ahorraría tiempo en la homogenización al disminuir el número de muestras.

Utilizamos los tampones descritos anteriormente y un tampón HTAB en el que sustituimos el tampón fosfato sódico por TRIS (50 mM) con el fin de evitar la interferencia del fosfato en la determinación de la actividad AP, que se basa en la liberación de grupos fosfato del p-nitrofenolfosfato. Nuestros resultados muestran que las determinaciones de las actividades AP y MPO utilizando el tampón propuesto son muy similares a las obtenidas con los tampones descritos en los métodos originales, produciéndose un incremento de las actividades enzimáticas en el colon de los animales con colitis inducida por TNBS y por DSS. De hecho, cuando los resultados obtenidos utilizando los tampones originales y el nuevo tampón fueron comparados directamente, hubo una buena correlación (ver figura 1). Los datos obtenidos cuando se adicionó levamisol a los distintos tampones, con el fin de estudiar la sensibilidad de la AP a este inhibidor fueron también comparables (datos no mostrados). Es necesario destacar que aunque se observó una dispersión significativa de los datos cuando se compararon estas medidas, ésta puede ser inherente al uso de diferentes muestras de tejidos, ya que cuando comparamos actividades MPO o AP en tiras colónicas adyacentes se observó un grado similar de dispersión (datos no mostrados).

Por tanto concluimos que la medidad de MPO y AP en la misma muestra intestinal es posible utilizando la sustitución propuesta en este trabajo.



## **VI. CONCLUSIONES**

El AHCC ejerce efectos antiinflamatorios cuando se administra como pretratamiento a ratas con colitis inducida por la administración de TNBS, un modelo preclínico de EII ampliamente usado.

El mecanismo de acción del AHCC podría estar relacionado con su capacidad de incrementar la presencia de microbiota beneficiosa (bacterias aerobias, ácido lácticas y bifidobacterias), y de reducir la presencia de clostridios. El AHCC actuaría pues como prebiótico.

Nuestros estudios *in vitro* han mostrado que el AHCC potencia la producción de citocinas proinflamatorias (IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) por células de la mucosa intestinal (células epiteliales y macrófagos) mediante la estimulación de TLR4/MyD88 y de las vías de traducción de señal mediadas por MAPKs y NF- $\kappa$ B. Por lo que deducimos que podría, como mecanismo independiente de su acción prebiótica, actuar potenciando la inmunidad y por tanto la función de barrera y de defensa de la mucosa. Aunque es difícil trasladar los efectos *in vitro* a efectos *in vivo*, este mecanismo de acción del AHCC podría proporcionar también una explicación molecular y celular de sus efectos sobre el manejo de los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia en pacientes con cáncer.

El AHCC podría ser una adición valiosa a las alternativas terapéuticas actuales para la EII. No obstante es obvio que se necesitan más estudios para validar estos resultados

Hemos puesto a punto una técnica que permite la determinación de las actividades MPO y AP en una misma muestra, lo que no sólo permite la utilización de menos muestras, sino que también ahorra tiempo de homogenización.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Naser, S.A., et al., *Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis*. World J Gastroenterol. **18**(5): p. 412-24.
2. Carvalho, R.S., et al., *Indeterminate colitis: a significant subgroup of pediatric IBD*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(4): p. 258-62.
3. Vind, I., et al., *Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(6): p. 1274-82.
4. Sands, B.E., et al., *Guidelines for immunizations in patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2004. **10**(5): p. 677-92.
5. Papadakis, K.A. and S.R. Targan, *Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Annu Rev Med, 2000. **51**: p. 289-98.
6. Cabre, E. and M.A. Gassull, *Nutritional therapy in liver disease*. Acta Gastroenterol Belg, 1994. **57**(1): p. 1-12.
7. Gasche, C., *Complications of inflammatory bowel disease*. Hepatogastroenterology, 2000. **47**(31): p. 49-56.
8. Sutherland, L.R., et al., *A simple, non-invasive marker of gastric damage: sucrose permeability*. Lancet, 1994. **343**(8904): p. 998-1000.
9. Loftus, E.V., Jr., et al., *Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival*. Gut, 2000. **46**(3): p. 336-43.
10. Brullet, E., et al., *[Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease]*. Med Clin (Barc), 1998. **110**(17): p. 651-6.
11. Lopez Miguel, C., et al., *[Incidence of inflammatory bowel disease in Aragon: outcome of a prospective population-based study]*. Gastroenterol Hepatol, 1999. **22**(7): p. 323-8.
12. Arin Letamendia, A., et al., *[High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study]*. Gastroenterol Hepatol, 2008. **31**(3): p. 111-6.
13. Nordenvall, B., et al., *Incidence of ulcerative colitis in Stockholm County 1955-1979*. Scand J Gastroenterol, 1985. **20**(7): p. 783-90.
14. Ekbohm, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. Gastroenterology, 1991. **100**(2): p. 350-8.
15. Bjornsson, S. and J.H. Johannsson, *Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2000. **12**(1): p. 31-8.
16. Norlen, B.J., U. Krause, and L. Bergman, *An epidemiological study of Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol, 1970. **5**(5): p. 385-90.
17. Askling, J., et al., *Incidence of paediatric Crohn's disease in Stockholm, Sweden*. Lancet, 1999. **354**(9185): p. 1179.
18. Kyle, J., *Crohn's disease in the northeastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review*. Gastroenterology, 1992. **103**(2): p. 392-9.

19. Munkholm, P., et al., *Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence*. Scand J Gastroenterol, 1992. **27**(7): p. 609-14.
20. Roth, M.P., et al., *Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews*. Gastroenterology, 1989. **96**(4): p. 1016-20.
21. Thompson, A.I. and C.W. Lees, *Genetics of ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. **17**(3): p. 831-48.
22. Friedman, S. and R.S. Blumberg, *Principles of Internal Medicine, in Harrison's Online Principles of internal medicine*. Harrison, Editor. 2013. 2013.
23. Lopez-Posadas, R., *Caracterización del efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos nitrogenados y su aplicación en el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, , in *Departament of Pharmacology*. 2010, University of Granada.
24. Kim, Y.G., et al., *The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands*. Immunity, 2008. **28**(2): p. 246-57.
25. Rehman, A., et al., *Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities*. Gut. **60**(10): p. 1354-62.
26. Biswas, A., T. Petnicki-Ocwieja, and K.S. Kobayashi, *Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity*. J Mol Med (Berl). **90**(1): p. 15-24.
27. Rioux, J.D., et al., *Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(6): p. 1863-70.
28. Peltekova, V.D., et al., *Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 471-5.
29. Waller, S., et al., *Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis*. Gut, 2006. **55**(6): p. 809-14.
30. Bodor, M., E.J. Kelly, and R.J. Ho, *Characterization of the human MDR1 gene*. Aaps J, 2005. **7**(1): p. E1-5.
31. Brant, S.R., *MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease*. Am J Hum Genet. **73**(6): p. 1282-92.
32. Ho, G.T., et al., *Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 288-96.
33. Satsangi, J., et al., *Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1996. **347**(9010): p. 1212-7.
34. Stokkers, P.C., et al., *HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Gut, 1999. **45**(3): p. 395-401.
35. Fisher, S.A., et al., *Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 710-2.
36. Ferguson, L.R., et al., *Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(29): p. 4652-61.
37. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., *Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1*



- locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis.* Immunol Lett, 2004. **95**(1): p. 31-5.
38. Louis, E., et al., *Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease.* Gut, 1996. **39**(5): p. 705-10.
  39. Sánchez de Medina, F.O.-G., M.; González, R.; Capitán-Cañadas, F.; Martínez-Augustin, O., *Host-microbe interactions. The difficult yet peaceful coexistence of the microbiota and the intestinal mucosa.* British Journal of Nutrition (in press), 2012.
  40. Thompson-Chagoyan, O.C., J. Maldonado, and A. Gil, *Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response.* Clin Nutr, 2005. **24**(3): p. 339-52.
  41. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
  42. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.* Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
  43. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract.* Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
  44. Hulten, K., et al., *Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization.* Am J Gastroenterol, 2001. **96**(5): p. 1529-35.
  45. Romero, C., et al., *Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction.* Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(2): p. 116-25.
  46. Ellingson, J.L., J.J. Koziczkowski, and J.L. Anderson, *Comparison of PCR prescreening to two cultivation procedures with PCR confirmation for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in U.S. Department of Agriculture fecal check test samples.* J Food Prot, 2004. **67**(10): p. 2310-4.
  47. Bernstein, C.N., et al., *Population-based case control study of seroprevalence of Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(3): p. 1129-35.
  48. Garcia Rodriguez, L.A., *Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population.* Aliment Pharmacol Ther, 2006. **22**(4): p. 309-15.
  49. Mylonaki, M., et al., *Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(5): p. 481-7.
  50. Parent, K. and P. Mitchell, *Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (group Va) bacteria in Crohn's disease.* Gastroenterology, 1978. **75**(3): p. 368-72.
  51. Matsuda, H., et al., *Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis.* J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(1): p. 61-8.
  52. Robertson, D.J. and R.S. Sandler, *Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature.* Inflamm Bowel Dis, 2001. **7**(1): p. 51-7.

53. Triantafillidis, J., M. E., and G. F., *Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease*. Drug Des Devel Ther. , 2011. **6**(5): p. 185-210.
54. Greenberg, G.R., *Antibiotics should be used as first-line therapy for Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2004. **10**(3): p. 318-20.
55. Ihasz, M., et al., *Surgical relations of Crohn's disease and the frequency of recurrence*. Acta Chir Hung, 1995. **35**(1-2): p. 63-75.
56. Breuer-Katschinski, B.D., N. Hollander, and H. Goebell, *Effect of cigarette smoking on the course of Crohn's disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(3): p. 225-8.
57. Khalili, H., et al., *Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease*. Gut.
58. Zapata, L.B., et al., *Contraceptive use among women with inflammatory bowel disease: A systematic review*. Contraception, 2010. **82**(1): p. 72-85.
59. Cornish, J., et al., *The risk of oral contraceptives in the etiology of IBD: a meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**: p. 2394-2400.
60. Boyko, E.J., et al., *Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 1988. **23**(9): p. 1147-52.
61. Radford-Smith, G.L., et al., *Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gut, 2002. **51**(6): p. 808-13.
62. Cosnes, J., et al., *Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis*. Gut, 2002. **51**(6): p. 803-7.
63. Van Kruiningen, H.J., *Lack of support for a common etiology in Johne's disease of animals and Crohn's disease in humans*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(3): p. 183-91.
64. Merrett, M.N., et al., *Smoking may prevent pouchitis in patients with restorative proctocolectomy for ulcerative colitis*. Gut, 1996. **38**(3): p. 362-4.
65. Mahid, S.S., et al., *The role of smoking in Crohn's disease as defined by clinical variables*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(11): p. 2897-903.
66. Koutroubakis, I., I. Vlachonikolis, and E. Kourooumalis, *Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review*. Inflamm Bowel Dis, 2002. **8**: p. 277-286.
67. de Saussure, P., et al., *Appendectomy, smoking habits and the risk of developing ulcerative colitis: a case control study in private practice setting*. Gastroenterol Clin Biol, 2007. **31**(5): p. 493-7.
68. Chiodini, R.J., et al., *Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 1984. **29**(12): p. 1073-9.
69. Cosnes, J., et al., *Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 1999. **13**(11): p. 1403-11.
70. Cabre, E. and E. Domenech, *Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol. **18**(29): p. 3814-22.
71. Rubin, D.T. and S.B. Hanauer, *Smoking and inflammatory bowel disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2000. **12**(8): p. 855-62.
72. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. A case-control study*. Scand J Gastroenterol, 1987. **22**(9): p. 1130-6.

73. Cosnes, J., *Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(3): p. 481-96.
74. Calkins, B.M., *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease*. Dig Dis Sci, 1989. **34**(12): p. 1841-54.
75. Somerville, K.W., et al., *Smoking and Crohn's disease*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **289**(6450): p. 954-6.
76. Samuelsson, S.M., et al., *Risk factors for extensive ulcerative colitis and ulcerative proctitis: a population based case-control study*. Gut, 1991. **32**(12): p. 1526-30.
77. Aldhous, M.C., et al., *Smoking habit and load influence age at diagnosis and disease extent in ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(3): p. 589-97.
78. Costa Ribas, C., Castiñeira Pérez, C., . *Enfermedad Inflamatoria Intestinal, C.a.S. Galicia, Editor. 2012*. 2012 [cited].
79. Sans, M., *Genética y Enfermedad Inflamatoria Intestinal, VI, No. 6*. Addiction. Vol. 93. 2006. 1341-9.
80. Pearson, M., et al., *Food intolerance and Crohn's disease*. Gut, 1993. **34**(6): p. 783-7.
81. Mokbel, M., et al., *[Effect of smoking on the long-term course of ulcerative colitis]*. Gastroenterol Clin Biol, 1998. **22**(11): p. 858-62.
82. Wong, P.Y., et al., *Antibodies to intercellular adhesion molecule-1 ameliorate the inflammatory response in acetic acid-induced inflammatory bowel disease*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **274**(1): p. 475-80.
83. Burton, P.R., et al., *Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants*. Nat Genet, 2007. **39**(11): p. 1329-37.
84. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. N Engl J Med, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
85. Gue, M., et al., *Stress-induced enhancement of colitis in rats: CRF and arginine vasopressin are not involved*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 1): p. G84-91.
86. Collins, S.M., *The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders*. Gastroenterology, 1996. **111**(6): p. 1683-99.
87. Qiu, B.S., et al., *The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis*. Nat Med, 1999. **5**(10): p. 1178-82.
88. Milde, A.M., O. Enger, and R. Murison, *The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats*. Physiol Behav, 2004. **81**(1): p. 71-84.
89. Santos, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G391-9.
90. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. Gut, 1989. **30**(4): p. 455-9.
91. Barclay, G.R.a.L.A.T., *Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum*. Gastroenterology, 1988. **94**(4): p. 994-8.

92. Shanahan, F., *Making microbes work for mankind--clever trick or a glimpse of the future for IBD treatment?* Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 667-8.
93. Bamias, G., et al., *Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation.* Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 654-66.
94. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells.* Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
95. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma.* Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
96. Kirsner, J.B., *Inflammatory bowel disease. Considerations of etiology and pathogenesis.* Am J Gastroenterol, 1978. **69**(3 Pt 1): p. 253-71.
97. Arfors, K.E., G. Rutili, and E. Svensjo, *Microvascular transport of macromolecules in normal and inflammatory conditions.* Acta Physiol Scand Suppl, 1979. **463**: p. 93-103.
98. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion.* J Leukoc Biol, 1994. **55**(5): p. 662-75.
99. Grisham, M.B., *Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease.* Lancet, 1994. **344**(8926): p. 859-61.
100. Grisham, M.B., D. Jour'd'Heuil, and D.A. Wink, *Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation.* Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. G315-21.
101. Goke, M. and D.K. Podolsky, *Regulation of the mucosal epithelial barrier.* Baillieres Clin Gastroenterol, 1996. **10**(3): p. 393-405.
102. Wilson, A.J. and P.R. Gibson, *Epithelial migration in the colon: filling in the gaps.* Clin Sci (Lond), 1997. **93**(2): p. 97-108.
103. Olaison, G., R. Sjodahl, and C. Tagesson, *Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease. A possible pathogenic factor.* Scand J Gastroenterol, 1990. **25**(4): p. 321-8.
104. Sartor, R.B., *Postoperative recurrence of Crohn's disease: the enemy is within the fecal stream.* Gastroenterology, 1998. **114**(2): p. 398-400.
105. Mayer, L., et al., *Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 1991. **100**(1): p. 3-12.
106. Kern, F., Jr., et al., *The motility of the distal colon in nonspecific ulcerative colitis.* Gastroenterology, 1951. **19**(3): p. 492-503.
107. Collins, S.M., *Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(3): p. G315-8.
108. Tomita, R. and K. Tanjoh, *Role of nitric oxide in the colon of patients with ulcerative colitis.* World J Surg, 1998. **22**(1): p. 88-91; discussion 92.
109. McCafferty, D.M., J.L. Wallace, and K.A. Sharkey, *Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat.* Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 1): p. G272-80.

110. Sparberg, M., J. Fennessy, and J.B. Kirsner, *Ulcerative proctitis and mild ulcerative colitis: A study of 220 patients*. Medicine (Baltimore), 1966. **45**(5): p. 391-412.
111. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
112. Kotler, D.P., *Cachexia*. Ann Intern Med, 2000. **133**(8): p. 622-34.
113. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 2**: p. S294-304.
114. Gasche, C., et al., *Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency*. Dig Dis Sci, 1994. **39**(9): p. 1930-4.
115. Altman, A.R., C. Maltz, and H.D. Janowitz, *Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis: report of three cases, review of the literature, and evaluation of modes of therapy*. Dig Dis Sci, 1979. **24**(4): p. 282-5.
116. Heits, F., et al., *Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(7): p. 757-60.
117. Loftus, E.V., Jr., et al., *Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(9): p. 2308-12.
118. Caspi, O., et al., *The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not?* Leuk Lymphoma, 1995. **17**(3-4): p. 255-62.
119. Gupta, R.B. and et al., *Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study*. Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1099-105.
120. Rutter, M., et al., *Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 451-9.
121. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. Trends Immunol, 2005. **26**(6): p. 318-25.
122. Eberhart, C.E., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1183-8.
123. Sinicrope, F.A. and S. Gill, *Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 63-75.
124. Szlosarek, P.W. and F.R. Balkwill, *Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours*. Lancet Oncol, 2003. **4**(9): p. 565-73.
125. Burstein, E. and E.R. Fearon, *Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 464-7.
126. Rath, H.C., et al., *Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2277-85.
127. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 3-9.
128. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
129. Lang, L., *AGA advocacy helps prompt IBD act*. Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 403-4.

130. Sanchez de Medina, F., et al., *Host-microbe interactions: the difficult yet peaceful coexistence of the microbiota and the intestinal mucosa*. Br J Nutr. **109 Suppl 2**: p. S12-20.
131. Ringwood, L. and L. Li, *The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation*. Cytokine, 2008. **42**(1): p. 1-7.
132. Fukata, M., et al., *Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis*. Inflamm Bowel Dis. **17**(7): p. 1464-73.
133. Liu, Y., et al., *TLR4 monoclonal antibody blockade suppresses dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice*. J Gastroenterol Hepatol. **25**(1): p. 209-14.
134. Lee, J., et al., *Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(1): p. 27-31.
135. Inohara, et al., *NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 355-83.
136. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
137. Kim, J.G., S.J. Lee, and M.F. Kagnoff, *Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1487-95.
138. Lala, S., et al., *Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 47-57.
139. Franchi, L., R. Munoz-Planillo, and G. Nunez, *Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes*. Nat Immunol. **13**(4): p. 325-32.
140. Rathinam, V.A., S.K. Vanaja, and K.A. Fitzgerald, *Regulation of inflammasome signaling*. Nat Immunol. **13**(4): p. 333-2.
141. Ghayur, T., et al., *Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 619-23.
142. Kuida, K., et al., *Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme*. Science, 1995. **267**(5206): p. 2000-3.
143. Li, P., et al., *Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock*. Cell, 1995. **80**(3): p. 401-11.
144. Lenardo, M.J. and D. Baltimore, *NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control*. Cell, 1989. **58**(2): p. 227-9.
145. Baeuerle, P.A., *The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**(1): p. 63-80.
146. Grilli, M., J.J. Chiu, and M.J. Lenardo, *NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system*. Int Rev Cytol, 1993. **143**: p. 1-62.
147. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.

148. Siebenlist, U., K. Brown, and E. Claudio, *Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 435-45.
149. Dejardin, E., *The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1161-79.
150. Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown, *Structure, regulation and function of NF-kappa B*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 405-55.
151. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. Science, 1988. **242**(4878): p. 540-6.
152. Cheng, Q., et al., *NK-kappa B subunit-specific regulation of the I kappa B alpha promoter*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13551-7.
153. Huxford, T., S. Malek, and G. Ghosh, *Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 533-40.
154. Greten, F.R. and M. Karin, *The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer*. Cancer Lett, 2004. **206**(2): p. 193-9.
155. Maniatis, T., *Catalysis by a multiprotein IkappaB kinase complex*. Science, 1997. **278**(5339): p. 818-9.
156. Mercurio, F., et al., *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. Science, 1997. **278**(5339): p. 860-6.
157. Woronicz, J.D., et al., *IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK*. Science, 1997. **278**(5339): p. 866-9.
158. Zandi, E., et al., *The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation*. Cell, 1997. **91**(2): p. 243-52.
159. Karin, M. and F.R. Greten, *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 749-59.
160. Muller, J.M., H.W. Ziegler-Heitbrock, and P.A. Baeuerle, *Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects*. Immunobiology, 1993. **187**(3-5): p. 233-56.
161. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-79.
162. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
163. Moynagh, P.N., *The NF-kappaB pathway*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4589-92.
164. Neurath, M.F., et al., *Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 998-1004.
165. Conner, E.M., et al., *Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **282**(3): p. 1615-22.

166. Dieleman, L.A., et al., *Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines*. Clin Exp Immunol, 1998. **114**(3): p. 385-91.
167. Jobin, C., et al., *Mediation by NF-kappa B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors*. Gut, 1998. **42**(6): p. 779-87.
168. Rogler, G., et al., *Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa*. Gastroenterology, 1998. **115**(2): p. 357-69.
169. Becker, C., et al., *Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(5): p. 693-706.
170. Becker, C., et al., *Regulation of IL-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: roles of NF-kappaB, CCAAT/enhancer-binding protein beta, and PU.1 and identification of a novel repressor element (GA-12) that responds to IL-4 and prostaglandin E(2)*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2608-18.
171. Wang, L., et al., *IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia*. J Immunol. , 2003. **171**(6): p. 3194-201.
172. Nenci, A., et al., *Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 557-61.
173. Zaph, C., et al., *Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 552-6.
174. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. . Chem Rev. , 2001 **101**(8): p. 2449-76.
175. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways*. J Mol Med (Berl), 1996. **74**(10): p. 589-607.
176. Treisman, R., *Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators*. Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(1): p. 96-101.
177. Lewis, A.J. and A.M. Manning, *New targets for anti-inflammatory drugs*. Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**(4): p. 489-94.
178. Bianchi, M., et al., *Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanyldrazone*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 927-36.
179. Tracey, K.J., *Suppression of TNF and other proinflammatory cytokines by the tetravalent guanyldrazone CNI-1493*. Prog Clin Biol Res, 1998. **397**: p. 335-43.
180. Mitsuyama, K., et al., *Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease*. Int J Mol Med, 2006. **17**(3): p. 449-55.
181. Waetzig, G.H., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5342-51.
182. Assi, K., et al., *The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis*. Immunology, 2006. **118**(1): p. 112-21.
183. Darnell, J.E., Jr., *STATs and gene regulation*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1630-5.



184. Fu, X.Y., et al., *The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7840-3.
185. Manning, A., *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.* ed 3. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1999: p. 1159-1176.
186. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.* Nature, 1997. **387**(6636): p. 917-21.
187. Naka, T., et al., *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor.* Nature, 1997. **387**(6636): p. 924-9.
188. Suzuki, A., *Gastroenterology* Gastroenterology, 2000. **118**(A614).
189. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor.* Cell, 1994. **79**(7): p. 1147-56.
190. Tontonoz, P., et al., *mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer.* Genes Dev, 1994. **8**(10): p. 1224-34.
191. Dubuquoy, L., et al., *PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases.* Gut, 2006. **55**(9): p. 1341-9.
192. Su, C.G., et al., *A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response.* J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 383-9.
193. Rousseaux, C., et al., *Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.* J Exp Med, 2005. **201**: p. 1205-1215.
194. Neurath, M.F., et al., *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice.* J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1281-90.
195. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.* Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 795-803.
196. Hollenbach, E., et al., *Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease.* J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 14981-8.
197. Fichtner-Feigl, S., et al., *Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides.* J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3057-71.
198. Elson, C.O., et al., *Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance.* J Immunol, 1996. **157**(5): p. 2174-85.
199. Neurath, M.F., et al., *Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance.* J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2605-16.
200. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice.* Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
201. Tanaka, T., et al., *A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate.* Cancer Sci, 2003. **94**(11): p. 965-73.
202. Dieleman, L.A., et al., *Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice.* Gastroenterology, 1994. **107**(6): p. 1643-52.
203. Cooper, H.S., et al., *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis.* Lab Invest, 1993. **69**(2): p. 238-49.

204. Cooper, H.S., et al., *Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(4): p. 757-68.
205. Dignass, A., et al., *Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis*. *J Crohns Colitis*. **6**(10): p. 965-90.
206. Van Assche, G., et al., *Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations*. *J Crohns Colitis*. **7**(1): p. 1-33.
207. Friedman, S., Blumberg, R.S., *Principles of Internal Medicine, in Harrison's Online Principles of internal medicine*, Harrison, Editor. 2013.
208. Gisbert, J.P., et al., *Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review*. *Dig Dis Sci*, 2002. **47**(3): p. 471-88.
209. Sutherland, L., et al., *Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(4): p. CD000544.
210. Azad Khan, A.K., J. Piris, and S.C. Truelove, *An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine*. *Lancet*, 1977. **2**(8044): p. 892-5.
211. van Hees, P.A., J.H. Bakker, and J.H. van Tongeren, *Effect of sulphapyridine, 5-aminosalicylic acid, and placebo in patients with idiopathic proctitis: a study to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine*. *Gut*, 1980. **21**(7): p. 632-5.
212. Nikolaus, S., U. Folsch, and S. Schreiber, *Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease*. *Hepatogastroenterology*, 2000. **47**(31): p. 71-82.
213. Greenfield, S.M., et al., *Review article: the mode of action of the aminosalicylates in inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1993. **7**(4): p. 369-83.
214. Wahl, C., et al., *Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(5): p. 1163-74.
215. Martinez-Augustin, O., et al., *Genomic analysis of sulfasalazine effect in experimental colitis is consistent primarily with the modulation of NF-kappaB but not PPAR-gamma signaling*. *Pharmacogenet Genomics*, 2009. **19**(5): p. 363-72.
216. Tromm, A., T. Griga, and B. May, *Oral mesalazine for the treatment of Crohn's disease: clinical efficacy with respect to pharmacokinetic properties*. *Hepatogastroenterology*, 1999. **46**(30): p. 3124-35.
217. Liptay, S., et al., *Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine*. *Br J Pharmacol*, 1999. **128**(7): p. 1361-9.
218. Shanahan, F., et al., *Sulfasalazine inhibits the binding of TNF alpha to its receptor*. *Immunopharmacology*, 1990. **20**(3): p. 217-24.
219. Crotty, B., et al., *Inhibition of binding of interferon-gamma to its receptor by salicylates used in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1992. **33**(10): p. 1353-7.

220. Lauritsen, K., et al., *Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E2 and leukotriene B4 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 1986. **91**(4): p. 837-44.
221. Dallegri, F., et al., *Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis*. *Gut*, 1990. **31**(2): p. 184-6.
222. Sandoval, M., *Peroxynitrite-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells is attenuated by mesalamine* 1997. *Gastroenterology*. **113**(5): p. 1480-8.
223. Burrell, G.C., et al., *Effects of mesalamine on the hsp72 stress response in rat IEC-18 intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 1997. **113**(5): p. 1474-9.
224. MacDermott, R.P., *Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(12): p. 3343-5.
225. Schroeder, K.W., W.J. Tremaine, and D.M. Ilstrup, *Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(26): p. 1625-9.
226. Sninsky, C.A., et al., *Oral mesalamine (Asacol) for mildly to moderately active ulcerative colitis. A multicenter study*. *Ann Intern Med*, 1991. **115**(5): p. 350-5.
227. O'Morain, C., et al., *Reversible male infertility due to sulphasalazine: studies in man and rat*. *Gut*, 1984. **25**(10): p. 1078-84.
228. Franklin, J.L. and H.H. Rosenberg, *Impaired folic acid absorption in inflammatory bowel disease: effects of salicylazosulfapyridine (Azulfidine)*. *Gastroenterology*, 1973. **64**(4): p. 517-25.
229. Novis, B.H., et al., *Nephrotic syndrome after treatment with 5-aminosalicylic acid*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1988. **296**(6634): p. 1442.
230. Barbour, V.M. and P.F. Williams, *Nephrotic syndrome associated with sulphasalazine*. *Bmj*, 1990. **301**(6755): p. 818.
231. Smoak, K.A. and J.A. Cidrowski, *Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation*. *Mech Ageing Dev*, 2004. **125**(10-11): p. 697-706.
232. Webster, J.I., L. Tonelli, and E.M. Sternberg, *Neuroendocrine regulation of immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 125-63.
233. Singleton, J.W., et al., *National Cooperative Crohn's Disease Study: adverse reactions to study drugs*. *Gastroenterology*, 1979. **77**(4 Pt 2): p. 870-82.
234. Bjarnason, I., et al., *Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1997. **40**(2): p. 228-33.
235. Abitbol, V., et al., *Metabolic bone assessment in patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1995. **108**(2): p. 417-22.
236. Truelove, S.C. and L.J. Witts, *Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial*. *Br Med J*, 1955. **2**(4947): p. 1041-8.
237. Rutgeerts, P., et al., *A comparison of budesonide with prednisolone for active Crohn's disease*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(13): p. 842-5.

238. Lennard, L., *The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine*. Eur J Clin Pharmacol, 1992. **43**(4): p. 329-39.
239. Jolivet, J., et al., *Synthesis, retention, and biological activity of methotrexate polyglutamates in cultured human breast cancer cells*. J Clin Invest, 1982. **70**(2): p. 351-60.
240. Allegra, C.J., et al., *Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(15): p. 4881-5.
241. Baggott, J.E., W.H. Vaughn, and B.B. Hudson, *Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide*. Biochem J, 1986. **236**(1): p. 193-200.
242. Egan, L.J., et al., *Systemic and intestinal pharmacokinetics of methotrexate in patients with inflammatory bowel disease*. Clin Pharmacol Ther, 1999. **65**(1): p. 29-39.
243. Jolivet, J. and B.A. Chabner, *Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH<sub>2</sub>-10-CH<sub>3</sub>-pteroylglutamate<sup>4</sup> and 4-NH<sub>2</sub>-10-CH<sub>3</sub>-pteroylglutamate<sup>5</sup> to dihydrofolate reductase*. J Clin Invest, 1983. **72**(3): p. 773-8.
244. Morgan, S.L., et al., *Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial*. Ann Intern Med, 1994. **121**(11): p. 833-41.
245. Gorlick, R., et al., *Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia*. N Engl J Med, 1996. **335**(14): p. 1041-8.
246. Flanagan, W.M., et al., *Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 803-7.
247. Cominelli, F., et al., *Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis*. Gastroenterology, 1992. **103**(1): p. 65-71.
248. Schreiber, S., et al., *Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1461-72.
249. Fedorak, R.N., et al., *Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1473-82.
250. Podolsky, D.K., et al., *Attenuation of colitis in the cotton-top tamarin by anti-alpha 4 integrin monoclonal antibody*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 372-80.
251. Knight, D.M., et al., *Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody*. Mol Immunol, 1993. **30**(16): p. 1443-53.
252. Suitters, A.J., et al., *Differential effect of isotype on efficacy of anti-tumor necrosis factor alpha chimeric antibodies in experimental septic shock*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 849-56.

253. Reimund, J.M., et al., *In vitro effects of oxpentifylline on inflammatory cytokine release in patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 1997. **40**(4): p. 475-80.
254. Hartmann, G., et al., *Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(1): p. 22-30.
255. Vasiliauskas, E.A., et al., *An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease*. Gastroenterology, 1999. **117**(6): p. 1278-87.
256. Juffermans, N.P., et al., *Thalidomide suppresses Up-regulation of human immunodeficiency virus coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4+ T cells in humans*. J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1813-6.
257. Sykes, A.P., et al., *The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 1999. **13**(11): p. 1535-42.
258. Richards, C.D., et al., *Adenovirus vectors for cytokine gene expression*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **762**: p. 282-92; discussion 292-3.
259. Wilson, J.M., *Adenoviruses as gene-delivery vehicles*. N Engl J Med, 1996. **334**(18): p. 1185-7.
260. Chao, H., et al., *Persistent expression of canine factor IX in hemophilia B canines*. Gene Ther, 1999. **6**(10): p. 1695-704.
261. During, M.J., et al., *Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector*. Nat Med, 1998. **4**(10): p. 1131-5.
262. Abe, A., et al., *In vitro cell-free conversion of noninfectious Moloney retrovirus particles to an infectious form by the addition of the vesicular stomatitis virus surrogate envelope G protein*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6356-61.
263. Schreiber, S., et al., *Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease*. Gastroenterology, 2001. **120**(6): p. 1339-46.
264. Lomer, M.C., *Dietary and nutritional considerations for inflammatory bowel disease*. Proc Nutr Soc. **70**(3): p. 329-35.
265. Avrelija Cencic and Chingwaru, *[Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease]*. Med Clin (Barc), 1998. **110**(17): p. 651-6.
266. Recio, M.C., I. Andujar, and J.L. Rios, *Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential*. Curr Med Chem. **19**(14): p. 2088-103.
267. Szajewska, H., et al., *Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. **42**(5): p. 454-75.
268. Guarino, A., et al., *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: executive summary*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008. **46**(5): p. 619-21.
269. Salminen, S., et al., *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. Br J Nutr, 1998. **80 Suppl 1**: p. S147-71.

270. Avrelija, C. and C. Walter, *The role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health*. *Nutrients*, 2010. **2**: p. 611-625.
271. Klaenhammer, T.R., et al., *The impact of probiotics and prebiotics on the immune system*. *Nat Rev Immunol*. **12**(10): p. 728-34.
272. Usha, V. and R. Natarajan, *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond*. *Gastroenterol Research and Practice*, 2012. **2012**.
273. O'Flaherty, S., et al., *How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity?* *Gut Microbes*, 2010. **1**(5): p. 293-300.
274. Roberfroid, M., et al., *Prebiotic effects: metabolic and health benefits*. *Br J Nutr*. **104 Suppl 2**: p. S1-63.
275. Guarner, F., *Prebiotics in inflammatory bowel diseases*. *Br J Nutr*, 2007. **98 Suppl 1**: p. S85-9.
276. Vaughan, E.E., et al., *The intestinal LABs*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002. **82**(1-4): p. 341-52.
277. Le Blay, G., et al., *Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats*. *J Nutr*, 1999. **129**(12): p. 2231-5.
278. Morrison, D.J., et al., *Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate?* *Br J Nutr*, 2006. **96**(3): p. 570-7.
279. Sakata, T., et al., *Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vitro*. *Proc Nutr Soc*, 2003. **62**(1): p. 73-80.
280. Jack, R.W., J.R. Tagg, and B. Ray, *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. *Microbiol Rev*, 1995. **59**(2): p. 171-200.
281. Lievin, V., et al., *Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity*. *Gut*, 2000. **47**(5): p. 646-52.
282. Boris, S., et al., *Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential*. *J Appl Microbiol*, 2001. **91**(2): p. 328-33.
283. Collado, M.C., et al., *Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion*. *J Food Prot*, 2005. **68**(12): p. 2672-8.
284. Kaila, M., et al., *Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain*. *Pediatr Res*, 1992. **32**(2): p. 141-4.
285. Mack, D.R., et al., *Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(4 Pt 1): p. G941-50.
286. Madsen, K., et al., *Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(3): p. 580-91.
287. Rinne, M., et al., *Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses*. *J Pediatr*, 2005. **147**(2): p. 186-91.
288. Gill, H.S., K.J. Rutherford, and M.L. Cross, *Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes*. *J Clin Immunol*, 2001. **21**(4): p. 264-71.

289. Ogawa, T., et al., *Natural killer cell activities of synbiotic Lactobacillus casei ssp. casei in conjunction with dextran*. Clin Exp Immunol, 2006. **143**(1): p. 103-9.
290. Sheih, Y.H., et al., *Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium Lactobacillus rhamnosus HN001*. J Am Coll Nutr, 2001. **20**(2 Suppl): p. 149-56.
291. Gill, H.S., et al., *Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic Bifidobacterium lactis HN019*. Am J Clin Nutr, 2001. **74**(6): p. 833-9.
292. Arunachalam, K., H.S. Gill, and R.K. Chandra, *Enhancement of natural immune function by dietary consumption of Bifidobacterium lactis (HN019)*. Eur J Clin Nutr, 2000. **54**(3): p. 263-7.
293. Yasui, H., et al., *Immunomodulatory function of lactic acid bacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999. **76**(1-4): p. 383-9.
294. Isolauri, E., et al., *Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by Lactobacillus casei GG*. Vaccine, 1995. **13**(3): p. 310-2.
295. Zalashko, M.V., H.I. Anisimova, and L.G. Bortkevich, *[Antimicrobial and immunomodulatory activities of Lactobacillus acidophilus Ke-10]*. Prikl Biokhim Mikrobiol, 1997. **33**(3): p. 305-9.
296. Marin, M.L., et al., *Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by Streptococcus thermophilus: comparison with Bifidobacterium sp. and Lactobacillus bulgaricus*. J Food Prot, 1998. **61**(7): p. 859-64.
297. Rioux, K.P. and R.N. Fedorak, *Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease*. J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(3): p. 260-3.
298. O'Flaherty, S., et al., *How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity?* Gut Microbes. **1**(5): p. 293-300.
299. Borruel, N., et al., *Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria*. Gut, 2002. **51**(5): p. 659-64.
300. Schultz, M., et al., *Immunomodulatory consequences of oral administration of Lactobacillus rhamnosus strain GG in healthy volunteers*. J Dairy Res, 2003. **70**(2): p. 165-73.
301. Pathmakanthan, S., et al., *Lactobacillus plantarum 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon*. J Gastroenterol Hepatol, 2004. **19**(2): p. 166-73.
302. Gill, H.S., *Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(5): p. 755-73.
303. Saavedra, J., *Probiotics and infectious diarrhea*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(1 Suppl): p. S16-8.
304. de Vrese, M., et al., *Probiotics--compensation for lactase insufficiency*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 421S-429S.
305. Ishikawa, H., et al., *Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis*. J Am Coll Nutr, 2003. **22**(1): p. 56-63.
306. Marteau, P.R., et al., *Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 430S-436S.

307. Damaskos, D. and G. Kolios, *Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'*. Br J Clin Pharmacol, 2008. **65**(4): p. 453-67.
308. Schultz, M., *Clinical use of E. coli Nissle 1917 in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(7): p. 1012-8.
309. Scott, F.I. and F. Aberra, *VSL#3 for ulcerative colitis: growing evidence?* Gastroenterology. **140**(5): p. 1685-6; discussion 1686-7.
310. Sturm, A., et al., *Escherichia coli Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1452-65.
311. Boudeau, J., et al., *Inhibitory effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive E. coli strains isolated from patients with Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **18**(1): p. 45-56.
312. Rembacken, B.J., et al., *Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial*. Lancet, 1999. **354**(9179): p. 635-9.
313. Guslandi, M., et al., *Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 2000. **45**(7): p. 1462-4.
314. Marteau, P., et al., *Ineffectiveness of Lactobacillus johnsonii LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial*. Gut, 2006. **55**(6): p. 842-7.
315. Prantera, C., et al., *Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG*. Gut, 2002. **51**(3): p. 405-9.
316. Schrezenmeir, J. and M. de Vrese, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 361S-364S.
317. Vlieger, A.M., et al., *Tolerance and safety of Lactobacillus paracasei ssp. paracasei in combination with Bifidobacterium animalis ssp. lactis in a prebiotic-containing infant formula: a randomised controlled trial*. Br J Nutr, 2009. **102**(6): p. 869-75.
318. Chouraqui, J.P., et al., *Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1365-73.
319. Puccio, G., et al., *Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live Bifidobacterium longum BL999 and prebiotics*. Nutrition, 2007. **23**(1): p. 1-8.
320. Underwood, M.A., et al., *A randomized placebo-controlled comparison of 2 prebiotic/probiotic combinations in preterm infants: impact on weight gain, intestinal microbiota, and fecal short-chain fatty acids*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **48**(2): p. 216-25.
321. Furrie, E., et al., *Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial*. Gut, 2005. **54**(2): p. 242-9.
322. Bomba, A., et al., *Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids*. Br J Nutr, 2002. **88** Suppl 1: p. S95-9.



323. Chermesh, I., et al., *Failure of Synbiotic 2000 to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(2): p. 385-9.
324. Shah, S.K., et al., *An evidence-based review of a Lentinula edodes mushroom extract as complementary therapy in the surgical oncology patient*. JPEN J Parenter Enteral Nutr. **35**(4): p. 449-58.
325. Turner, J. and U. Chaudhary, *Dramatic prostate-specific antigen response with activated hemicellulose compound in metastatic castration-resistant prostate cancer*. Anticancer Drugs, 2009. **20**(3): p. 215-6.
326. Daddaoua, A., et al., *Active hexose correlated compound acts as a prebiotic and is antiinflammatory in rats with hapten-induced colitis*. J Nutr, 2007. **137**(5): p. 1222-8.
327. Kidd, P.M., *The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment*. Altern Med Rev, 2000. **5**(1): p. 4-27.
328. Matsui, Y., et al., *Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study*. J Hepatol, 2002. **37**(1): p. 78-86.
329. Matsushita, K., et al., *Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma*. Anticancer Drugs, 1998. **9**(4): p. 343-50.
330. Gao, Y., et al., *Active hexose correlated compound enhances tumor surveillance through regulating both innate and adaptive immune responses*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(10): p. 1258-66.
331. Ghoneum, et al., *Immunomodulatory and anticancer effects of active hemicellulose compound (AHCC)*. Int J Immunother., 1995. **11**: p. 23-8.
332. Wakame, A., *Protective effects of active hexose correlated compound (AHCC) on the onset of diabetes induced by streptozotocin in the rat*. Biomed Res., 1999. **20**: p. 145-52.
333. Sun, B., Wakame, K., Mukoda, T., Toyoshima, A., Kanazawa, T., Kosuna, K., *Preventive effects of AHCC on carbon tetrachloride induced liver injury in mice*. Nat Med, 1997. **51**: p. 310-5.
334. Aviles, H., et al., *Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions*. J Appl Physiol, 2004. **97**(4): p. 1437-44.
335. Aviles, H., et al., *Active hexose correlated compound enhances resistance to Klebsiella pneumoniae infection in mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions*. J Appl Physiol, 2003. **95**(2): p. 491-6.
336. Ye, S.F., et al., *Suppressive effects of Active Hexose Correlated Compound on the increased activity of hepatic and renal ornithine decarboxylase induced by oxidative stress*. Life Sci, 2003. **74**(5): p. 593-602.
337. Ritz, B.W., et al., *Supplementation with active hexose correlated compound increases the innate immune response of young mice to primary influenza infection*. J Nutr, 2006. **136**(11): p. 2868-73.
338. Wang, S., et al., *Oral administration of active hexose correlated compound enhances host resistance to West Nile encephalitis in mice*. J Nutr, 2009. **139**(3): p. 598-602.

339. Roman, B.E., et al., *Short-term supplementation with active hexose correlated compound improves the antibody response to influenza B vaccine*. Nutr Res. **33**(1): p. 12-7.
340. Ritz, B.W., *Supplementation with active hexose correlated compound increases survival following infectious challenge in mice*. Nutr Rev, 2008. **66**(9): p. 526-31.
341. Hyodo, I., et al., *Nationwide survey on complementary and alternative medicine in cancer patients in Japan*. J Clin Oncol, 2005. **23**(12): p. 2645-54.
342. Cowawintaweewat, S., et al., *Prognostic improvement of patients with advanced liver cancer after active hexose correlated compound (AHCC) treatment*. Asian Pac J Allergy Immunol, 2006. **24**(1): p. 33-45.
343. Hirose, A., et al., *The influence of active hexose correlated compound (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **222**(2): p. 152-8.
344. Mach, C.M., et al., *Evaluation of active hexose correlated compound hepatic metabolism and potential for drug interactions with chemotherapy agents*. J Soc Integr Oncol, 2008. **6**(3): p. 105-9.
345. Uno, K., K. Kosuna, and B. Sun, *Active hexose correlated compound (AHCC) improves immunological parameters and performance status of patients with solid tumors*. Biotherapy 2000. **14**: p. 303-309.
346. Won, J., *The hematoimmunologic effect of AHCC for Korean patients with various cancers*. Biotherapy, 2002(16): p. 560-564.
347. Terakawa, N., et al., *Immunological effect of active hexose correlated compound (AHCC) in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled trial*. Nutr Cancer, 2008. **60**(5): p. 643-51.
348. Yin, Z., H. Fujii, and T. Walshe, *Effects of active hexose correlated compound on frequency of CD4+ and CD8+ T cells producing interferon-gamma and/or tumor necrosis factor-alpha in healthy adults*. Hum Immunol. **71**(12): p. 1187-90.
349. Lee, W.W., et al., *Active Hexose Correlated Compound promotes T helper (Th) 17 and 1 cell responses via inducing IL-1beta production from monocytes in humans*. Cell Immunol. **275**(1-2): p. 19-23.
350. Lopez-Posadas, R., et al., *Bovine glycomacropptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis*. J Nutr. **140**(11): p. 2014-9.
351. Lopez-Posadas, R., et al., *Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF-kappaB in an intestinal epithelial cell line (IEC18)*. Br J Pharmacol. **160**(7): p. 1714-26.
352. Lopez-Posadas, R., et al., *Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(4): p. 495-506.
353. Daddaoua, A., et al., *The nutritional supplement Active Hexose Correlated Compound (AHCC) has direct immunomodulatory actions on intestinal epithelial cells and macrophages involving TLR/MyD88 and NF-kappaB/MAPK activation*. Food Chem. **136**(3-4): p. 1288-95.
354. Daddaoua, A., et al., *Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis*. J Nutr, 2006. **136**(3): p. 672-6.

355. Daddaoua, A., et al., *Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis*. J Nutr, 2005. **135**(5): p. 1164-70.
356. Requena, P., et al., *Bovine glycomacropeptide induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF-kappaB signal transduction pathways*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(7): p. 1232-40.
357. Requena, P., et al., *Bovine glycomacropeptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(4): p. 825-32.
358. Romero-Calvo, I., et al., *Intestinal inflammation and the enterocyte transportome*. Biochem Soc Trans. **39**(4): p. 1096-101.
359. Martinez-Augustin, O., et al., *Disturbances in metabolic, transport and structural genes in experimental colonic inflammation in the rat: a longitudinal genomic analysis*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 490.
360. Martinez-Augustin, O., et al., *Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(1): p. 114-27.
361. Martinez-Moya, P., et al., *Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats*. Pharmacol Res. **66**(2): p. 144-53.
362. Mascaraque, A., et al., *Valence band circular dichroism in non-magnetic Ag/Ru(0001) at normal emission*. J Phys Condens Matter. **23**(30): p. 305006.
363. Ocon, B., et al., *Active hexose-correlated compound and Bifidobacterium longum BB536 exert symbiotic effects in experimental colitis*. Eur J Nutr. **52**(2): p. 457-66.
364. Blaut, M., *Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora*. Eur J Nutr, 2002. **41 Suppl 1**: p. I11-6.
365. Dinoto, A., et al., *Modulation of rat cecal microbiota by administration of raffinose and encapsulated Bifidobacterium breve*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(1): p. 784-92.
366. Scheiffele, F. and I.J. Fuss, *Induction of TNBS colitis in mice*. Curr Protoc Immunol, 2002. **Chapter 15**: p. Unit 15 19.
367. Palmen, M.J., et al., *Non-lymphoid and lymphoid cells in acute, chronic and relapsing experimental colitis*. Clin Exp Immunol, 1995. **99**(2): p. 226-32.
368. McCormack, G., et al., *Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease*. Inflamm Res, 2001. **50**(10): p. 491-5.
369. Sanchez de Medina, F., et al., *Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(12): p. 2317-26.
370. Lopez-Posadas, R., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation*. Inflamm Bowel Dis. **17**(2): p. 543-56.
371. Arend, W.P., *Interleukin-1 receptor antagonist*. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 167-227.
372. Hartley, M.G., et al., *Sulphasalazine treatment and the colorectal mucosa-associated flora in ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 1996. **10**(2): p. 157-63.

373. Reinecker, H.C. and D.K. Podolsky, *Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8353-7.
374. Ohtsuka, Y., et al., *MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine*. Gut, 2001. **49**(4): p. 526-33.
375. Sainathan, S.K., et al., *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(1): p. 88-99.
376. Xu, Y., N.H. Hunt, and S. Bao, *The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation*. Cell Res, 2008. **18**(12): p. 1220-9.
377. Shea-Donohue, T., et al., *Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis*. Innate Immun, 2008. **14**(2): p. 117-24.
378. van Vliet, M.J., et al., *The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis*. PLoS Pathog. **6**(5): p. e1000879.
379. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. Gastroenterology, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
380. Goldberg, R.F., et al., *Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3551-6.
381. Tuin, A., et al., *Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats*. Gut, 2009. **58**(3): p. 379-87.
382. Molnar, K., et al., *Intestinal alkaline phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol. **18**(25): p. 3254-9.
383. Bessey, O.A., O.H. Lowry, and M.J. Brock, *A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum*. J Biol Chem, 1946. **164**: p. 321-9.
384. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.



## **VIII. ANEXO**

## 1) Índice de las tablas

<b>Tabla 1.</b> Características anatómicas y clínicas CU y EC.	pág. 12
<b>Tabla 2:</b> Conjuntos de genes implicados en la manifestación de EII	pág. 17
<b>Tabla 3:</b> Diferentes tipos de receptores tipo Toll (Toll-like receptor TLRs)	pág. 32
<b>Tabla 4:</b> Diversos fármacos fuentes del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)	pág. 47

## 2) Índice de las figuras

<b>Figura 1:</b> Estudios Poblacionales y prospectivos: CU y EC.	pág. 14
<b>Figura 2:</b> Relación entre tabaco y EII.	pág. 22
<b>Figura 3:</b> Fisiopatología de EII.	pág. 25
<b>Figura 4:</b> Polarización de células T.	Pág. 27
<b>Figura 5:</b> Mecanismo general de activación del sistema inmune.	pág. 34
<b>Figura 6:</b> Vías de traducción de señal activada por los receptores TLR4	pág. 35
<b>Figura 7:</b> Vía de traducción de señal regulada por el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)	pág. 38
<b>Figura 8:</b> Algoritmo de tratamiento en CU	pág. 46
<b>Figura 9:</b> Algoritmo de tratamiento en la CU con glucocorticoides	pág. 49
<b>Figura 10:</b> Algoritmo de manejo terapéutico CU y EC	pág. 56

## 3) Formación científicas

- Farmacéutico Interno Residente. Área de Farmacia Hospitalaria. APES. Hospital de Poniente. Mayo 2009- Mayo 2013.
- Master Productos Sanitarios IIªEd. Universidad de Granada. Curso 2012.

#### 4) Publicaciones científicas

##### Publicaciones en revistas indexadas

1. Daddaoua A, **Martínez-Plata E**, Ortega-González M, Ocón B, Aranda CJ, Zarzuelo A, Suárez MD, de Medina FS, Martínez-Augustin. O. The nutritional supplement Active Hexose Correlated Compound (AHCC) has direct immunomodulatory actions on intestinal epithelial cells and macrophages involving TLR/MyD88 and NF- $\kappa$ B/MAPK activation. *Food Chem.* 2013; 136(3-4):1288-95.
2. Morales-Molina JA, Fayet-Pérez A, **Martínez-Plata E**, Pérez-Moyano R, Molina-Arrebola MA Interaction between amorolfine and acenocoumarol. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012; 68(12):1687-8.
3. Morales-Molina JA, **Martínez-de-la-Plata JE**, Urquizar-Rodríguez O, Molina-Arrébola MA Bosentan and oral anticoagulants in HIV patients: what can learn of cases reported so far. *Hematol Rep.* 2011; 3(2).
4. Martínez-Augustin O, Hernández-Morante JJ, **Martínez-Plata E**, Sánchez de Medina F, Garaulet M Differences in AMPK expression between subcutaneous and visceral adipose tissue in morbid obesity. *Regul Pept.* 2010; 163(1-3):31-6.
5. Requena P, Daddaoua A, **Martínez-Plata E**, González M, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O Bovine glycomacropeptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17. *Br J Pharmacol.* 2008; 154 (4): 825-32.
6. Active hexose correlated compound acts as a prebiotic and is antiinflammatory in rats with hapten-induced colitis. Daddaoua A, **Martínez-Plata E**, López-Posadas R, Vieites JM, González M, Requena P, Zarzuelo A, Suárez MD, de Medina FS, Martínez-Augustin O. *J Nutr.* 2007; 137 (5):1222-8.

##### Capítulos en Libro

1. *Manejo farmacológico y clínico de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.* Herramientas Farmacoterapéuticas para el Residente de Cuarto Año en Farmacia Hospitalaria. Edita Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. **Martínez de la Plata J.E.**, Morales Molina J.A.