

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

**Programa Oficial de Posgrado en Inmunología**



**Estudio del efecto directo  
independiente de su efecto prebiótico  
de oligosacáridos no digeribles sobre  
células de la mucosa intestinal**

Tesis doctoral para aspirar al grado de doctor presentada por

**Mercedes Ortega González**

Bajo la dirección de los Doctores

Olga Martínez Augustin

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

María Dolores Suárez Ortega

**Granada, 2014**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Mercedes Ortega González  
D.L.: GR 1882-2014  
ISBN: 978-84-9083-066-6



D. Alberto Vargas Morales, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada,

Certifica: que la Tesis Doctoral titulada: “Efecto directo independiente de su efecto prebiótico de oligosacáridos no digeribles sobre células de la mucosa intestinal”, ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia Dña. Mercedes Ortega González

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 11 de marzo de 2014.

Dr. Alberto Vargas Morales



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

GRANADA, 11 de Marzo de 2014

Director/es de la Tesis

Dr. Fermín Sánchez de Medina López-Huertas  
Martínez Augustin

Dra. Olga

Dra. María Dolores Suárez Ortega

Doctorando: Mercedes Ortega González



# Índice

Summary .....	13
Introducción .....	23
1. Sistema inmunitario gastrointestinal .....	24
1.1. Barrera epitelial.....	24
Presentación de antígenos a través de IEC .....	26
1.2. Placas de Peyer.....	27
1.3. Sistema inmunitario innato.....	27
1.3.1. Péptidos antimicrobianos y mediadores solubles.....	28
1.3.2. Células del sistema inmunitario innato.....	31
1.4. Sistema inmunitario adaptativo.....	32
1.4.1. Linfocitos T de las placas de Peyer .....	32
1.4.2. Linfocitos de lámina propia.....	33
1.4.3. Linfocitos intraepiteliales .....	33
1.4.4. Linfocitos B.....	34
2. Microbiota.....	35
2.1. Receptores de reconocimiento de patógenos .....	36
2.1.1. Receptores <i>Toll-like</i> .....	36
2.1.2. Receptores <i>Nod like</i> .....	39
2.1.3. Inflamasomas .....	39
2.2. Animales axénicos o libres de gérmenes .....	40
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	42
2.4. Vías de señalización inmunológicas .....	44
2.4.1. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).....	44
2.4.2. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) .....	45



3.	Transporte hidroelectrolítico intestinal .....	48
3.1.	Absorción hidroelectrolítica .....	49
3.2.	Secreción hidroelectrolítica.....	49
3.4.	Regulación del transporte iónico .....	50
3.5.	Transporte hidroeléctrico en condiciones de inflamación.....	52
3.5.1.	Alteración epitelial .....	52
3.5.2.	Alteraciones en la secreción iónica .....	52
3.5.3.	Alteraciones en la absorción iónica.....	52
4.	Enfermedad inflamatoria intestinal .....	53
4.1.	Generalidades.....	53
4.2.	Epidemiología .....	54
4.3.	Etiología.....	55
4.3.1.	Predisposición genética.....	55
4.3.2.	Microbiota .....	56
4.3.3.	Otros factores de riesgo .....	57
4.4.	Inmunología de la EII .....	58
4.5.	Modelos experimentales de EII .....	61
5.	Oligosacáridos no digeribles: Alimentos funcionales.....	62
5.1.	Efecto prebiótico de los OND .....	63
5.1.1.	Mejora del tránsito intestinal.....	63
5.1.2.	Aumento de la absorción de Calcio.....	64
5.1.3.	Disminución del riesgo de cáncer de colon.....	64
5.1.4.	Alteraciones metabólicas .....	64
5.2.	Efectos directos de los OND (independientes de su acción prebiótica) .....	65
5.2.1.	Inhibición de la adhesión de bacterias patógenas a células intestinales .....	65
5.2.2.	Modulación de la respuesta inmunitaria .....	66

5.2.3. Regulación del transporte intestinal y de la permeabilidad intestinal	67
5.3. Fructooligosacáridos: Inulina y FOS	67
5.4. Galactooligosacáridos (GOS)	68
5.5. Oligosacáridos de leche de cabra	68
Objetivos	69
Material y Métodos	71
1. Materiales	72
2. Ensayos <i>in vitro</i>	72
2.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	72
2.2. Estudio de las vías de señalización: NF- $\kappa$ B y MAPK kinasas	73
2.3. Silenciamiento celular	73
2.4. Cepas bacterianas de <i>P. aeruginosa</i>	73
2.5. Estudio del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	74
2.6. Determinación de la formación de películas por <i>P. aeruginosa</i>	74
2.7. Ensayos de motilidad	74
2.8. Aislamiento de macrófagos mediante purificación celular magnética	75
2.9. Co-cultivo de <i>P. aeruginosa</i> y macrófagos	75
2.10. Co-cultivo de <i>P. aeruginosa</i> e IEC18	76
2.11. Extracción y cuantificación de proteínas. Western blot	76
2.12. Test de citotoxicidad	77
2.13. Extracción nuclear y determinación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B	77
3. Ensayos <i>ex vivo</i>	77
4. Ensayos <i>in vivo</i>	78
4.1. Animales de experimentación	78
4.2. Diseño experimental	79
4.2.1. Efecto de los OND en animales libre de gérmenes	79

4.2.2.	Depleción de la microbiota .....	80
4.2.3.	Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones libres de gérmenes .....	81
4.2.4.	Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones pseudo estériles.....	81
4.3.	Obtención de muestras .....	83
4.4.	Determinaciones en suero sanguíneo.....	84
4.5.	Preparación del homogenado de bacterias estéril .....	84
4.6.	Histología.....	84
4.7.	Determinación de actividades enzimáticas:.....	85
4.7.1.	Determinación de la actividad fosfatasa alcalina.....	85
4.7.2.	Determinación de la actividad leucín aminopeptidasa .....	85
4.7.3.	Determinación de las actividades disacaridasas .....	85
4.7.4.	Determinación de la actividad mieloperoxidasa .....	86
4.8.	Determinación de absorción colónica: colon ligado .....	86
4.9.	Porcentaje de materia seca en heces.....	87
4.10.	Análisis del transcriptoma de colon y yeyuno: extracción de ARN, hibridación del microarray y análisis de datos .....	87
5.	Determinaciones generales.....	88
5.1.	Determinación de citoquinas .....	88
5.2.	Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.....	88
6.	Análisis estadístico .....	90
Resultados .....		91
1.	Efecto de FOS e inulina sobre distintos mecanismos relacionados con la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	92
1.1.	Efecto de FOS e inulina sobre la proliferación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	92
1.2.	Efecto de FOS e inulina sobre la formación de biopelículas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	93

1.3.	Efecto de FOS e inulina sobre la motilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	94
1.4.	Efecto de FOS e inulina en la producción de citoquinas en macrófagos infectados con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	95
1.5.	Efecto de FOS e inulina en la Activación de NF-κB por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	96
1.6.	Efecto de la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> en la regulación por FOS e inulina	98
2.	Efecto de los OND sobre células del epitelio intestinal .....	101
2.1.	Efecto de los OND en la producción de citoquinas en células epiteliales intestinales.....	101
2.2.	Mecanismo de acción implicado en el efecto inmunomodulador de los OND en células epiteliales intestinales.....	102
2.3.	Interacción LPS/OND.....	107
3.	Efecto directo de GOS y FOS en ratones libres de gérmenes .....	109
3.1.	Determinación de parámetros generales en el efecto directo de OND en ratones libres de gérmenes y convencionales.....	109
3.2.	Efecto de los OND sobre la maduración intestinal en ratones libres de gérmenes y convencionales .....	112
3.3.	Efecto de los OND en la concentración de inmunoglobulinas en plasma sanguíneo en ratones libres de gérmenes y convencionales .....	114
3.4.	Efecto de los OND en el estudio del transcriptoma en colon y yeyuno en ratones libres de gérmenes.....	116
3.4.1.	Efecto de los OND sobre genes implicados en el metabolismo lipídico y del glutation en ratones libres de gérmenes .....	122
3.4.2.	Efecto de los OND sobre genes implicados en la modulación de la microbiota y función barrera en ratones libres de gérmenes.....	125
3.5.	Estudio postgenómico.....	125
3.6.	Efecto de los OND en la concentración de aldosterona y corticosterona en plasma sanguíneo en ratones libres de gérmenes .....	132
4.	Estudio del papel de la microbiota en la expresión de transportadores en colon.....	133

4.1. Expresión de transportadores en colon y ciego de ratones pseudo estériles.....	133
4.2. Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones libres de gérmenes.....	136
4.3. Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones pseudo estériles.....	144
Discusión.....	151
Conclusiones/Conclusions.....	181
Bibliografía.....	185
ANEXO.....	210
Índice de Esquemas.....	211
Índice de tablas.....	211
Índice de figuras.....	212

## ***Summary***

---

## Introduction

Non digestible oligosaccharides (NDOs) are products used as nutraceuticals or functional food due to their prebiotic effect. A prebiotic effect is defined as ‘the selective stimulation of growth and/or activity(ies) of one or a limited number of microbial genus(era)/species in the gut microbiota that confer(s) health benefits to the host’ [1]. Most commercialized prebiotics are complex oligosaccharides that are not degraded by intestinal enzymes, reaching the colon, where they are digested by colonic microbiota [2]. Prebiotics have been claimed to exert healthy effects in obesity, allergy and gastrointestinal disorders (infections, irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease) [1].

FOS, inulin and GOS are simple oligosaccharides widely used for their prebiotic effects and their properties as soluble fermentable fibers. GOS, inulin and FOS are rather simple oligosaccharides when compared human milk oligosaccharides in terms of molecular structure and degree of ramification. It has been previously shown that goat’s milk oligosaccharides (GMOS) are more complex and similar to human milk oligosaccharides than those of other mammalian species [3]. A study carried out in colitic rats showed that GMOS exert prebiotic effects [4].

A significant number of natural compounds have been found to inhibit bacterial growth, although their mechanism of action remains unclear in most cases [5, 6] FOS and inulin have been found to inhibit the growth of pathogenic bacteria such as *Salmonella typhimurium* [7], *S. enteritidis* [8] *Listeria monocytogenes* or the fungus *Candida albicans* [9] FOS and inulin could also inhibit the growth and other virulence factors in *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen able to infect different animals and plants [10, 11], being a frequent cause of hospital-acquired infections including ventilator associated pneumonia [12] and catheter infections in immuno-compromised patients.

In addition to their well documented prebiotic actions, NDO may be expected to be in contact with intestinal epithelial cells (IECs) in the colon and the small intestine. It is thus possible that these compounds exert direct, non-prebiotic actions on the intestinal epithelium. Insight into the

immunomodulatory effects of non absorbable oligosaccharides on IECs could open new perspectives in the treatment of intestinal inflammatory related diseases such as inflammatory bowel disease or allergies, and in the design of infant formulas.

Overall appearance and physiology are essentially normal in GF rats and mice although GF condition have been known to affect brain development and behaviour, metabolism, obesity, food digestion and overall resistance to stress and injury [13]. The lymphoid tissue of the gut of GF animals is dormant and hypoplastic but is capable of responding to antigenic stimulation [14]. The GF rodent has chronically loose stool, is hemoconcentrated and has increased water intake pointing out an abnormal water homeostasis. The cecum is enlarged and this could be related to altered cecal fluid transport. It has been suggested that absorption of water and Na is increase in cecum of GF compared to conventional rats. Any abnormality in cecal water and Na transport in germ free could be caused by abnormal cecal contents, which are characterised by an extremely low concentration of exchangeable anions, or by an abnormality intrinsic to the GF rat cecum itself [15].

The aims of this study were:

- Characterise the effect of FOS and inulin in different mechanisms of pathogenicity of *P. aeruginosa*
- Characterise the direct immunomodulatory effects of NDO in intestinal epithelial cells
- Characterise the direct effect (independent of their prebiotic actions) of FOS and GOS *in vivo*

As a consequence of the results obtained in the GF mice experiment, we added a new aim to this thesis:

- Study of the role of microbiota in hydroelectrolytic transport in colon in basal condition and experimental induce colitis in mice.



## Results

### Effects of FOS and inulin in different mechanisms related with the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*

The addition of FOS and inulin (20mg/ml) inhibited the growth and the biofilm formation of *P. aeruginosa*. FOS (5mg/ml) also inhibited swarming and twitching motility while inulin had a lower effect or none. Inulin reduced the IL-6 secretion in macrophages infected with *P. aeruginosa* while FOS also inhibited TNF $\alpha$  and IL-10 production via modulation of NF- $\kappa$ B. The inhibition as a result of FOS and inulin addition was more pronounced in the mutant ptxS (the more virulent strain) comparing with ptxR and WT strains. Finally, FOS reduced the ToxA intracellular levels in IEC-18 cells cocultured with *P. aeruginosa* while inulin had no effect.

### Immunomodulatory effect of NDOs in intestinal epithelial cells.

All tested NDOs increase GRO $\alpha$  and MCP1 secretion in IEC18 cells, in the order of efficacy GMOS>inulin>GOS>FOS, with the only exception of FOS, that had no effect on MCP1. The effect was concentration dependent and was maximum at 5 mg/ml in all cases. The addition of NDOs also resulted in an upregulation of MIP2 but no general effect on ICAM, IL6, eotaxin, CXCL10 or RANTES. The inhibitor of NF- $\kappa$ B produced a dramatic inhibition of GRO $\alpha$  and MCP1 secretion evoked by inulin, GOS or GMOS. In contrast, there was no general inhibition by the PI3K. The MAPK inhibitors tested also inhibited the cytokine secretory effect of prebiotics but to a lower extent than NF- $\kappa$ B inhibition. MyD88 and TLR4 expression was silenced by shRNA and the inductor effect of NDO was inhibited in a 42-77%. We also tested NDOs effect in human cell lines. HT29 cells responded to NDOs secreting IL-8 to a lower extent than IEC while Caco-2 and Caco-2/TC7 cell lines failed to respond to NDOs. RT-PCR analysis of TLR4 expression showed a correlation between the production of IL-8, GRO $\alpha$  and NHE3 and the expression of TLR4 in every cell line. MCP1 secretion was lower in colon explants of Tlr4 KO mice than in controls after NDOs addition.

### Effect of NDO *in vivo*

After weaning GF mice were administered a diet enriched in FOS (5%) and GOS (5%) for 4 weeks. Mice also received a sterile bacterial homogenate (SBH) and its combination with FOS or GOS to evaluate the effect of NDOs in the presence of bacterial antigens in lumen. Conventional animals were used as control. In GF conditions, NDO±SBH enlarged jejunum villi in concordance with an increase in mg protein per gr of tissue. FOS ±SBH also reduced total IgG levels in plasma in GF mice. Transcriptome analysis showed significant changes in the expression of genes that codifies barrier function proteins, microbiota modulatory genes and glutathione and lipid metabolism genes in jejunum and colon of mice treated with NDOs. Some of this results were validated by RT-PCR in colon of GF and conventional animals showing an increase in the expression of genes that codify tight junction proteins (*ocln*, *cldn4*, *cldn5*) and proteins that modulate microbiota in GF conditions. NDOs induced *Cld4* and *Cxcl10*. Postgenomic validation also showed increased levels of expression of different genes related with hydroelectrolytic transport named *edn1*, *Scnn1b*, *Scnn1g* ( $\beta$ ,  $\gamma$  ENaC), *Aqp8*, *Slc9a3* (NHE)-3 and *Atp1a1* (the  $\alpha$  subunit of Na/K Atpase) in colon of GF mice that were partially normalized in the SBH group Aldosterone levels in plasma were reduced in GF mice while corticosterone were nearly doubled.

### Study of the role of microbiota in the hydroelectrolytic transport in colon

Conventional mice were administered an antibiotic cocktail to induce microbiota depletion. Pseudo sterile (PS) mice showed similar characteristics to GF mice such as cecum enlargement or loose stools. The expression of molecules related with hydroelectrolytic transport was also increased in colon: *Edn1*, *Aqp8*, *Scnn1a*, *Scnn1g* ( $\alpha$  and  $\gamma$  subunits of ENaC), *Atp1a*, *Atp1b1* ( $\alpha$  and  $\beta$  subunits of Na/K Atpases; and cecum: *Slc26a3* (DRA), *Scnn1a*, *Scnn1g* ( $\alpha$  and  $\gamma$  ENaC) and *Slc9a3* (NHE3) in PS mice while a not significant reduction of colon absorption was detected.

DSS colitis was induced in GF and conventional mice resulting in different manifestation. While conventional animals lost weight, showed a doses dependent increase in macroscopic damage index and inflammation biochemical markers such as MPO and AP, GF mice had lower symptoms of inflammation. However, animals seemed sicker, mortality rate was higher and

showed signs of loss of blood. Inflammatory proteins expression was also induced by DSS in conventional animals in a higher extend than in the GF ones. The expression of molecules related with barrier function (ZO-1, and occludin) was inhibited by DSS in conventional mice while there were no effects in GF conditions. DSS tended to reduce the expression of molecules related with hydroelectrolytic transport in both conditions.

PS mice developed lower signs of inflammation comparing with control animals when DSS colitis was induced (based on body weight loss, MDI, MPO activity, inflammatory molecules expression and histological score). However, MUC3, ZO-1 and occludin were induced by DSS in PS mice. Colonic water absorption was reduced in PS mice while DSS tended to increase this parameter in both conditions. The expression of molecules related with hydroelectrolytic transport was reduced in both conditions.

## Discussion

NDOs, are compounds that are not digested by intestinal enzymes reaching the colon intact where they act as prebiotics. Prebiotics are known for their ability to selectively influence bacterial proliferation in the gut conferring health benefits to the hosts. Antimicrobial properties have been described for a number of oligosaccharides [16]. We were able to show that FOS (1) inhibits *P. aeruginosa* growth, biofilm formation and motility; (2) limits the *P. aeruginosa* evoked NF- $\kappa$ B dependent cytokine secretion in macrophages; and (3) decreases exotoxin A levels in *P. aeruginosa* infected IEC18 cells. These effects have also been observed for inulin, but in general the magnitude of the changes induced by FOS was superior to that of inulin. This indicates that the length of the oligosaccharide chains is an essential determinant for the magnitude of the biological activities observed Our data suggest that FOS may be an useful component of a drug cocktail to combat *P. aeruginosa* infection.

Besides their prebiotic effect, NDO may have additional actions that are independent of their interaction with the colonic microbiota. Our data demonstrate that the NDOs studied, namely FOS, GOS, GMOS and inulin, induce the secretion of proinflammatory cytokines by intestinal epithelial cells. Using IEC18 as an *in vitro* model, MCP1, GRO $\alpha$  and MIP2 were upregulated by NDOs, while ICAM, IL-6, eotaxin, CXCL10 and RANTES were generally unaffected.

Pharmacological and molecular evidence indicates that the effects on MCP1/GRO $\alpha$  were dependent chiefly on TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B and secondarily on MAPK. We hypothesized that NDOs could act as TLR4 ligands based on the fact that the canonical agonist LPS is a saccharide itself. The biological consequences of TLR4 ligation by NDOs (or other agonists) are debatable. In principle, TLR4 activation produces proinflammatory signal. Since the intestinal epithelium is constantly exposed to bacteria and bacterial components on its apical membrane, this would naturally lead to inflammation. However this does not happen and instead an homeostatic equilibrium is established between the microbiota and the host via a number of mechanisms not well characterized yet [17]. IECs respond to both pathogenic and commensal bacteria. IEC or nonhematopoietic-specific deletion of TLR4, MyD88 or NEMO results in defective defense against bacterial infection and/or inflammation [18-20]. TLR4 has been reported to be expressed at low levels in basal conditions *in vivo* but it is upregulated in Crohn's disease. Thus TLR4 may play a determinant role in intestinal inflammation and defense. All NDOs apparently can act as agonists, although the efficacy at the receptor tends to be higher as the structure becomes more complex.

To evaluate the direct effects, independent of the prebiotic actions of NDO *in vitro*, we conducted an experiment in germ free conditions. After weaning germ free mice were administered a diet enriched in FOS and GOS (5%). We also included a combination of the NDO with an sterile bacterial homogenate (GOS+SBH and FOS+SBH) and the consequent control group SBH (0,016%) to study the effects of NDO in presence of antigens. Finally, we conducted a control experiment with conventional mice.

We studied the role of NDOs on intestinal enzymes activities since about 12% of components of human milk are soluble fiber that could affect intestinal maturation [21, 22]. Although, our results confirm some actions of NDOs in epithelial intestinal maturation they were not consistent in all intestinal segments. We might consider that oligosaccharides from human milk are structurally more complex than FOS and GOS. NDO $\pm$ SBH enlarged jejunum villi in concordance with an increase in mg protein per gr of tissue suggesting a trophic action of this compounds.

Our results pointed out reduced levels of IgG in GF mice administered FOS $\pm$ SBH. Previous studies have shown how FOS and GOS can modify Ig levels in

serum [23, 24] thus we show that FOS can modulate immune system independently of its prebiotic effect.

Next we complete this analysis with the transcriptome study in colon and jejunum by means microarrays. The transcriptome analysis confirmed the direct effects of NDOs, SBH and its combinations since a substantial amount of genes were modified by the treatments in jejunum and colon. Ingenuity analysis showed that some functions were modified by the three treatments such as molecular transport, cell growth and proliferation, cell movement or lipid metabolism. NDOs modified genes related to lipid transport, glutathione metabolism, barrier function and defense against pathogens. However, NDOs and SBH exerted inversed actions. While the SBH inhibited the lipoprotein (Apo), defensins, tight junctions and lysozyme expression, NDOs induced the expression of these genes.

The role of NDOs in barrier functions is controversial [25, 26]. Our results showed an upregulation in the expression of genes that codify tight junctions proteins (Cldn4 and Cld5) in colon in conventional and GF mice administered FOS. NDOs also increased the expression of Cxcl10 and Reg3g in colon in conventional and GF mice. Cxcl10 is a chemokine while Reg3g is an antibacterial lectine thus the upregulation of these genes could be related to a better barrier function.

We also observed that SBH modified the expression of several molecules related to transport in colon. These results were quite interesting since it has been previously established a defect in the hydroelectrolytic transport in GF mice. Besides, the SBH partially reverted this effect. Next we conducted some experiments in mice whose microbiota depletion (PS mice) was induced by administering an antibiotic cocktail. PS mice shared some characteristics with GF mice such as caecum enlargement or the presence of mild feces [27]. The expression of molecules related with hydroelectrolytic transport in PS mice was up regulated in colon and caecum. This increase in carriers expression would produce a higher water absorption in colon and caecum. Colon loop experiment confirmed a reduced absorption in PS mice. These mice did not show diarrhea or modified ionic and protein serum levels showing that the defect in absorptive capacity might be functionally compensated. A lower water absorption *in vivo* and higher electrogenic Na absorption in caecum of GF rats was observed in previous studies. Simonetta et

al published higher levels of ATPase Na/K in ileum and caecum in GF rats that was related to a higher efficiency in absorption [28]

The water and sodium loss induce the renin-angiotensin-aldosterone system that increases the arterial pressure by means not only actions in kidney but also in distal colon increasing the electrogenic Na absorption through ENaC. We hypothesize that the defect in water absorption in GF conditions could be compensated by a secondary hyperaldosteronism. However, our results showed lower levels of aldosterone in GF mice. On the other hand, corticosterone levels were increased in GF mice in concordance with previous studies [29, 30]. Some studies have suggested that GF mice are resistant to glucocorticoid explaining the elevated levels of this hormone in GF mice. Moreover, Glucocorticoids induce the absorption of water and electrolytes in bowel *per se*. Besides high levels of corticosterone can induce aldosterone effects.

Next, we decided to study the alterations in the hydroelectrolytic transport in GF mice in an experimental model of colitis. However, since inflammation often depends on microbiota we needed to evaluate the degree of inflammation in GF mice. Our results showed that DSS response in GF mice was attenuated although general condition of the mice was damaged due to a loss of blood as a consequence of a defect in barrier function. PS mice also showed a light response to DSS although their general condition was not damaged. We related this phenomenon with the presence of Treg cells in mucosa of the PS mice due to the previous presence of microbiota.

The DSS administration had an inhibitory effect in the carriers expression in conventional animals. This data is supported by other studies in IBD patients and in experimental models of colitis [31-33] although not all of them agree [32, 34]. We observed similar results in PS and GF mice suggesting that the inhibition could be caused by the DSS damage exerted in epithelial barrier instead of by the inflammation or the bacterial presence. It is also possible that a low level of inflammation is enough to repress the expression of carriers

The effect was proportionally more important in conventional mice since PS control mice already had a lower percentage of dry matter in feces. However, these changes were not correlated to lower water absorption.

Finally we can conclude that:

- FOS reduces *P. aeruginosa* pathogenicity through distinct mechanisms
- NDOs induce the secretion of proinflammatory cytokines by intestinal epithelial cells *in vitro* via TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B activation.
- FOS and GOS exert direct actions independent of their prebiotic effect *in vivo* and interact with microbiota antigens.
- The lack of microbiota results in an induction of the expression of hydroelectrolytic carriers as a possible compensatory mechanism to water homeostasis alteration observed in germ free mice.
- DSS inhibits the expression of hydroelectrolytic carriers in colon independently of the presence of microbiota or degree of inflammation. This inhibition did not correlate with lower water absorption.

# Introducción

---



## 1. Sistema inmunitario gastrointestinal

El tejido linfoide asociado a intestino (GALT) es el de mayor superficie y el que contiene la mayor proporción de linfocitos de todo el organismo. Presenta unas características propias, que vienen dadas por las circunstancias especiales de un sistema que incorpora un medio externo, en principio hostil, dentro del propio organismo. Siendo el objeto principal del sistema inmunitario, diferenciar lo propio de lo ajeno, es decir, la amplia carga de antígenos procedentes del alimento y del número y variedad de bacterias y otros microorganismos asentados a lo largo del tracto gastrointestinal, supone una enorme presión antigénica difícil de controlar. Teniendo en cuenta que la mayoría de dichos antígenos no suponen un riesgo para el organismo, el reto consiste en mantener la capacidad para responder a organismos potencialmente patógenos, al tiempo que se tolera esa mayoría de antígenos no dañinos. A menudo, se utiliza el término “inflamación fisiológica” o “inflamación controlada” para referirnos al estado basal de activación del sistema inmunitario gastrointestinal, aunque se trate realmente de un oxímoron.

Ateniéndonos a criterios estructurales y funcionales podemos dividir el GALT en lugares inductores y efectores. Los lugares inductores son las placas de Peyer, los folículos linfoides aislados y los ganglios linfáticos mesentéricos. En estas estructuras, los antígenos son procesados y presentados a los linfocitos. Las células del sistema inmunitario que se encuentran distribuidas a lo largo del epitelio y la lámina propia son las que llevan a cabo funciones efectoras. Esta clasificación no es absoluta, pues algunas respuestas inmunitarias pueden ser inducidas en la mucosa intestinal y algunas efectoras pueden darse en las placas de Peyer. La barrera epitelial requiere un tratamiento especial, ya que actúa como elemento de separación entre antígenos y células inmunológicas.

### 1.1. Barrera epitelial

El epitelio constituye la primera barrera que separa el lumen del interior del organismo, actuando como un impedimento físico que bloquea el paso de sustancias, microorganismos y células, aunque no de forma absoluta, puesto que permite y regula el transporte selectivo de estos. Está formada por una

monocapa de distintos tipos celulares diferenciados a partir de células madre pluripotenciales en las criptas de Lieberkühn [35]. Los tipos celulares presentes en intestino son el enterocito, las células caliciformes, las células de Paneth y las células enteroendocrinas. El enterocito predomina a lo largo del epitelio intestinal y, aunque tiene principalmente una función absorptiva, es un elemento clave del sistema inmunitario gastrointestinal. Con el fin de limitar el transporte paracelular a lo largo de la barrera intestinal, los enterocitos se unen mediante las denominadas *uniones estrechas*, compuestas por distintas proteínas (zonula occludens 1 (ZO-1), zonula occludens 2 (ZO-2), ocludinas, claudinas, etc.) [36]. El enterocito presenta polaridad, pudiendo distinguirse una cara apical, en contacto directo con el lumen, y una cara basolateral, en contacto con la lámina propia y las distintas poblaciones celulares del sistema inmunitario. La cara apical se caracteriza por unas estructuras denominadas microvellosidades que forman el denominado borde en cepillo y cuyo objetivo es aumentar la superficie de absorción [37]. En concordancia con su función absorptiva, presenta distintas enzimas implicadas en el proceso de digestión (disacaridasas, fosfatasa alcalina, leucín aminopeptidasa...). Adheridos a la cara apical, a lo largo de todo el tracto, encontramos el glicocálix, una estructura compuesta por glicoproteínas y glucolípidos que protege el epitelio actuando como una barrera física entre las células del epitelio intestinal y el lumen [38, 39]. El glicocalix está parcialmente integrado en una capa de moco cuyos principales componentes son las mucinas producidas por las células caliciformes [40]. La fracción rica en carbohidratos de las mucinas es capaz de adherirse a la superficie de distintos microorganismos, evitando su unión a la monocapa [41-43]. El moco desciende a lo largo del tracto intestinal hasta que es eliminado, facilitando así la eliminación de los distintos componentes bacterianos adheridos a él. Las células enteroendocrinas liberan somatostatina, serotonina y gastrina, entre otras sustancias, en respuesta a distintos estímulos. Estas hormonas ejercen distintas funciones en el tracto gastrointestinal. La gastrina estimula la secreción de ácido clorhídrico y pepsinógeno, la motilidad intestinal y el flujo sanguíneo en el estómago. La somatostatina inhibe la secreción ácida del estómago, así como la motilidad y el flujo sanguíneo gastrointestinal. A su vez, la serotonina inhibe la secreción gástrica y estimula la musculatura lisa del tubo digestivo.

El siguiente tipo celular intestinal son las células de Paneth, que almacenan en gránulos  $\alpha$ -defensinas, péptidos antimicrobianos que constituyen uno de los primeros mecanismos de defensa frente a organismos patógenos, y que liberan en respuesta a estímulos bacterianos [44]. Además de  $\alpha$ -defensinas,

las células de Paneth pueden secretar otros tipos de péptidos antimicrobianos como lisozimas (lisozima C), fosfolipasas (PLA2G2A), lectinas tipo C (RegIII $\gamma$ ) o ribonucleasas (angiogenina 4) [45]. Las células epiteliales intestinales (IEC) pueden también liberar  $\beta$ -defensinas [46]. Las defensinas no sólo poseen actividad antibacteriana, sino que también poseen actividad quimiotáctica frente a células dendríticas y linfocitos. Otra sustancia antimicrobiana producida por IECs es RegIII $\gamma$  [47]. La lactoferrina y la lisozima, las especies reactivas de oxígeno, los metabolitos nitrogenados y las citoquinas y quimioquinas contribuyen asimismo a la inmunidad innata en la superficie de las mucosas. En el epitelio se pueden también observar células M, que son células epiteliales especializadas asociadas a las placas de Peyer. No poseen microvellosidades ni están cubiertas de una capa de moco en su superficie, y se caracterizan por presentar vesículas endocíticas que permiten tomar antígenos del lumen y transportarlos a través de la barrera epitelial. De esta forma, seleccionan los antígenos que serán presentados por las células presentadoras de antígenos (APC) de las placas de Peyer [48].

Una vez descritos los distintos componentes de la barrera intestinal cabe destacar que esta no es una estructura estática sino dinámica, regulada principalmente por citoquinas que se encuentran en la mucosa intestinal. Diversos estudios *in vitro*, realizados en monocapas de células intestinales, muestran como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 4 (IL-4) e IL-13 parecen atenuar la función barrera [49, 50], mientras que IL-10 podría potenciarla [51].

### **Presentación de antígenos a través de IEC**

Considerando que las IEC constituyen la primera línea en contacto con antígenos en el lumen, no sorprende que con tan privilegiada situación puedan actuar como APC. De hecho, las IEC no solo están en contacto con los antígenos en la cara apical, sino que en la cara basolateral contactan con las principales poblaciones de linfocitos T del sistema inmunitario gastrointestinal: Los linfocitos intraepiteliales, que se encuentran dispersos a lo largo del epitelio, y los linfocitos T de la lámina propia. Además, las IEC presentan en la cara apical diversas moléculas que pueden actuar como receptores de antígenos como FcRn [52] o DEC-205 [53], facilitando la entrada de antígenos al interior de la célula a través de endocitosis mediada por receptores. La presentación de antígenos a linfocitos T tiene como objetivo el mantenimiento de la barrera intestinal, la renovación de células epiteliales dañadas por estrés, infección o

neoplasia, y la regulación de la respuesta a los antígenos de la superficie de la mucosa.

## **1.2. Placas de Peyer**

Las placas de Peyer son el primer lugar donde se induce la respuesta inmunitaria en el GALT. Son estructuras constituidas por folículos linfoides localizados en la submucosa del intestino, caracterizados por una elevada población de linfocitos, macrófagos, células dendríticas y células M. La superficie luminal consta de un epitelio especializado denominado epitelio asociado a folículo (FAE), formado por células M y otras células situadas en las inmediaciones. EL FAE presenta unas características estructurales y funcionales que facilitan el acceso de antígenos lumbinales, como la ausencia de microvellosidades, la reducción de hidrolasas, y un número reducido de células caliciformes o de Paneth [65]. Las células M juegan un papel importante en el paso de antígenos a lo largo de la barrera epitelial; sin embargo, carecen de complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC clase II). Por tanto, se cree que son incapaces de procesar los antígenos, limitándose a liberarlos intactos a la región subepitelial de las placas de Peyer, donde son procesados y presentados por APC profesionales [64]. En la región central de las placas de Peyer encontramos folículos de células B rodeados de células dendríticas, y células T inmaduras en la periferia. En las placas de Peyer interaccionan las células del sistema inmunitario innato y adaptativo, dando lugar normalmente a un estado de equilibrio entre respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias, que corresponde a la denominada inflamación fisiológica. En colon, encontramos estructuras similares, macroscópicamente invisibles, denominadas folículos linfoides aislados.

## **1.3. Sistema inmunitario innato**

El sistema inmunitario innato se caracteriza por una respuesta rápida frente a cualquier organismo extraño. Su acción se basa en el reconocimiento de patrones similares que se encuentran en distintos organismos patógenos. A continuación se describen algunos de los mediadores solubles que participan en la respuesta inmunitaria innata, así como las distintas poblaciones celulares relevantes del GALT.

### 1.3.1. Péptidos antimicrobianos y mediadores solubles

A lo largo de la barrera epitelial podemos distinguir distintos mediadores solubles que participan en la regulación del sistema inmunitario innato. Las citoquinas son pequeñas glicoproteínas secretadas no solo por células características del sistema inmunitario, sino también por otros tipos celulares como IEC o células endoteliales. Son los principales mediadores solubles, responsables de la comunicación entre células en ausencia de contacto directo. Las citoquinas pueden ser clasificadas en función de sus propiedades bioquímicas en nueve familias: hematopoyetina, IL-12, IL-17, IL-10, factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la familia de las quimioquinas. Dada la gran diversidad de citoquinas y con el objetivo de simplificar, podemos clasificarlas en citoquinas proinflamatorias, que inducen y perpetúan varios tipos de respuesta inflamatoria (Th1, Th2 y Th17), y antiinflamatorias. Las quimioquinas son una subfamilia de citoquinas encargada de controlar la migración de leucocitos a tejidos específicos. Podemos distinguir 4 familias de quimioquinas de acuerdo con la distribución de sus residuos de cisteína: citoquinas C, CC, CXC y CX3, donde X es cualquier aminoácido excepto cisteína. En la tabla 1 se describen las principales citoquinas y quimioquinas, su función y tipos celulares productores.

La producción de moléculas tóxicas, como metabolitos reactivos del oxígeno y nitrógeno, también contribuye a la defensa frente a microorganismos. En intestino se producen moléculas antioxidantes, como el glutatión, para contrarrestar los efectos de estas moléculas tóxicas. Existe cierta controversia con respecto al papel del óxido nítrico en el intestino. En condiciones normales, se expresa óxido nítrico sintasa endotelial, mientras que en procesos inflamatorios se expresa óxido nítrico sintasa inducible [66, 67]. Diferentes concentraciones de óxido nítrico en el tejido determinan el efecto beneficioso o perjudicial de este [68]. Por otra parte, el sistema de complemento [69, 70] está compuesto por una serie de proteínas plasmáticas que, mediante la activación de cascadas de activación, facilitan la fagocitosis y la lisis celular mediante la activación de la apoptosis. La lactoferrina es una proteína que facilita el transporte de hierro a través del epitelio. Al ser hidrolizada por una pepsina gástrica da lugar a un péptido con actividad antimicrobiana [71]. A la lisozima, un polipéptido que se encuentra tanto en saliva como en jugo pancreático, se le atribuyen diversas actividades entre las que destacan la hidrólisis de la pared celular bacteriana o la activación de la autólisis bacteriana. A menudo actúa en combinación con otros factores, como la lactoferrina.

**Tabla 1: clasificación de citoquinas y quimioquinas**

Citoquinas Th1	Fuente	Efectos
IFN- $\gamma$	Células Th1, NK	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promover la diferenciación Th1</li> <li>Inhibir de la diferenciación Th2</li> <li>Cambio de isotipo (producción IgG2a)</li> <li>Activación de macrófagos</li> </ul>
TNF- $\alpha$	Macrófagos, monocitos, CD, células B y T, basófilos, eosinófilos, células NK, neutrófilos, mastocitos, células no inmunitarias	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promover necrosis tumoral</li> <li>Aumentar la actividad fagocítica y la producción de ROS en macrófagos y neutrófilos</li> <li><i>Feedback</i> positivo en la activación de células Th1 y macrófagos</li> </ul>
IL-12 (heterodímeros IL-12p40 y p35)	Macrófagos, monocitos, CD	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diferenciación Th1</li> <li>Factor de crecimiento de células T y NK</li> </ul>
IL-2	Células CD4+ activadas, CD8+, NK, DC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proliferación células T</li> <li>Autotolerancia</li> <li>Promover la activación de células T reguladoras</li> <li>Activación de macrófagos</li> </ul>
IL-1 $\beta$	Monocitos, macrófagos, DC, linfocitos T y B, células NK	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inducción de fiebre</li> <li><i>Feedback</i> positivo</li> <li>Secreción de proteínas de fase aguda</li> <li>Inducción de la secreción de IFN-<math>\gamma</math></li> <li>Activación de macrófagos</li> <li>Favorecer la unión de leucocitos al endotelio vascular intestinal</li> </ul>
IL-6	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos B, Th1 y Th17	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promover la respuesta inflamatoria aguda</li> <li>Diferenciación Th17</li> <li>Favorecer la proliferación de células T y B</li> <li>Diferenciación de células plasmáticas</li> </ul>
Citoquinas Th17	Fuente	Efectos
IL-23 (heterodímero IL-12p40 y p19)	CD activadas, macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Expansión células T memoria</li> <li>Mantenimiento, diferenciación terminal y expansión de células Th17</li> <li>Protección frente a patógenos extracelulares</li> </ul>
IL-17	Células Th17, células CD8+ y células T $\gamma\delta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fortificación <i>uniones estrechas</i></li> <li>Reclutamiento de granulocitos durante la inflamación</li> </ul>

Citoquinas Th2	Fuente	Efectos
IL-4	Mastocitos, células T, células estromales de médula ósea	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diferenciación Th2</li> <li>Inducción del crecimiento de células B y cambio de isotipo</li> <li>Factor de crecimiento de mastocitos</li> </ul>
IL-5	Células Th2, mastocitos, eosinófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estimular el reclutamiento y diferenciación de eosinófilos</li> <li>Reacciones alérgicas y respuesta frente a helmintos</li> </ul>

Citoquinas inmunoreguladoras	Fuente	Efectos
IL-10	Células Th2, T reguladoras, B, monocitos, CD, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibir la función efectora y activadora de células T, monocitos y macrófagos</li> <li>Limitar la respuesta inflamatoria</li> <li>Regular el crecimiento y diferenciación de células B, NK, CD8+, CD4+, mastocitos, granulocitos y CD</li> <li>Diferenciación de células T reguladoras</li> </ul>
TGF-β	Células T y B, NK, CD, macrófagos, mastocitos, neutrófilos y células no inmunitarias	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proliferación celular, producción de la matriz extracelular, embriogénesis, inmunomodulación, cicatrización</li> </ul>

Quimioquina	Fuente	Efectos
<b>Quimioquinas CC</b>		
CCL2 (MCP1)	IEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reclutamiento de monocitos, CD y células T memoria durante inflamación</li> </ul>
CCL5 (RANTES)		<ul style="list-style-type: none"> <li>Migración de monocitos y células T</li> </ul>
CCL11 (eotaxina)		<ul style="list-style-type: none"> <li>Atracción de eosinófilos</li> </ul>
<b>Quimioquinas CXC</b>		
CXCL2 (MIP-2)	Monocitos, macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Atracción de leucocitos polimorfonucleares</li> </ul>
CXCL8 (IL-8)	Monocitos macrófagos, neutrófilos, IEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Atracción de neutrófilos</li> </ul>
CXCL10 (IP-10)	Monocitos, células endoteliales, fibroblastos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Atracción de células T, NK, monocitos, macrófagos, CD</li> <li>Adhesión de células T a células endoteliales</li> </ul>
CXCL1 (GRO-α)	Macrófagos, neutrófilos, IEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Atracción de neutrófilos</li> </ul>

NK:natural killer; CD:célula dendrítica;ROS:especies reactivas de oxígeno; MCP: proteína chimioatrayente de macrófagos; RANTES: *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*; MIP: proteína inflamatoria de macrófagos; IP: Proteína inducida por IFN-γ; GRO-α: oncogen alpha relacionado con el crecimiento; TNF: factor de necrosis tumoral IgG2: Inmunoglobulina G2. factor de crecimiento transformante β (TGF-β

Por último, las defensinas, la proteína C reactiva, actuando como opsonina, y distintos factores de coagulación, que protegen los vasos sanguíneos, también actuarían frente a la invasión de microorganismos.

### 1.3.2. Células del sistema inmunitario innato

Las células del sistema inmunitario innato, como los macrófagos o las células dendríticas, se caracterizan por su actividad fagocítica y como APC. Basófilos, eosinófilos, células *natural killer* y neutrófilos tienen un papel en diversos procesos inflamatorios o patológicos. Como se ha indicado anteriormente, en sentido amplio incluirían también a los enterocitos.

Las células dendríticas se encuentran en tejidos periféricos (en la lámina propia y en las placas de Peyer) en su forma inmadura, que se caracteriza por una alta capacidad fagocítica y una baja expresión de MHC. Las células dendríticas son activadas directamente a través de antígenos bacterianos que se unen a receptores reconocedores de patrones, como los *Toll like receptors* (TLR), o indirectamente a través de citoquinas proinflamatorias producidas por macrófagos, como TNF- $\alpha$  o IL-1. Como consecuencia de estos estímulos se transforman en APC potentes caracterizadas por una baja actividad fagocítica y elevada expresión de MHC y moléculas co-estimuladoras. En este estado, las células dendríticas son capaces de captar, procesar y presentar los antígenos transportados a través de la barrera epitelial por las células M. También expresan proteínas asociadas a las *uniones estrechas* que les permiten penetrar a través de la barrera epitelial sin dañarla, entrando en contacto directo con los antígenos del lumen. Dichas células dendríticas ya maduras migran hacia los ganglios linfáticos, donde activan a linfocitos T vírgenes hacia respuestas de tipo Th1, Th2 [55, 72, 73], Th17 o bien T reguladoras. También participan en el proceso de cambio de isotipo a inmunoglobulina A (IgA) en células B a través de BAFF y APRIL o indirectamente a través de un incremento en la producción de IL-6 [74].

Los macrófagos presentan tanto actividad fagocítica como presentadora de antígenos. Con el fin de mantener la homeostasis, los macrófagos de la mucosa intestinal no expresan los receptores de IgA (CD89), IgG (CD12, 32 y 64) o el correceptor de lipopolisacárido (LPS) (CD14). Tampoco producen citoquinas proinflamatorias en respuesta a ligandos de TLR. Por tanto los macrófagos de la mucosa no inflamada son anérgicos, sin embargo mantienen su actividad *scavenger* y la capacidad de defender al hospedador. Cuando la integridad del epitelio está dañada durante la inflamación o la infección intestinal, los



monocitos procedentes de la sangre actúan como refuerzos, acumulándose en lámina propia, secretando citoquinas proinflamatorias y eliminando microorganismos de forma eficiente [75].

Eosinófilos y basófilos juegan un papel importante en procesos alérgicos y respuestas frente a parásitos. Las células NK normalmente no se observan en intestino sano. Participan en la lisis de células infectadas por virus o células tumorales. Por último, los neutrófilos no se encuentran en cantidades importantes en tejido sano y por tanto se utilizan como marcadores de inflamación. En situaciones de estrés los neutrófilos migran a la zona dañada donde ejercen su principal función: fagocitar y destruir patógenos.

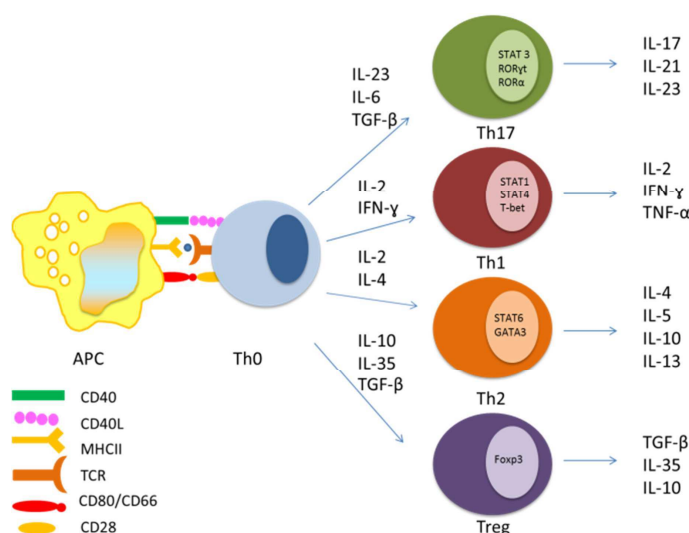
### **1.4. Sistema inmunitario adaptativo**

La respuesta inmunitaria adaptativa, más lenta, requiere el desarrollo de una defensa específica. Dicha respuesta se lleva a cabo a través de linfocitos T y linfocitos B, estos últimos responsables de la respuesta humoral, también llamada respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. Podemos distinguir distintas poblaciones de linfocitos distribuidas a lo largo del GALT.

#### **1.4.1. Linfocitos T de las placas de Peyer**

La mayoría de los linfocitos T de las placas de Peyer son linfocitos T vírgenes inmaduros, a excepción de los situados en el FAE de las placas de Peyer. La mayoría son TCR $\alpha\beta$ +. Tanto los linfocitos T como los B migran a las placas de Peyer gracias a la interacción entre las moléculas de adhesión  $\alpha 4\beta 7$  y L-selectina expresadas en la superficie de los linfocitos y mad-CAM1 presente en las células endoteliales. La activación de las células T requiere el reconocimiento de antígenos a través del TCR, presentados por una APC en el contexto de MHC y la consiguiente interacción coestimuladora. Los linfocitos T CD4+ vírgenes (Th0) pueden diferenciarse a distintas subpoblaciones, dando lugar a linfocitos colaboradores de tipo Th1, Th2 o Th17, que median en respuestas proinflamatorias, o a linfocitos de tipo T reguladores, que median respuestas antiinflamatorias. La respuesta Th1 se caracteriza por la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y afecta principalmente a la inmunidad celular. En la respuesta Th2, IL-4, IL-5 e IL-13 son las principales citoquinas implicadas, y se asocia a una respuesta humoral. Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17 e IL-22. Finalmente, las células T reguladoras CD25+CD4+ producen TGF- $\beta$  e IL-10 y son responsables de la respuesta antiinflamatoria (Esquema 1). La diferenciación

hacia un subtipo u otro está mediada por la producción de citoquinas por parte de células dendríticas [76] y macrófagos. Una vez estimulados, los linfocitos T pueden mantenerse en el sitio de activación para colaborar con las células B o migrar hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, desde donde pueden dirigirse a tejidos periféricos, aunque los linfocitos T activados en el intestino migran preferentemente a la zona donde han sido activados, transformándose en linfocitos T de lámina propia e intraepiteliales. Este proceso de migración está controlado por diversas moléculas de adhesión:  $\alpha 4\beta 7$ , L-selectina y el receptor de quimioquinas CCR9.



Esquema 1: Esquema diferenciación linfocitos T CD4+

### 1.4.2. Linfocitos de lámina propia

Los linfocitos de lámina propia son en su mayoría células T memoria CD45RO+ con una ratio CD4:CD8 2:1 [77]. Presentan un fenotipo activado. Sin embargo, presentan una proliferación reducida cuando son estimulados a través de TCR/CD3 [78] aunque mantienen la capacidad de producir citoquinas. Estos datos sugieren que los linfocitos T de lámina propia regulan la respuesta inmunitaria mediante el mantenimiento de cierta anergia y de la producción de citoquinas.

### 1.4.3. Linfocitos intraepiteliales

Son principalmente células T CD8+ memoria CD45RO+ [79]. Al igual que los linfocitos de lámina propia, muestran un fenotipo activado. Sin embargo, a diferencia de estos son oligoclonales, lo cual limita su respuesta a determinados antígenos, probablemente con el fin de evitar una respuesta inmunitaria exagerada.

#### **1.4.4. Linfocitos B**

Los linfocitos B en la mucosa requieren una activación dependiente de células T que da lugar a un cambio de isotipo a IgA. Posteriormente migran a ganglios linfáticos mesentéricos, donde proliferan y se diferencian a blastos B. Finalmente, estas células se dirigen a los lugares efectores, principalmente a la lámina propia, gracias a la expresión de moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas ( $\alpha 4\beta 7$  y CCR9). La IgA es secretada al lumen, donde actúa previniendo la adhesión de bacterias al epitelio [80] y neutralizando virus, enzimas y toxinas de origen bacteriano

## 2. Microbiota

En el sistema gastrointestinal cohabitan trillones de microorganismos, entre los que podemos distinguir bacterias beneficiosas para el organismo, dañinas, o comensales. En general es una convivencia pacífica en la que ambas entidades encuentran beneficio. Por un lado, las bacterias habitan un entorno rico en nutrientes y a su vez producen nutrientes esenciales, como la vitamina K, y ayudan a la digestión del hospedador. Además, evitan la proliferación de bacterias potencialmente patógenas y participan en el desarrollo y regulación del sistema inmunitario.

La distribución de microorganismos en el tracto gastrointestinal no es uniforme, siendo limitada en el estómago y alcanzando las mayores proporciones en ciego y colon. Las filas que colonizan el tracto gastrointestinal son fundamentalmente *Bacteroidetes* (Gram negativas) y *Firmicutes* (Gram positivas) [81]. La microbiota es específica y bastante estable en cada individuo [82]. Se ve afectada principalmente por factores ambientales como la alimentación, especialmente durante los primeros meses de vida, y factores de carácter genético. Diversos trastornos han sido asociados con una alteración de la microbiota (disbiosis). En el síndrome metabólico se han detectado cambios en la abundancia de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. [83]. El trasplante de microbiota de animales obesos a animales axénicos o libres de gérmenes se ha asociado al desarrollo de este síndrome [84]. En la enfermedad inflamatoria intestinal se produce una alteración en la respuesta a bacterias no patógenas y un cambio tanto en la composición como en la distribución de la microbiota. En algunas enfermedades como el síndrome de colon irritable y autismo [85-87], también se han observado una modificación de la flora. En estos casos resulta complicado detectar si la disbiosis es consecuencia de la enfermedad, por el contrario, causa de esta.

La presencia de flora bacteriana no es indispensable para la supervivencia del individuo; sin embargo, experimentos realizados en animales libres de gérmenes demuestran que dicha flora no solo contribuye al desarrollo del sistema inmunitario gastrointestinal (la flora bacteriana regula la producción de péptidos antimicrobianos e IgA secretora, está implicada en la diferenciación de células T y en el desarrollo de órganos linfoides) [88-91], sino que también afecta a otros procesos como el desarrollo del cerebro, el comportamiento, el

metabolismo, la obesidad, la digestión y la resistencia al estrés [92, 93]. La comunicación entre el sistema inmunitario y la flora bacteriana es bilateral, de forma que no solo la flora bacteriana contribuye al desarrollo del sistema inmunitario, sino que el sistema inmunitario es capaz de modular las distintas poblaciones que componen la flora bacteriana.

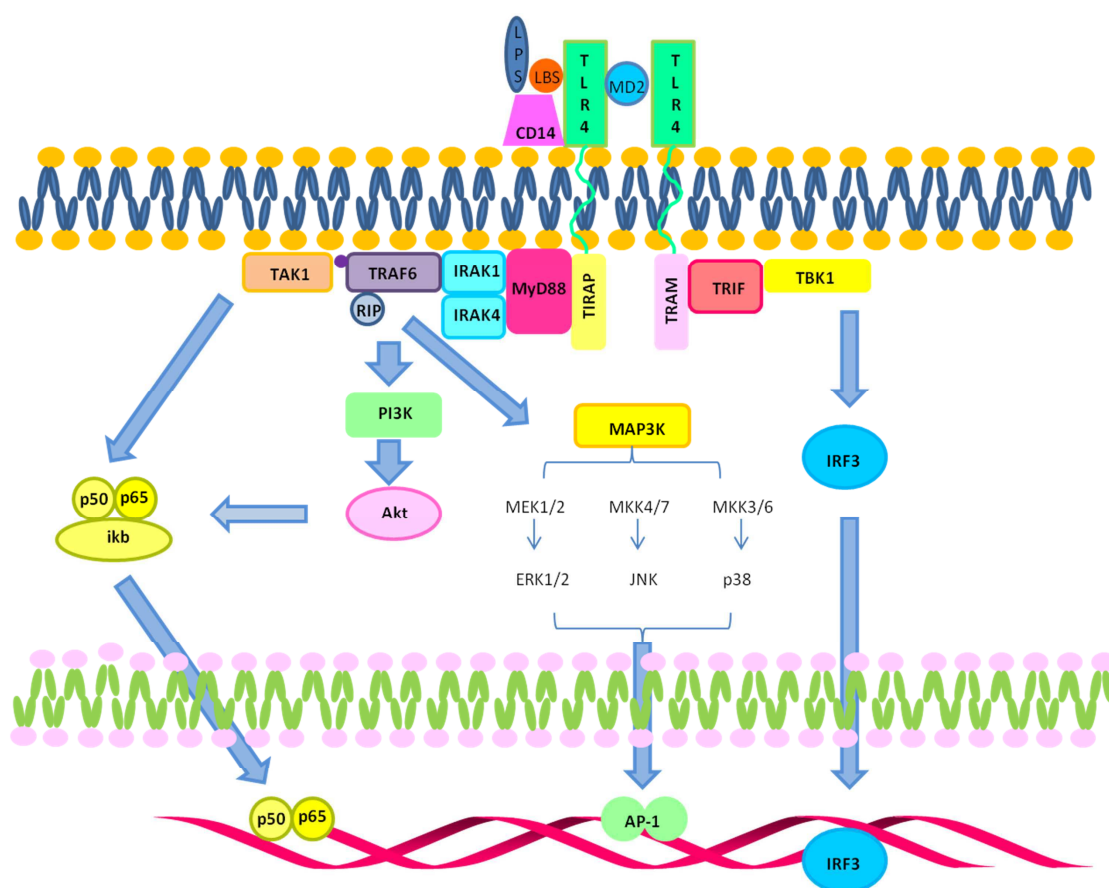
## **2.1. Receptores de reconocimiento de patógenos**

La necesidad de desarrollar mecanismos reguladores entre el sistema inmunitario y la microbiota surge del reto que supone, por un lado, proteger frente a organismos patógenos y, por otro, tolerar aquellos organismos beneficiosos o al menos no dañinos para el organismo. El control de la microbiota recae en gran medida en el sistema inmunitario innato, que utiliza distintos receptores que actúan como sistema de comunicación entre bacterias y hospedador. Estos se denominan receptores de reconocimiento de patógenos (pathogen recognition receptors, PRR), o bien receptores de patrones moleculares o de patrones moleculares asociados a daño. Estos reconocen estructuras comunes a distintos organismos no eucariotas, más que determinantes antigénicos específicos. Los principales PRR son los receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLR) y los receptores tipo NOD (nucleotide-binding oligomerization domain like receptors, NLR). La estimulación de estos receptores implica la activación de diversas vías de señalización que culminan en la producción de citoquinas proinflamatorias y productos antimicrobianos [94]. Los PRR más estudiados son los TLR.

### **2.1.1. Receptores *Toll-like***

Los TLR son proteínas transmembrana tipo I que se expresan en células de la inmunidad innata, como macrófagos y células dendríticas, además de en algunas células T. También se expresan en IEC, células endoteliales y células estromales. Hasta la fecha se conocen 11 TLR humanos que reconocen no solo componentes bacterianos, sino también componentes procedentes de otros microorganismos como hongos, virus o protozoos [95]. Los TLR pueden localizarse tanto en la superficie celular como intracelularmente, según el tipo. Los ligandos más comunes y la localización de los distintos TLR se describe en la tabla 2. Estructuralmente los TLR presentan una región extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) [96], y una región intracelular denominada dominio TIR (debido a su similitud con la familia de receptores de IL-1), encargada de transmitir la señal. Una vez unido el ligando, se produce una

homo- o heterodimerización del receptor. Existen 5 proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR y que actúan en distintas combinaciones dependiendo del TLR (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM y SARM) [97]. Todos los TLR presentan MyD88 como proteína adaptadora, a excepción de TLR3. El reclutamiento de distintas proteínas conlleva la activación de diversos factores de transcripción y la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias y otras acciones. EL TLR4, probablemente el TLR más estudiado, responde a LPS mediante una vía dependiente y otra vía independiente de MyD88. A través de la vía dependiente de Myd88, IRF5, NF-κB y AP1 son activados, iniciándose la transcripción de genes proinflamatorios. La vía independiente de MyD88 implica la activación de NF-κB e IRF3 y la consiguiente producción de interferones tipo I [98] (Esquema 2).



Esquema 2: Ruta de señalización de TLR4.

En el tracto gastrointestinal las células que expresan TLR están en contacto continuo con sus ligandos, y sin embargo en condiciones normales no se produce inflamación. Por el contrario, los TLR participan en la homeostasis intestinal regulando la barrera epitelial mediante un control de la producción de

Tabla 2: Patrón de expresión de TLR y sus ligandos [13]

TLR	Ligandos	Células	Localización celular
TLR1/2	Lipopéptido bacteriano Proteínas procedentes de protozoos parásitos (T cruzi Tc52, profilin)	Mayoría de las células incluyendo células dendríticas e IEC	Membrana plasmática
TLR 2	Lipoproteínas bacterianas/lipopeptidos, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, porinas, zimosán Proteínas víricas estructurales (Lipoarabinomanano) Lípidos procedentes de helmintos Componentes de la pared celular de hongos HSP60, HSP70, HSP96, HMGB1, ácido hialurónico de carácter endógeno	IEC, células de Paneth, leucocitos mononucleares periféricos, células dendríticas, monocitos y células T	Membrana plasmática
TLR 3	ARN vírico, ARNmPoly(I:C), Poly(I:C) <sub>12U</sub> RNAm endógeno	IEC, células dendríticas, células NK y células T	Endosomas
TLR 4	Lipopolisacárido bacteriano proteínas de envoltura víricas Protozoos parásitos Glicoinositolfolípidos ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ) Componentes de la pared celular de hongos HSP22, HSP60, HSP70, HSP96, HMGB, defensina 1 $\beta$ , dominio A de la fibronectina, ácido hialurónico, sulfato de heparina, fibrinógeno, proteína A sulfactante	IEC, células de Paneth, macrófagos, células dendríticas y células T	Membrana plasmática
TLR 5	Flagelina	IEC, células de Paneth, monocitos, células dendríticas, células NK y células T	Membrana plasmática
TLR6/TLR2	Lipopéptidos bacterianos, ácido lipoteicoico Modulina soluble en fenol, zimosán	IEC, alta expresión en células B y células dendríticas, baja expresión en monocitos y NK	Membrana plasmática
TLR 7	ARN de cadena simple de origen vírico ARN endógeno	IEC, células B, células dendríticas, monocitos y células T	Endolisosoma
TLR 8	ARN de cadena simple de origen vírico ARN endógeno	IEC, monocitos, células dendríticas, células NK y células T	Endolisosoma
TLR 9	motivos CpG no metilados procedentes de bacterias, virus o protozoos parásitos Hemozoina procedente de protozoos parásitos ( <i>Plasmodium</i> ) oligodesoxinucleótidos CpG endógenos	IEC, Células de Paneth, células dendríticas, células B, leucocitos mononucleares periféricos, macrófagos, células NK y células microgliales	Endolisomas y membrana plasmática
TLR 10	Desconocido, podría interactuar con TLR2 y TLR1	Células B, células dendríticas, monocitos y células T	Intracelular
TLR 11	Superficie celular de bacterias uropatogénicas, Moléculas tipo profilina de <i>Toxoplasma gondii</i>		Membrana plasmática

IgA, el mantenimiento de las *uniones estrechas* y la expresión de péptidos antimicrobianos. Esto se consigue gracias a distintos mecanismos de regulación. Por ejemplo, un estudio *in vitro* demuestra que en células T84, TLR5 solo se expresa en la cara basolateral, respondiendo solo frente a microorganismos que han atravesado la barrera epitelial [99]. A su vez, TLR9 se expresa tanto en la cara apical como en la basolateral, induciendo en el primer caso tolerancia y en el segundo caso una respuesta proinflamatoria [100]. Por último, la duración del estímulo también puede afectar a la respuesta frente a este, siendo proinflamatoria cuando su duración es corta y tolerogénica en caso de estímulos prolongados [101].

La expresión de TLR4 en intestino no inflamado es baja, sin embargo, se ha observado un incremento de esta en pacientes con enfermedad de Crohn [94]. Estos datos nos sugieren la importancia de los TLR en el control de la homeostasis e inflamación intestinal.

### **2.1.2. Receptores *Nod like***

Los NLR son una familia de proteínas citoplasmáticas entre las que cabe destacar NOD1 y NOD2 como receptores reconocedores de componentes bacterianos implicados en la modulación de la respuesta inflamatoria y apoptótica [102]. NOD1 se expresa en IEC y reconoce el peptidoglicano en bacterias Gram negativas [103]. NOD2 se expresa tanto en IEC como en monocitos y células de Paneth y es capaz de reconocer muramil dipéptido derivado del peptidoglicano, común a bacterias Gram positivas y Gram negativas [104]. Cabe destacar que las células de Paneth requieren la activación de NOD2 para secretar péptidos antimicrobianos [105]. Se han relacionado diversos polimorfismos en el gen de NOD2 asociados con un mayor riesgo de enfermedad de Crohn. Estos pacientes padecen disbiosis y son incapaces de eliminar patógenos intestinales de forma eficiente. Es muy probable que las mutaciones en NOD2 aumenten la susceptibilidad de los pacientes de Crohn a la enfermedad mediante la alteración entre la microbiota y la respuesta inmunitaria [105].

### **2.1.3. Inflamasomas**

En respuesta a diversos estímulos la activación de distintos PRR puede dar lugar a la formación de complejos multimoleculares denominados inflamasomas que controlan la activación de la enzima proteolítica caspasa 1. La caspasa 1 es capaz de romper los precursores de IL1-B e IL-18 (pro-IL-1B y pro-



IL-18), jugando un papel importante en la liberación de las formas activas de estas citoquinas. Hasta ahora se han descrito cuatro inflamasomas diferentes en ratón (Nuclear localization leucine-rich-repeat protein 1, 3 y 4 NLRP1, NLRP3, NLRC4 y absent in melanoma 2 (AIM2), (este último no contiene NLRP). [106]. NLRP3 es el inflamasoma más estudiado, de forma que se conoce una gran diversidad de moléculas capaces de actuar como estímulos entre las que destacan el muramil dipéptido, el ácido ribonucleico bacteriano (ARN bacteriano), o el LPS [106, 107]. El mecanismo de acción por el cual estos estímulos activan el inflamasoma es desconocido, aunque es posible que no lo hagan directamente, sino a través de un mecanismo en dos fases [106]. La primera, mediada a través de la unión a un receptor (TLR, receptor de TNF, NOD1 o NOD2) que supondría un aumento en la expresión de NLRP3, y la segunda, responsable de la activación directa del inflamasoma.

## **2.2. Animales axénicos o libres de gérmenes**

Un animal libre de gérmenes es aquel que carece de microorganismos vivos detectables (bacterias, virus, hongos, parásitos y organismos saprófitos). Son animales que se obtienen por cesárea o histerectomía aséptica y son mantenidos en condiciones estériles en aisladores. A lo largo de la historia se han producido animales libres de gérmenes de distintas especies, siendo las principales objeto de estudio la rata y el ratón. Los animales libres de gérmenes pueden ser convencionalizados al inocularles la flora bacteriana de un organismo mantenido en condiciones estándar [23].

Los animales axénicos presentan unas características propias, consecuencia de la ausencia de microbiota. Las principales están relacionadas con el sistema inmunitario y con la nutrición, crecimiento y desarrollo del individuo. La ausencia de contacto con microorganismos da lugar a un sistema inmunitario no desarrollado que se manifiesta en una reducción del tamaño de los ganglios mesentéricos, y sistémicos [108], en una disminución en la formación de folículos linfoides aislados, en una menor producción de IgA en el tracto gastrointestinal [89, 109] y en una menor concentración de inmunoglobulinas en suero. Además, los animales libres de gérmenes presentan una menor cantidad global de células en lámina propia, y de linfocitos intraepiteliales CD8 $\alpha\beta$  [110-112]. Por último, son animales más susceptibles frente a las infecciones. Una vez convencionalizados, la mayoría de estas deficiencias se normalizan [113, 114]. La administración de antibióticos a

animales convencionales produce alteraciones similares [115, 116], demostrando que los efectos de la microbiota pueden ser modificados en diversas situaciones de la vida. También se ha relacionado la ausencia de microbiota con alteraciones del metabolismo que incluyen una disminución del metabolismo basal [117], un aumento en el consumo de agua y comida [118], un incremento en los niveles de colesterol en hígado [119] y suero [120], y una disminución en la excreción de ácidos biliares [121]. Se ha descrito que los ratones y ratas libres de gérmenes tienen una mayor esperanza de vida. Este efecto está relacionado con la edad, de forma que la ausencia de bacterias a edad temprana alarga la vida mientras que la reduce en la última etapa de la vida [122].

Considerando que la mayor población bacteriana se sitúa en el tracto gastrointestinal, no es sorprendente que la morfología y funcionamiento de este se vean seriamente afectados en animales libres de gérmenes. El alargamiento de las vellosidades en el intestino delgado, el acortamiento de las criptas [123], alteraciones en la diferenciación de células de Paneth, la reducción de la motilidad intestinal o de la renovación del epitelio intestinal son algunas de las consecuencias de la vida sin flora bacteriana [13]. Cabe destacar el aumento del tamaño del ciego, que en algunos casos llega a alcanzar el 25% del peso total en ratas libres de gérmenes [23]. Se han realizado diversos estudios en relación al incremento en el peso del ciego, concluyendo que este se debe principalmente a la acumulación de sustancias que en animales convencionales son degradadas por la microbiota [124-126]. Un ejemplo sería la acumulación de moco producido por el epitelio, que en condiciones normales es degradado por distintos componentes de la microbiota, entre ellos miembros de los géneros *Ruminococcus* y *Bifidobacterium* [114, 125, 127, 128]. Por otra parte, el crecimiento del ciego en animales libres de gérmenes se ha relacionado con una alteración en el transporte hidroelectrolítico, tanto en el propio ciego como en el colon. Efectivamente, los animales libres de gérmenes presentan diversas manifestaciones que sugieren una alteración en la homeostasis del agua: cierta diarrea crónica, hemoconcentración, aumento en el consumo de agua y una mayor dificultad para sobrevivir a periodos de privación de agua [15]. La absorción de agua en el intestino delgado en animales libres de gérmenes es similar a la de los animales convencionales. Es a partir del ciego donde aumenta considerablemente el agua en el contenido intestinal en animales mantenidos en condiciones de esterilidad [15]. Sin embargo, diversos estudios sugieren que la capacidad de absorción de sodio y agua en estos animales es similar, o incluso

está aumentada, con respecto a la de los animales convencionales. Al sustituir el contenido del ciego en animales libres de gérmenes por una solución de NaCl, la absorción de agua, sodio y cloro es similar a la observada en animales convencionales [15]. Sin embargo, ensayos *in vitro* realizados en cámara de Ussing demuestran un aumento en la absorción de sodio en el ciego y el colon proximal de ratas mantenidas en condiciones de esterilidad debido a un aumento de la absorción de sodio electroneutro, causada probablemente por elevados niveles de aldosterona en sangre. Asimismo, se registra un aumento en la absorción electrogénica de sodio en el colon distal de ratas libres de gérmenes, presumiblemente debido a un hiperaldosteronismo [129]. Estos resultados sugieren que la alteración en la absorción de agua y sodio en animales libres de gérmenes puede deberse tanto al contenido del ciego como a una alteración de la capacidad de transporte del tejido. De los distintos componentes del contenido intestinal, la elevada concentración de aniones no absorbibles, como mucopolisacáridos, podría ser responsable en parte de la inhibición en la difusión de sodio y por tanto de la absorción de agua en estos animales [129].

### **2.3. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo responsable de un gran número de infecciones oportunistas en pacientes con quemaduras u otras lesiones, pacientes con fibrosis quística, inmunodeprimidos y hospitalizados en general [130, 131]. Las infecciones por *P. aeruginosa* pueden afectar diversas localizaciones como la piel, las vías respiratorias, las vías urinarias o el intestino. Se han descrito tres tipos de motilidad bacteriana para *P. aeruginosa*: *swimming*, *swarming* y *twitching*. Los dos primeros requieren flagelos funcionales, un flagelo unipolar para el desplazamiento tipo *swimming* y flagelos peritricos para *swarming*. *Twitching*, sin embargo, es un tipo de motilidad dependiente de pili tipo IV. Para la formación de biopelículas se requiere la motilidad tipo *swarming* y tipo *twitching* [132]. La formación de biopelículas es una estrategia de supervivencia basada en la asociación de microorganismos que crecen embebidos en una matriz y adheridos a una superficie. Las biopelículas tienen una estructura muy compleja, compuesta principalmente por exopolisacárido, en la que se pueden distinguir canales por los que se intercambian oxígeno y otros sustratos con la fase acuosa. Las bacterias que forman biopelículas tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en

medios líquidos. Estas diferencias les confieren una mayor resistencia a antibióticos, sustancias tóxicas o incluso a los mecanismos de defensa del sistema inmunitario [133, 134].

Las bacterias utilizan distintos sistemas de secreción de proteínas que liberan factores de virulencia desde la superficie bacteriana al medio externo o al interior del citosol de la célula eucariota. Existen seis tipos distintos de sistemas de secreción, desde el sistema de secreción tipo I (T1SS) al tipo VI (T6SS), de los cuales cinco están presentes en *P. aeruginosa*. Los distintos sistemas de secreción se diferencian en el mecanismo molecular de secreción y en las sustancias liberadas. Los tipo II y III son responsables de la secreción de la mayoría de toxinas conocidas. El T2SS se caracteriza por la secreción de proteínas en dos pasos. En primer lugar la proteína es transportada mediante Tat de la membrana interna al periplasma. Y una vez allí atraviesa la membrana externa, liberándose al medio. EL T2SS secreta uno de los factores de virulencia más tóxicos de *P. aeruginosa*: la exotoxina A. La exotoxina A es la única toxina AB con diana intracelular liberada por T2SS. Una vez en el medio externo es capaz de penetrar en la célula eucariota e inhibir la síntesis proteica, provocando la muerte celular [134]. La secreción de exotoxina A y la producción de sideróforos están controladas negativamente por el gen *fur*, mediante un proceso dependiente de la presencia de hierro. A su vez, la producción de exotoxina A está regulada por otros genes, como *ptxR*, el cual regula positivamente su transcripción, incrementando la síntesis 4-5 veces en la cepa PAO1 de *P.aeruginosa*. Se ha descrito asimismo un gen próximo a *ptxR*, denominado *ptxS*, que codifica una proteína que regula de forma negativa la expresión de *ptxR*, de forma que la eliminación de este conlleva un incremento del doble de producción de exotoxina A [130]. Los genes *ptxR* y *ptxS* también regulan la producción de sideróforos, péptidos que facilitan la captación de hierro en situaciones en las que este es limitante. La producción de sideróforos está relacionada con la virulencia en *P.aeruginosa* [135]. La gravedad de las infecciones oportunistas depende de los factores de virulencia expresados por la bacteria, afectando esta a la citotoxicidad y la resistencia a antibióticos. Dada sus resistencias a antibióticos, las infecciones con *P. aeruginosa* son muy difíciles de combatir, lo que hace muy recomendable la búsqueda de nuevos agentes con este fin.

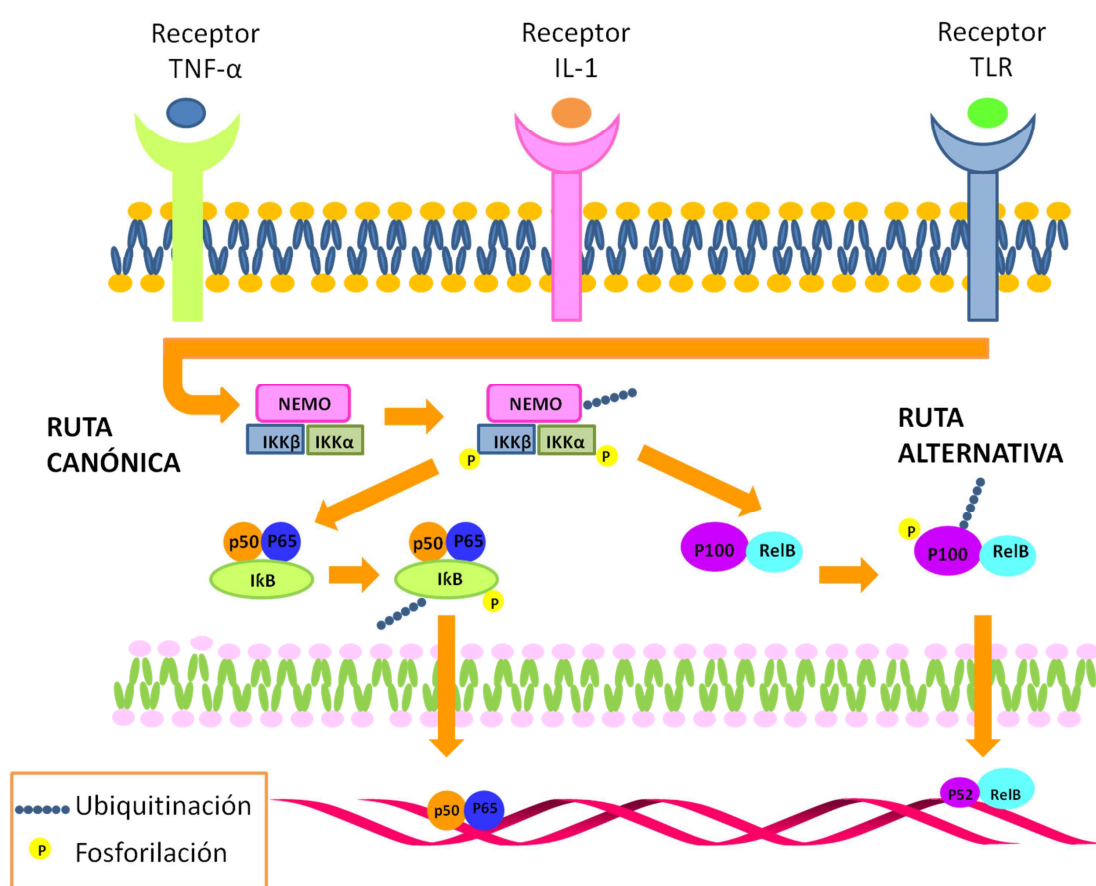
## 2.4. Vías de señalización inmunológicas

### 2.4.1. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción implicado en una gran variedad de procesos biológicos como la proliferación celular, la diferenciación y la respuesta inmunitaria innata y adaptativa [136, 137]. La familia NF- $\kappa$ B está compuesta por 5 miembros que incluyen cRel, RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50) y NF- $\kappa$ B2 (p52) [138-141]. Estas proteínas forman homodímeros o heterodímeros como forma activa. La localización citoplasmática de NF- $\kappa$ B viene regulada por una familia de proteínas inhibitoras denominadas I $\kappa$ B, cuyos principales miembros son I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  [142-144] (Esquema 3). Diversos estímulos (citoquinas, productos bacterianos, estrés oxidativo, etc.), conducen a la activación del complejo IKK, compuesto por 2 subunidades efectoras, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y una subunidad reguladora, IKK $\gamma$  o NEMO [145, 146]. La activación de IKK finalmente dará lugar a la activación de NF- $\kappa$ B y posterior translocación al núcleo. La activación de NF- $\kappa$ B puede producirse a través de 2 vías distintas: la vía clásica o canónica y la vía alternativa [147]. La vía clásica implica la fosforilación de IKK $\beta$ , y la consiguiente fosforilación por esta de I $\kappa$ B, su ubiquitinación por la subunidad 26S del proteasoma y degradación, liberando el dímero NF- $\kappa$ B en su forma activa [148, 149]. El heterodímero compuesto p50/RelA (o variantes de esta fórmula) transloca al núcleo, donde regula la expresión génica. Algunos de los estímulos de la vía clásica son capaces de activar la vía alternativa a través de la activación de IKK $\alpha$  y NIK. Esta vía implica el procesamiento post translacional de p100 dando lugar a p52. IKK $\gamma$  no es estrictamente necesario en la activación de esta vía. La ubiquitinización de p100 no implica su degradación completa por el proteosoma, sino que genera un producto activo capaz de unirse al ADN: p52. Este proceso es más lento que la activación de la vía clásica e implica una activación retardada de complejos que contienen p52 como p52/RelB. La activación de la vía alternativa parece estar restringida a algunos miembros de TNFR y virus oncogénicos [150-152].

La estimulación de la mayoría de los TLR induce la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo donde regula la expresión de diversos genes implicados en la respuesta inmunitaria innata o adaptativa. Se ha relacionado la activación continuada de NF- $\kappa$ B con el desarrollo de inflamación crónica y daño tisular. Diversos modelos experimentales de colitis en animales muestran una activación de NF- $\kappa$ B y, en concordancia con estos datos, el bloqueo de dicho factor supone una mejora del estado de los animales y de la colitis [153, 154]. Por el contrario, la activación de NF- $\kappa$ B también está implicada en el

mantenimiento de la integridad del epitelio y protege frente a la muerte celular mediante la inducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas [155, 156]. La falta de activación de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  en ratones con delección génica de NEMO en epitelio intestinal supone el desarrollo de una inflamación crónica grave [18], de forma que la estimulación de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  podría ser beneficiosa para el mantenimiento de la integridad del epitelio y jugar un papel protector en el desarrollo de la colitis. De hecho, la teoría más reciente propone que es necesaria una estado de activación basal para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario intestinal.



Esquema 3: Ruta de señalización de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$

### 2.4.2. Mitogen-activated protein kinases (MAPK)

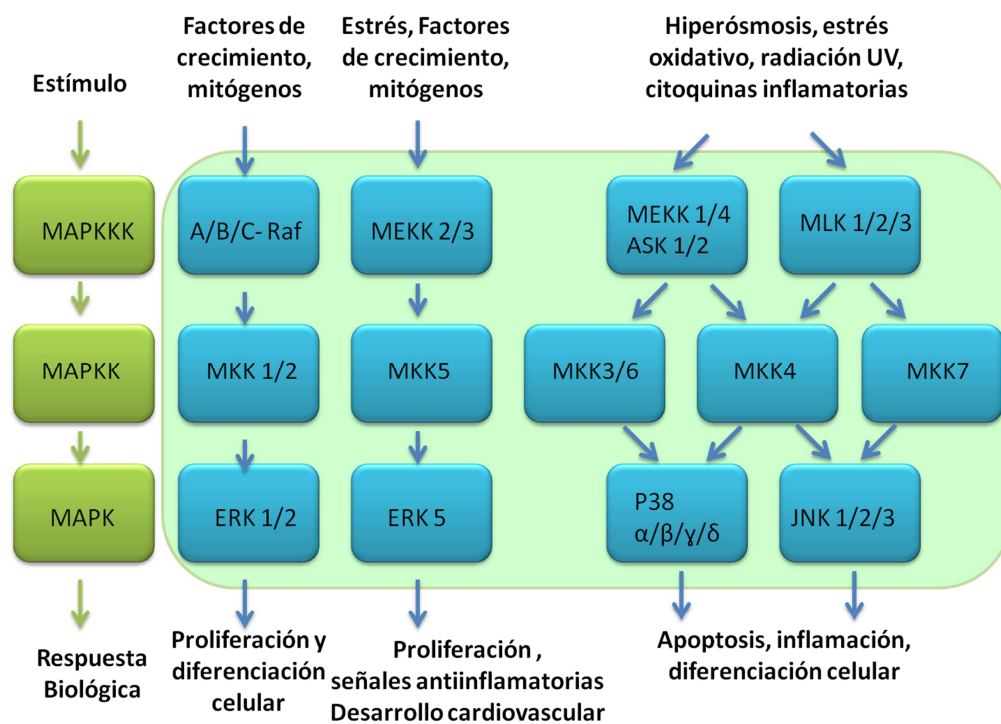
Las MAPK son componentes de cascadas de señalización donde distintos estímulos extracelulares (citoquinas, estrés celular, factores de crecimiento, etc.) convergen para iniciar una respuesta inflamatoria [157]. Son un grupo heterogéneo de enzimas responsables de la fosforilación de aminoácidos de serina y treonina en distintas proteínas. Existen siete familias de MAPK que pueden dividirse en dos grupos: las MAPK clásicas (ERK1/2, p38, JNK y ERK5) y

las MAPK atípicas (ERK3, ERK4, ERK7, y NLK [158, 159]. Existe cierta redundancia entre las distintas rutas de señalización de las MAPK .

La unión del ligando a un receptor inicia una cascada de eventos responsables de distintas respuestas celulares. Las MAPK actúan como intermediarios durante este proceso. Después de la activación del receptor, MAP3K es activada y fosforila a MAP2K. Esta a su vez activa a la MAPK, la cual es capaz de unirse y fosforilar otras proteínas, translocar al núcleo para activar la transcripción de distintos genes o inducir otras acciones como la migración celular (Esquema 4) [160].

La regulación de la acción de las MAPK se produce a distintos niveles, por un lado controlando la presencia o ausencia de una proteína en concreto de la cascada [158, 161] o mediante la acción de fosfatasas que actúan como reguladores negativos de las MAPK [162].

El papel de MAPK en procesos inflamatorios en el sistema gastrointestinal ha sido demostrado en diversos estudios, siendo ERK, p38 y JNK las MAPK más estudiadas. Algunos trabajos demuestran la implicación de ERK5 potenciando las señales antiinflamatorias y promoviendo la proliferación y supervivencia de macrófagos [163, 164]. La activación de ERK1/2 conlleva la activación de proteínas proinflamatorias como fosfolipasa A y de factores de transcripción como Ets-1, Elk y c-myc. Estos factores de transcripción están implicados en procesos inflamatorios como la migración y la proliferación celular [165-167]. ERK1/2 participa en vías de señalización inducidas por IL-21 e IL-1 [168, 169]. El papel regulador de p38 en la producción de citoquinas ha sido demostrado tanto en colonocitos *in vitro* como en macrófagos en un modelo de colitis experimental en ratones [170-172]. p38 puede activar distintos factores de transcripción como PPAR- $\alpha$  o Cdx-2, este último implicado en la diferenciación de células epiteliales intestinales [173, 174]. Además, diversos genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata en el sistema gastrointestinal e incluso el factor de transcripción anteriormente descrito NF- $\kappa$ B son regulados por p38 [171, 175, 176]. JNK es responsable de la fosforilación de c-Jun, perteneciente a la familia de factores de transcripción AP1 responsables de la transcripción de muchos genes incluyendo genes que codifican diversas citoquinas [177-181].



Esquema 4: Rutas de señalización de las MAPK



### 3. Transporte hidroelectrolítico intestinal

Una de las principales funciones del intestino es la absorción de agua y nutrientes. La absorción de agua es indispensable para la supervivencia del individuo y, por tanto, está regulada estrictamente, de forma que existe un equilibrio entre secreción y absorción. El transporte de agua está controlado por el transporte de iones, el cual es regulado a su vez por diversos factores luminales, hormonas, el sistema nervioso entérico y células presentes en la mucosa. La ruptura de este equilibrio da lugar a diarrea o estreñimiento [182].

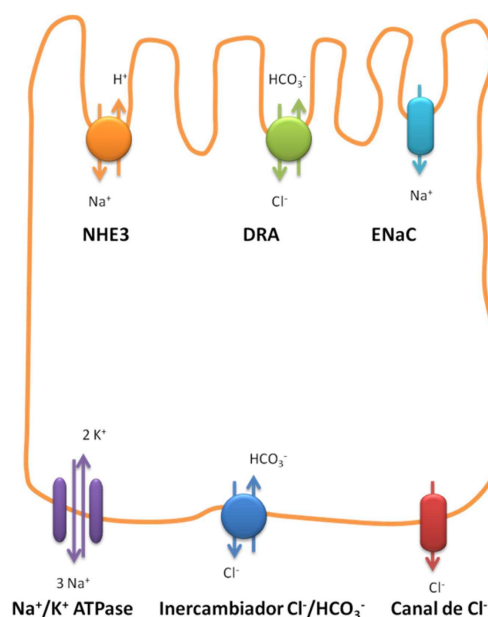
En condiciones fisiológicas, la absorción y secreción de agua se encuentran reguladas a la perfección, siendo los enterocitos las células encargadas del transporte iónico epitelial. Gracias a la existencia en su cara apical de estructuras denominadas microvellosidades, la superficie de contacto con el lumen está incrementada y por tanto, también lo está la capacidad de absorción y secreción del enterocito. El transporte de agua está regulado indirectamente por el movimiento de iones de un lado a otro del epitelio, el cual se consigue a través de unos transportadores especializados que se encuentran localizados de forma asimétrica a lo largo del intestino.

La fuerza responsable tanto de la absorción como de la secreción es la bomba ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , localizada en la membrana basolateral del enterocito [183]. La ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  está compuesta por una subunidad  $\alpha$  funcional y una reguladora  $\beta$  y transporta tres iones sodio fuera de la célula y dos iones potasio al interior en cada ciclo. Este proceso requiere energía y es capaz de producir un desequilibrio eléctrico (voltaje intracelular negativo) y químico (diferente distribución de sodio y potasio a ambos lados de la membrana). Esta situación favorece la entrada de cationes, especialmente sodio, y la salida de aniones y potasio, a través de canales y transportadores a favor de gradiente.

El agua sigue el movimiento de los iones por ósmosis y es capaz de atravesar el epitelio paracelularmente, a través de las *uniones estrechas* o bien transcelularmente, a través de canales denominados acuaporinas y, en menor medida, empleando transportadores iónicos.

### 3.1. Absorción hidroelectrolítica

La absorción de agua está ligada al transporte de sodio desde la membrana apical del enterocito a la basolateral (Esquema 5). El sodio penetra en el enterocito por la membrana apical a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  3 (NHE3), mientras que el Cloro entra mediante el intercambiador DRA (de "DownRegulated in Adenoma", por su lugar de identificación original), intercambiándose con el anión bicarbonato. Dado que la distribución de las cargas a ambos lados de la membrana permanece intacta, podemos decir que la absorción de NaCl es electroneutra. El sodio sale del enterocito a través de la bomba ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , mientras que el cloruro sale de la célula por la membrana basolateral mediante canales de cloro o intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . En la región distal del colon, la absorción de sodio también puede ser electrogénica, debido a la expresión del canal de sodio epitelial ENaC. ENaC está compuesto por tres subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , siendo estas dos últimas inducidas por la aldosterona.

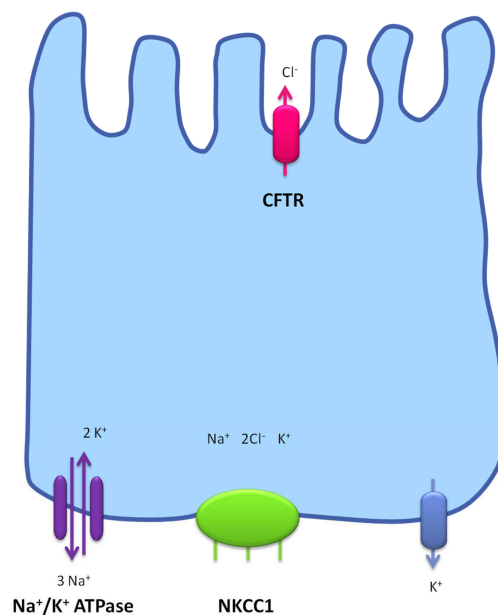


Esquema 5: absorción iónica en el epitelio intestinal

### 3.2. Secreción hidroelectrolítica

La secreción de agua está ligada al transporte de cloro desde la sangre al lumen (Esquema 6). El cloro penetra en el enterocito junto con sodio y potasio a través del cotransportador electroneutro  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$  NKCC1, localizado exclusivamente en la membrana basolateral. El potasio sale de nuevo de la

célula por la membrana basolateral gracias a canales específicos, puesto que la concentración de potasio intracelular es mayor. A su vez, la diferencia de potencial de membrana favorece la salida de cloro por la membrana apical a través del regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR). Por tanto, la secreción de cloro es electrogénica. El sodio que penetra en el enterocito es expulsado por la bomba ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , pudiendo seguir al cloro mediante transporte paracelular. CFTR no solo es un canal de cloro sino que también es capaz de regular la actividad de otros transportadores como NHE3 y ENaC [183, 184]. Existen otros canales de cloro pero su importancia fisiológica parece ser secundaria. Además de cloro, el epitelio intestinal también secreta bicarbonato a través de CFTR y otros mecanismos [185]. El bicarbonato se sintetiza en el interior de la célula a partir de agua y dióxido de carbono mediante la acción de la anhidrasa carbónica. También penetra basolateralmente a través de un mecanismo electroneutro ligado al sodio [183]. El potasio se secreta también vía apical, especialmente cuando se padece diarrea.



Esquema 6: Secreción iónica en el epitelio intestinal

### 3.4. Regulación del transporte iónico

La absorción y secreción de agua e iones son procesos que ocurren simultáneamente en el epitelio intestinal [185]. Se conocen gran cantidad de mediadores fisiológicos e inmunitarios capaces de regular el transporte epitelial,

interactuando con receptores específicos como los muscarínicos [186], de sustancia P [187], del factor de crecimiento epidérmico [188], de prostaglandinas [189], serotonina [190], histamina [191], péptido relacionado con el gen de la calcitonina [192], IL-1 $\beta$  [193], TNF [194], factor activador de plaquetas [195] y receptores activados por proteasas [196], entre otros. En ocasiones el mecanismo no es directo, sino que implica la participación de distintas moléculas de señalización como prostaglandinas, péptido intestinal vasoactivo u óxido nítrico [197, 198]. La fuente de estos mediadores es en muchos casos extraepitelial, es decir, neuronas entéricas o células estromales. El transporte epitelial también se ve afectado por estímulos exógenos como productos de la dieta, ácidos biliares, toxinas bacterianas y fármacos.

En general, la regulación intracelular del transporte iónico ocurre a través de las vías de señalización de Ca<sup>2+</sup>/Inositol-3-fosfato (IP<sub>3</sub>) y adenosín monofosfato cíclico (AMPc) [183, 199]. El incremento en AMPc activa la proteína quinasa A, la cual fosforila CFTR y aumenta la inserción basolateral de NKCC1 y la activación y apertura de los canales de potasio basolaterales. La fosforilación de CFTR implica un cambio conformacional que se traduce en la apertura del canal. El AMPc también inhibe la absorción electroneutra de cloruro sódico mediante la activación de proteína quinasa A y consiguiente inhibición de NHE3. GMPc también es capaz de activar CFTR e inhibir NHE3. NHE3 y CFTR se inhiben mutuamente y, de hecho, se ha propuesto que CFTR es necesario para que se produzca la inhibición de la absorción de NaCl debida a AMPc [200]. CFTR también regula ENaC [201]. Todo esto indica que un aumento de los niveles de AMPc y la consiguiente activación de la proteína quinasa A da lugar a un aumento de la secreción y una inhibición en la absorción de agua.

Por otro lado, el principal mecanismo de regulación cuando se produce un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, por activación de la vía de señalización Ca<sup>2+</sup>/IP<sub>3</sub>, es la activación de canales basolaterales de potasio aumentando el gradiente eléctrico y favoreciendo la secreción de aniones.

Los mineralocorticoides y los glucocorticoides se encuentran entre los principales factores que regulan la absorción en intestino. A dosis bajas, los glucocorticoides inducen la absorción electroneutra de NaCl en el colon proximal y distal, induciendo también la absorción electrogénica en el colon distal a dosis elevadas. La aldosterona induce la absorción electrogénica de sodio e inhibe la electroneutra en el colon distal. Sin embargo, esta inhibición

desaparece ante una elevada concentración de glucocorticoides por desplazamiento de sus receptores [183].

### **3.5. Transporte hidroeléctrico en condiciones de inflamación**

La inflamación afecta al estado fisiológico del intestino en diversos aspectos: alterando la motilidad intestinal, la funcionalidad neuronal y el transporte hidroeléctrico [202, 203], provocando diarrea. Actualmente se considera que la diarrea en inflamación se produce principalmente por alteraciones en el transporte de agua, que en teoría podrían deberse a tres mecanismos distintos: alteraciones en la función barrera del epitelio, aumento en la secreción iónica e inhibición de la absorción iónica.

#### **3.5.1. Alteración epitelial**

La integridad del epitelio puede verse comprometida en condiciones de inflamación debido a la presencia de mediadores de inflamación o factores nocivos que se encuentran en el lumen. Este daño en la barrera puede contribuir a la pérdida de fluidos de lámina propia a lumen. En enfermedad inflamatoria intestinal (EII), se han detectado la presencia de defectos en la función barrera debido principalmente a un aumento de la permeabilidad en las *uniones estrechas* [204-206] y del transporte transcelular. Cabe destacar que estas alteraciones no llevan a una gran pérdida de fluidos gracias a la efectividad de los distintos mecanismos de reparación activados por las células epiteliales adyacentes al daño [207, 208].

#### **3.5.2. Alteraciones en la secreción iónica**

En lo que respecta a la secreción iónica, no solo no está aumentada si no que se ha demostrado que es menor en tejido inflamado, probablemente como mecanismo de protección evitando la pérdida excesiva de fluidos y electrolitos. El óxido nítrico y el sistema nervioso entérico podrían estar implicados en dicha disminución de la secreción reduciendo la activación de CFTR y NKCC1 mediante la vía de señalización de AMPc. Por tanto, la diarrea que se produce durante la inflamación no puede asociarse a un exceso de secreción.

#### **3.5.3. Alteraciones en la absorción iónica**

Durante la inflamación intestinal se produce una disminución de la absorción de sodio [209-213] debida a la alteración en la expresión y regulación de los transportadores implicados: NHE3, ENaC y la bomba ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Como

consecuencia se produce una reducción de la absorción de agua que contribuye a la diarrea observada durante la inflamación.

## **4. Enfermedad inflamatoria intestinal**

### **4.1. Generalidades**

Enfermedad inflamatoria intestinal es un término que describe una inflamación crónica, idiopática y recurrente del tracto gastrointestinal en la que se alternan periodos activos de la enfermedad y de remisión de la misma. La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) son las principales formas clínicas de la EII.

Los síntomas en la EII dependen de la extensión, distribución y gravedad de la inflamación intestinal. Muchos de los síntomas están relacionados con la localización anatómica de la enfermedad (diarrea, cólico abdominal). Sin embargo, también se manifiestan gran cantidad de síntomas sistémicos consecuencia de la inflamación intestinal (anorexia, pérdida de peso, malnutrición, anemia, fiebre).

Aunque muchos de los síntomas de la CU y la EC son comunes, existen notables diferencias clínicas entre ambas enfermedades. En la CU la inflamación comienza generalmente en el ano y se extiende de manera continua afectando tan solo al colon. Además, la inflamación es superficial afectando solo a la mucosa. En la EC, la inflamación puede producirse en cualquier tramo del tracto gastrointestinal de forma discontinua alternándose zonas lesionadas con zonas sanas. Estas zonas lesionadas están afectadas por una inflamación transmural que se extiende por todas las capas de la pared intestinal. En la CU los síntomas son bastante uniformes, de forma que los pacientes sufren diarrea a menudo con pérdida de sangre y pérdida de peso. Sin embargo, en la EC, dada la gran extensión que puede afectar prácticamente a cualquier zona del tracto gastrointestinal, además de la distribución transmural y frecuentes complicaciones como fístulas, los síntomas son muy variables no solo entre pacientes, sino también entre las distintas fases activas de la enfermedad en un mismo paciente.

Dado el desconocimiento de la etiología de la EII, el tratamiento es sintomático y aunque mejora la enfermedad a menudo no es eficaz e implica efectos adversos graves en el individuo. El tratamiento de primera elección de pacientes con CU moderada es la mesalamina (5-ASA). Ese grupo de fármacos es menos efectivo en la EC [214]. Para asegurar la liberación del fármaco en colon se emplea sulfasalazina que consiste en la combinación de 5-ASA unido a una sulfapiridina por un enlace azo que es metabolizado por las bacterias colónicas. Los corticoides pueden emplearse solos o en combinación con mesalamina para inducir remisión en la EII. Sin embargo, no son efectivos como terapia de mantenimiento. El esteroide de elección es prednisona, aunque la budesonida también se utiliza frecuentemente puesto que presenta menos efectos secundarios sistémicos debido a un fuerte metabolismo hepático de primer paso [215]. Un gran número de pacientes con EII responden de forma inadecuada a los glucocorticoides siendo resistentes a su efecto o dependientes de él [216]. Ante esta situación se emplean otros inmunosupresores de distinta naturaleza: metotrexato, tacrolimus, azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina. Por último, se han desarrollado terapias biológicas siendo los anticuerpos monoclonales contra TNF- $\alpha$  (Infliximab, Adalimumab) la principal terapia de este tipo.

## 4.2. Epidemiología

La realización de estudios epidemiológicos de la EII presenta dificultades debido a diversas características de la propia enfermedad, como su comienzo insidioso que retrasa su diagnóstico, así como la existencia de un determinado número de casos en los que es difícil determinar el diagnóstico diferencial entre CU y EC. Además, al no existir criterios diagnósticos universales, el estudio comparativo de los diferentes estudios epidemiológicos en las distintas áreas geográficas es complicado [217].

La incidencia de la CU aumentó substancialmente en los inicios y tercio medio del siglo XX, estabilizándose posteriormente, mientras que la incidencia de la EC, ha estado aumentando desde la segunda mitad del siglo XX [218]. En la actualidad, las tasas tienden a estabilizarse en áreas de alta incidencia como en el norte de Europa y América mientras que siguen subiendo en zonas de baja incidencia como Asia y países subdesarrollados [219]. En zonas de alta incidencia, la edad del grupo de población más afectado va de 20 a 40 años tanto en la EC como en la CU [220]. En áreas de incidencia alta, la CU es más

frecuente en hombres y la EC en mujeres [221]. Algunos estudios sugieren la existencia de un gradiente oeste-este en la incidencia de la EII. También se ha asociado un mayor estatus socio-económico con mayor riesgo de padecer EII [222, 223].

### **4.3. Etiología**

Actualmente, la etiología de la EII es desconocida, aunque se han detectado diversos factores ambientales, genéticos e inmunológicos implicados en el desarrollo de la enfermedad. La teoría más plausible asocia la EII a una respuesta inmunitaria exacerbada frente a antígenos lumenales en individuos genéticamente predispuestos. A continuación se describen algunos de los factores de riesgo asociados al comienzo y desarrollo de la EII:

#### **4.3.1. Predisposición genética**

Diferencias en la frecuencia de la EII en distintas etnias, así como la agregación familiar y un aumento en concordancia en gemelos monocigóticos en comparación con gemelos dicigóticos demuestran que existe cierta predisposición genética a padecer EII. Otras evidencias que apoyan esta hipótesis son la relación existente entre determinados marcadores genéticos específicos con varias formas de la EII, la conexión entre regiones específicas cromosómicas en la EII en diversas familias [224] o su asociación con otros síndromes genéticos [225].

La EII se considera una enfermedad genética que presenta un patrón de herencia no Mendeliano. Una de las principales hipótesis viene dada por el modelo oligogénico según el cual la predisposición a padecer EII se debe a la interacción entre dos o más genes principales. Los estudios de asociación genética han permitido la localización de genes que confieren susceptibilidad a padecer EII. Los resultados obtenidos confirman que hay múltiples loci que confieren susceptibilidad a EII [224].

El primer gen de susceptibilidad a EII que se identificó fue NOD2. Se detectó una alteración en el marco de lectura y dos mutaciones sin sentido que incrementan el riesgo de EC ileal e ileocolónica pero no de EC colónica ni de CU [226]. Este gen codifica una proteína que actúa como receptor reconecedor de patrones que regula la apoptosis en monocitos además de modificar la



activación de diversas vías inmunológicas entre ellas el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Otros estudios han detectado la existencia de un gen (IBD5,) que confiere susceptibilidad a padecer EC, en el cromosoma 5q31 [227]. En este locus se han identificado un gran número de genes candidatos de carácter inmunológico como IRF1, IL-4, IL-13, IL-5 e IL-3 así como los genes que codifican el transportador de cationes orgánico OCTN1/2, relacionado con una mayor susceptibilidad a padecer EC [228].

También se ha detectado una asociación entre la región MHC y la susceptibilidad a desarrollar la EII [229, 230].

Los estudios de asociación del genoma, han permitido identificar en el cromosoma 9q32 una región en la que encontramos el miembro 15 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF15) [231]. Otros estudios identificaron asociación entre la EII y la región del gen de IL-23R en el cromosoma 1q31 [232]. Un homólogo de IL-23R, IL-12B está relacionado significativamente con la EII [232, 233]. Otros genes que codifican proteínas relacionados con esta vía también han demostrado estar relacionados con la EII (JAK2 y STAT3 en la EC) [234, 235].

En el cromosoma 12q12 se han identificado 3 genes asociados a autofagia ATG16L1, IRGM y LRRK2 relacionados con EC [234, 236, 237]. Otros estudios han identificado genes implicados en la homeostasis como ICOLG (*inducible T-cell costimulator ligand*), PTPN2 y PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 and 22*), CDKAL1 e ITLN1 (intelectina 1) [234] en loci relacionados con la EII).

#### **4.3.2. Microbiota**

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la EII se caracteriza por una respuesta inmunitaria alterada frente a la microbiota intestinal. Algunos factores pueden contribuir a la pérdida de tolerancia a la microbiota en pacientes con EII como la propia susceptibilidad genética del individuo, defectos en la función barrera o un desequilibrio en la composición de la flora bacteriana.

Algunos modelos animales de inflamación intestinal nos permiten evidenciar la importancia de la microbiota en el desarrollo de la EII. Por ejemplo, en los ratones con delección genética de IL-2 o para IL-10, la presencia de flora bacteriana es condición *sine qua non* para el desarrollo de la enfermedad.

A pesar de que la EII es más común después de padecer infecciones gastrointestinales, la búsqueda de un origen infeccioso como origen de la CU a lo largo de los años ha sido infructuosa [238]. Sin embargo, se ha observado una alteración de la microbiota normal. Los principales cambios detectados han sido una reducción en la diversidad y un descenso en la estabilidad y en la presencia de determinadas especies individuales. En algunos de los pacientes de CU sometidos a cirugía, se observó una reducción de miembros del filo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* [239]. El descenso en la proporción de *Bacteroidetes* en pacientes con CU se puede atribuir a bacterias de la familia *Prevotellaceae*. También se han descrito un aumento en la densidad de bacterias adheridas al epitelio colónico en paciente con CU [240].

Tampoco se ha identificado ningún patógeno causante de la EC a pesar de que han sido propuestos algunos microorganismos como *Mycobacterium avium paratuberculosis* [238, 241]. Lo que sí está claro es que la microbiota juega un papel crítico en la patogénesis de las lesiones. En pacientes con EC sometidos a cirugía se ha observado un descenso en la diversidad de la microbiota asociada a la mucosa intestinal [242]. Esta reducción de la biodiversidad, al igual que en pacientes con CU, implicó una ruptura del equilibrio con predominio de bacterias más agresivas [243]. Además las poblaciones bacterianas en pacientes con EC no solo se diferencian de los de pacientes sanos sino que también existen distintos perfiles dentro de la enfermedad diferenciándose notablemente la microbiota en la EC con afectación colónica de la de afectación ileal [244].

La manipulación de la flora entérica se ha propuesto como una de las estrategias terapéuticas posibles en el manejo de la inflamación intestinal. Para alcanzar dicho fin, se han utilizado tanto antibióticos como probióticos y prebióticos.

#### **4.3.3. Otros factores de riesgo**

Diversos factores de riesgo se han relacionado con la EII, sin embargo, el mecanismo fisiológico de cada uno de ellos permanece sin aclarar. Además, en la mayoría de los casos, exceptuando el consumo de tabaco no han demostrado su implicación al realizarse posteriormente estudios más exhaustivos.

Diversos estudios demuestran que el consumo de tabaco protege frente a la CU [245]. Sin embargo, el consumo de tabaco es un factor de riesgo en la EC [246]. También se ha atribuido un papel protector de la apendicectomía previa

para el desarrollo de CU especialmente cuando esta se realiza con anterioridad a los 20 años de edad [247-249]. Por el contrario, en la EC, la apendicetomía se ha relacionado con un mayor riesgo de estenosis [250]. A pesar de que durante los años 80 se sugirió cierta relación entre el consumo de anticonceptivos orales y la EII, actualmente no hay ninguna evidencia que demuestre que el consumo de estos fármacos influya en el inicio y/o desarrollo de la EII [251].

#### 4.4. Inmunología de la EII

La alteración en la interacción entre la microbiota y la mucosa puede dar lugar a una respuesta inmunitaria alterada que conduce a inflamación en el intestino. A continuación se describen algunas de las distintas vías por las cuales la microbiota puede dar lugar a una respuesta inflamatoria no controlada.

En pacientes con EII se han detectado alteraciones en la barrera epitelial que preceden al inicio de la enfermedad [252]. Algunos de los mecanismos que podrían explicar el daño en la función barrera, que implica alteraciones en la resistencia y permeabilidad de esta, son la ruptura de las *uniones estrechas* por parte de células T o una alteración del sistema nervioso entérico [206, 253].

El sistema inmunitario innato en el epitelio en la EII no funciona con normalidad. Una de las causas, es la modificación de la comunicación entre el sistema inmunitario y la microbiota en la que los PRR (TLR, NOD like) juegan un papel clave. El mal funcionamiento de estos receptores puede conducir a la pérdida del control de la inflamación dando lugar a la EII. Los datos obtenidos hasta ahora son bastante controvertidos en lo que respecta al papel de TLR4 en inflamación. La depleción de TLR4, MyD88 o NEMO en IEC o en células no hematopoyéticas implica un defecto en la defensa contra las infecciones bacterianas o la inflamación (ver apartado receptores *Toll-like*) [18-20]. Sin embargo, muchos estudios demuestran un aumento en la expresión de TLR en la mucosa en EII. También los niveles de expresión de MD-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  están elevados en intestino inflamado como consecuencia de un exceso en la respuesta al LPS bacteriano [254]. El análisis inmunohistoquímico de criosecciones de íleon procedente de pacientes con CU en fase activa de la enfermedad y en remisión mostró un aumento significativo en la expresión de TLR2. En este mismo estudio también se encontró un aumento significativo de la expresión de TLR4 en íleon terminal y recto de pacientes con CU en fase activa de la enfermedad. La expresión de CD14 estaba incrementada en íleon terminal

de pacientes con EC en fase activa y de remisión, en el ciego de pacientes con CU en remisión y en fase activa y en el recto de pacientes con CU con enfermedad activa [255]. En otro estudio la expresión de TLR3 fue menor en pacientes con EC [256]. TLR no se expresa solo en células epiteliales, sino también en macrófagos de lámina propia, en miofibroblastos o en células endoteliales, indicando la importancia de estos en la inmunidad innata. Se ha demostrado que los ratones TLR4<sup>-/-</sup>, TLR3<sup>-/-</sup> y MyD88<sup>-/-</sup> muestra una mayor susceptibilidad a la colitis inducida por DSS, aunque existe cierta controversia en este sentido. Estos resultados sugieren que los polimorfismos en TLR podrían afectar a la sensibilidad a patógenos de la flora .

Los estudios genéticos han revelado la importancia de NOD2 en la EII. En la EC la expresión de NOD2 está aumentada en células epiteliales [257]. Diversas citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pueden ser responsables del aumento en la expresión de este receptor. Al igual que con el TLR4, la relación existente entre el desarrollo de inflamación y la alteración de NOD2, en cuanto a mayor o menor eficiencia de su funcionalidad, es bastante controvertida. Algunos datos sugieren que el desarrollo de la EII es el resultado de una menor eficiencia de NOD2 como consecuencia de la alteración genética [234]. Sin embargo, también se ha propuesto que un aumento en la función de NOD2 potenciaría la actividad de NF- $\kappa$ B y el procesamiento de IL-1 $\beta$  en un modelo experimental [258]. NOD2 no solo se expresa en células del sistema inmunitario sino también en células de Paneth [104]. Los ratones mutados en NOD2 presentan una menor resistencia frente a bacterias administradas oralmente y las células de Paneth producen menos péptidos antimicrobianos. Estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana de las defensinas se necesita para la protección de la integridad de la mucosa de forma que defectos en la barrera conducen a la intrusión de antígenos bacterianos, produciendo inflamación crónica.

Otro de los mecanismos alterados en el sistema inmunitario en la EII es el reconocimiento y presentación de antígenos. Las células dendríticas son las principales APC profesionales en el GATL. En la EII encontramos un mayor número de células dendríticas que expresan mayor cantidad de MHCII y moléculas coestimuladoras. Además, en modelos experimentales se ha detectado un aumento en la secreción de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-18 en células dendríticas [259]. En muestras histológicas de colon y recto de pacientes con EC se observó la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD83, y

CD86) en células dendríticas CD11+. Otros describen una alteración en el comportamiento de las células dendríticas en la EC. En cualquier caso, estos datos evidencian la importancia de esta población celular en las reacciones del sistema inmunitario innato y adaptativo en el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmunitaria. Las APC no profesionales, como las IEC, son responsables de la activación de células T efectoras en pacientes con EII. Estas células en condiciones normales inducen anergia; sin embargo, la presencia de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  provoca un cambio de fenotipo aumentando la expresión de MHC en su superficie [56]. En pacientes con EII las IEC también expresan moléculas coestimuladoras que favorecen su transformación en APC funcionales [260].

Los pacientes con EII tienen alterados los sistemas de tolerancia central y periférica de forma que las células T autorreactivas se mantienen en vez de activarse los correspondientes mecanismos de apoptosis [261].

El balance entre células T reguladoras y efectoras está modificado en la EII. La EC se caracteriza por ser una respuesta inmunitaria principalmente dominada por linfocitos Th1 mientras que en la CU domina la respuesta Th2. En lámina propia en la EC predominan los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45R0<sup>+</sup>. Las células T CD4<sup>+</sup> son principalmente Th1 y producen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6. Sin embargo, en la CU, predomina la IL-5 y en menor medida el IFN- $\gamma$ . En la pared intestinal de ratones SCID con inflamación intestinal se han detectado células T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) productoras de citoquinas proinflamatorias Th1, productoras de IL-10 y Th3 productoras de TGF- $\beta$  [262]. En la EC, la activación de células T podría ser el resultado de la liberación de IL-12, IL-23 e IL-8 por células dendríticas y macrófagos [263]. Sin embargo, en la CU una de las citoquinas clave sería la IL-13 [264]. Otras citoquinas de carácter antiapoptótico como IL-2, IL-6, IL-15, IL-17 e IL-18 también están presentes en la EII.

La subpoblación de linfocitos Th17 también es responsable de la inflamación en la EC. Las citoquinas implicadas en este subtipo son la IL-17, IL-22, IL-21. En muestras de pacientes con EC se ha observado un incremento en IL-17 e IL-21 [265, 266]. Estudios en animales sugieren que la mejoría observada en la terapia con anti-IL-12 podría deberse a la IL-23, ya que comparten la subunidad p40. La depleción del gen que codifica la proteína IL-23 p19 inhibe la colitis producida en el modelo de ratones con deleción génica de IL-10<sup>-/-</sup>, mientras que la depleción de IL-12p35 no, sugiriendo que la IL-23 y no la IL-12 es importante en el efecto beneficioso observado en este modelo [267].

El reconocimiento de antígenos mediante APC provoca la migración de células del sistema inmunitario del sistema circulatorio a la mucosa en pacientes con EII. A la migración celular se le suma la liberación de quimiotrayentes como IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), MCP1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1), MCP2 (proteína quimiotáctica de monocitos 2), y MCP3 (proteína quimiotáctica de monocitos 3), induciendo cambios conformacionales en moléculas de adhesión en linfocitos y granulocitos. Los macrófagos producen citoquinas proinflamatorias como IL-1 o TNF- $\alpha$  que aumentan la expresión de ligandos de moléculas de adhesión en el endotelio vascular de los vasos sanguíneos de la mucosa promoviendo la adhesión de leucocitos y la extravasación al tejido [268, 269].

En la mucosa se acumulan gran cantidad de metabolitos y mediadores de inflamación como óxido nítrico, radicales de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, histaminas y metaloproteasas que dañan el tejido [270-272].

#### **4.5. Modelos experimentales de EII**

Aunque la mayoría de los modelos experimentales de inflamación no reproducen la complejidad de la enfermedad en humanos, son de gran utilidad en el estudio de la fisiopatología de la EII. Además, nos permiten estudiar el posible efecto terapéutico de nuevos compuestos. La mayoría de estos modelos están basados en inducción química, transferencia de células del sistema inmunitario o modificaciones genéticas. En algunos casos la enfermedad surge espontáneamente. Podemos clasificar los modelos animales en tres categorías de acuerdo al defecto en la inmunidad que desencadena la enfermedad:

**Defectos en la integridad y/o permeabilidad de la mucosa:** Modelos de colitis inducida por agentes químicos (DSS, TNBS u oxalazona), ratones mutantes quiméricos para N-cadherina, ratones deficientes en keratina 8, ratones deficientes en MDR1, ratones deficientes en IKK- $\gamma$ /IKK $\alpha\beta$  en células epiteliales intestinales y modelos de inflamación espontánea (ratones SAMP1/Yit).

**Defectos en el sistema inmunitario innato:** ratones deficientes en STAT3 en células mieloides, ratones deficientes en A20.

**Defectos en el sistema inmunitario adaptativo:** ratones TNF<sup>ΔARE</sup>, modelo de transferencia de células CD45RB<sup>hi</sup>, ratones transgénicos para STAT4, ratones deficientes en IL-10, ratones con delección génica de TCRα [273].

#### 4.5.1. Colitis inducida por DSS

La administración de DSS (sulfato de dextrano sódico) en agua de bebida induce una colitis aguda que se caracteriza por diarrea sanguinolenta, ulceraciones e infiltración de granulocitos [274]. El DSS es tóxico para las células del epitelio intestinal de las bases de las criptas, afectando a la integridad de la membrana. La respuesta aguda se caracteriza por un aumento en la producción de citoquinas secretadas por macrófagos (IL-6, TNF-α, IL-1β y GM-CSF). El modelo DSS es especialmente útil para estudiar la contribución del sistema inmunitario innato en colitis, así como los mecanismos de reparación intestinal. La inmunidad adaptativa no parece estar implicada de forma obligada en este modelo de colitis (al menos en la fase aguda) dado que en ratones deficientes en células T y B C.B-17<sup>scid</sup> o Rag1<sup>-/-</sup> también se produce inflamación [275]. En determinadas cepas la administración de DSS durante varios ciclos provoca una colitis crónica que puede ser combinada con una dosis inicial y única del carcinógeno azoximetano (AOM) dando lugar a un modelo de inflamación asociado a cáncer colorrectal [276]. En la fase crónica la inflamación está mediada por linfocitos Th1 y Th2 productores de IFN-γ e IL4 que han sido activados en la fase aguda [277].

## 5. Oligosacáridos no digeribles: Alimentos funcionales

Denominamos oligosacáridos no digeribles (OND) a aquellos que son capaces de resistir la acción de enzimas digestivas del organismo. Químicamente los OND son carbohidratos complejos, con distinto grado de polimerización. La resistencia a la digestión de estas moléculas viene dada por el tipo de enlace glucosídico que se da entre los monómeros o por la propia selectividad de sustrato de las enzimas digestivas [278-280]. La mayoría de los OND presentan enlaces β-glucosídicos y no pueden ser degradados por las enzimas humanas que son específicas para enlaces α. Además, aunque la enzima β galactosidasa se encuentra en el borde en cepillo y es capaz de romper los β-galactooligosacáridos, su actividad es débil y presenta mayor afinidad por otros sustratos. A menudo se ha englobado a los OND como alimentos

funcionales [281], entendiendo como tales aquellos que ejercen una acción beneficiosa sobre el individuo y/o que reducen el riesgo de padecer alguna enfermedad crónica, independientemente de su propio efecto nutritivo [282-285]. Cabe destacar que un alimento funcional debe demostrar sus efectos cuando se consume a dosis habituales en la dieta [283, 284]. La mayoría de los efectos que se han atribuido a los OND se han relacionado con su acción como prebióticos. Sin embargo, los OND también pueden ejercer acciones directas independientes de sus acciones mediadas por la microbiota.

### **5.1. Efecto prebiótico de los OND**

Prebióticos son aquellos ingredientes alimentarios no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento de determinadas bacterias colónicas, principalmente lactobacilos y bifidobacterias, mejorando la salud del hospedador [286]. Diversos estudios en animales han demostrado el efecto prebiótico de los OND, principalmente de fructooligosacáridos, aunque también de oligosacáridos de distinto tipo [287, 288]. Factores como la dosis y duración del tratamiento, el lugar de fermentación (colon distal o proximal), así como la composición inicial de la microbiota, influyen en el efecto prebiótico de estos compuestos [289].

Como resultado de la fermentación de los OND por las bacterias colónicas se producen ácidos grasos de cadena corta, principalmente acetato, butirato y propionato, responsables de muchos de los efectos beneficiosos atribuidos a estas sustancias [286, 290]. Los ácidos grasos de cadena corta acidifican el medio y favorecen el crecimiento de determinadas bacterias como lactobacilos y bifidobacterias, lo que dificulta el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas [280, 291, 292]. Además, los ácidos grasos son absorbidos y utilizados como fuente de energía por distintos tipos celulares: butirato en el caso de los enterocitos, propionato y acetato por los hepatocitos, y este último también por el músculo y otros tejidos periféricos. Además de ejercer un efecto antiinflamatorio en la EII, los prebióticos pueden ejercer otras acciones como consecuencia de su interacción con la microbiota, como se expone a continuación.

#### **5.1.1. Mejora del tránsito intestinal**

Diversos estudios demuestran la utilidad de distintos OND como fructooligosacáridos (FOS), inulina o lactulosa en el tratamiento del



estreñimiento. Dicho efecto puede explicarse como consecuencia de un incremento de la masa de heces que resulta del incremento de la masa microbiana y de la consecuente producción de gas. Además se puede producir una mayor retención de agua en las heces [292] [278, 293].

### **5.1.2. Aumento de la absorción de Calcio**

Se ha demostrado que el tratamiento con distintos OND, FOS [278, 293-296], galactooligosacáridos (GOS) [294, 297] y lactulosa [298] en adolescentes y mujeres postmenopáusicas da lugar a una mejor absorción de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dicha absorción viene favorecida por el descenso del pH debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta, que aumenta la solubilidad y biodisponibilidad de minerales, especialmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  [292-295, 298, 299]. Otros mecanismos propuestos son el aumento del contenido de agua en el colon, que incrementa la solubilidad de los electrolitos [278, 300], o un aumento de la capacidad absorptiva del epitelio como consecuencia de la estimulación de la proliferación de células epiteliales intestinales por el butirato derivado de la fermentación de los OND [298, 301].

### **5.1.3. Disminución del riesgo de cáncer de colon**

La fermentación de los OND en el colon protege frente al desarrollo de cáncer de colon mediante distintos mecanismos: la producción de butirato incrementa la proliferación de células normales, suprimiendo la de células cancerígenas [299, 302-305]; a su vez, las bacterias beneficiosas promovidas por estos oligosacáridos producen menor cantidad de sustancias carcinogénicas y de enzimas implicadas en el cáncer de colon [278, 297, 306]. El incremento del tránsito intestinal también está implicado en una menor exposición a estas sustancias carcinogénicas. Las sales biliares secundarias están implicadas en el cáncer de colon y los OND son capaces de reducir su concentración gracias a la disminución del pH producida por los ácidos grasos de cadena corta.

### **5.1.4. Alteraciones metabólicas**

Los OND son capaces de modular el metabolismo lipídico hepático en ratas y hámsters [307]. La Sociedad Americana de Nutrición confirma la capacidad de los OND de modular el metabolismo lipídico en humanos. Este efecto hipocolesterolémico e hipotriglicérico podría estar relacionado con la capacidad de prevenir la formación de picos de glucosa en sangre después de las comidas, observado en tratamientos con inulina y GOS [308].

### **5.1.5. Prevención de infecciones intestinales**

Diversos experimentos *in vitro* demuestran que las bacterias productoras de ácido láctico presentan actividad antibacteriana sobre organismos patógenos, debido en parte a la liberación de productos que provienen de la fermentación de OND como el ácido láctico, o las bacteriocinas. Estas sustancias impiden el crecimiento de bacterias patógenas, permitiendo la expansión de bacterias beneficiosas. Los ácidos grasos de cadena corta mejoran la función barrera en células epiteliales T84. A su vez, la inulina inhibe la colonización intestinal por parte de *Salmonella enterica* en un ensayo *in vitro* [309]. FOS e inulina protegen frente a patógenos entéricos (*Candida albicans*) y sistémicos (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*) en ratones B6C3F1 mediante un mecanismo que puede ser directo o indirecto mediante la competición por el crecimiento [9].

### **5.1.6. Modulación del sistema inmunitario**

Aunque hay indicios que señalan que los OND actúan sobre el sistema inmunitario gastrointestinal, se desconoce el mecanismo exacto por el que se produce este efecto [310]. Dicho mecanismo podría estar relacionado con el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias, por acciones inmunomoduladoras de los ácidos grasos de cadena corta, o por acciones directas de los propios OND [299, 311].

## **5.2. Efectos directos de los OND (independientes de su acción prebiótica)**

La bibliografía basada en la caracterización de los efectos directos de los OND, objeto de estudio de esta tesis doctoral, es menos extensa y se centra principalmente en el estudio de los oligosacáridos de leche materna. Sin embargo se han descrito diversas acciones destacando el efecto inmunomodulador de estos compuestos sobre el organismo.

### **5.2.1. Inhibición de la adhesión de bacterias patógenas a células intestinales**

Los oligosacáridos ácidos de la leche materna pueden inhibir la unión de organismos patógenos a células epiteliales actuando como análogos de receptores de patógenos [21, 312]. La síntesis de estos oligosacáridos es llevada a cabo por glucosiltransferasas similares a las que sintetizan las glicoproteínas

de la superficie epitelial y por tanto, cabe esperar que presenten estructuras en común [312]. Los gangliósidos de leche materna también pueden desactivar la toxina lábil de *Escherichia coli*, así como la toxina del cólera [313]. Otros oligosacáridos, en concreto los GOS, inhiben la adhesión de bacterias enteropatógenas a cultivos de células Caco-2 [314].

### 5.2.2. Modulación de la respuesta inmunitaria

Diversos estudios demuestran la capacidad de los oligosacáridos de leche materna de inhibir la adhesión y reclutamiento de leucocitos a las zonas inflamadas [315], así como las interacciones célula-célula de leucocitos y linfocitos. La presencia de estructuras sialil-Lewis en dichos oligosacáridos sugiere que estos podrían actuar como ligandos de selectinas expresados en la superficie de leucocitos, plaquetas y células endoteliales [316]. El epítipo Lewis X presente en oligosacáridos de leche materna puede unirse a DC-SIGN, un receptor de lectinas presente en células dendríticas. Esta unión impide la captación y posterior transferencia de VIH-1 a linfocitos T CD4+ [317] demostrando el papel de los oligosacáridos en la presentación de antígenos y transferencia de patógenos.

Los oligosacáridos de leche materna también afectan a la proliferación y diferenciación de linfocitos. Estructuras neutras de oligosacáridos que se encuentran en la leche materna como LNFPIII (Lacto-N-fucopentose III) activan la proliferación de linfocitos B e inducen la producción de IL-10 en células B procedentes de bazo. Los oligosacáridos de leche materna incrementan la producción de IFN- $\gamma$  e IL10 en células mononucleares de cordón umbilical, favoreciendo la diferenciación de células T aTh1 [318] [319, 320]. A su vez, también conducen la respuesta Th2 de individuos alérgicos a los cacahuets hacia un perfil Th0, modificando la ratio IFN- $\gamma$ /IL-13 e IFN- $\gamma$ /IL-4. [319].

En células Caco-2 distintos oligosacáridos ( $\alpha$ 3-sialolactosa y raftilosa p95) demostraron cierta actividad antiinflamatoria al reducir la producción de citoquinas proinflamatorias mediante la modulación de PPAR $\gamma$  e inhibición de NK- $\kappa$ B.

Estos datos sugieren que los oligosacáridos podrían actuar de forma directa modulando la respuesta inmunitaria independientemente de su acción prebiótica. Aunque no hay datos concluyentes en lo que respecta a la absorción de oligosacáridos *in vivo*, se ha demostrado que tanto los oligosacáridos de leche materna como los fructooligosacáridos y galactooligosacáridos son capaces de atravesar una monocapa de células Caco-2 *in vitro* [319].

### 5.2.3. Regulación del transporte intestinal y de la permeabilidad intestinal

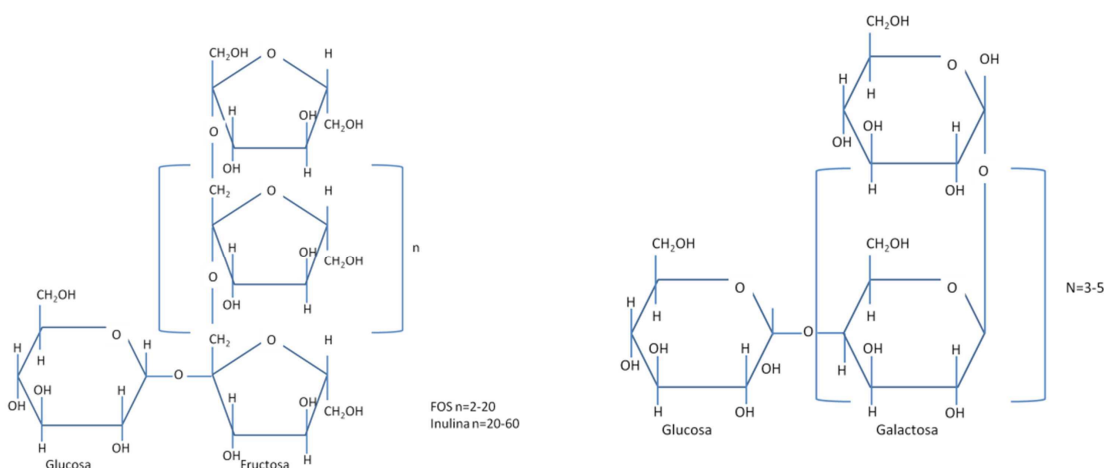
Un estudio realizado en células Caco-2 ha demostrado que distintos OND, entre ellos FOS o rafinosa, incrementan el transporte neto de  $\text{Ca}^{2+}$  vía paracelular a través de las *uniones estrechas* [321].

## 5.3. Fructooligosacáridos: Inulina y FOS

Inulina y FOS son fructooligosacáridos lineales  $\beta(1\rightarrow2)$ [322] que difieren tan solo en el grado de polimerización, siendo de 2 a 20 en el caso de FOS y de 20 a 60 en la inulina (Esquema 7). Son de origen natural, puesto que se encuentran en raíces de plantas como la achicoria, la dalia, la cebolla y el ajo, y constituyen el tipo más abundante de oligosacáridos en la dieta. Debido a la configuración  $\beta(1\rightarrow2)$  de las uniones entre los monómeros de fructosa, FOS e inulina llegan al colon esencialmente intactos, donde son fermentados por las bacterias colónicas. FOS e inulina son los prebióticos más estudiados. Diversos estudios demuestran que son capaces de estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas, principalmente bifidobacterias, y en menor proporción lactobacilos y probablemente otras especies, dando lugar a efectos beneficiosos en el hospedador [323]. Se han realizado diversos trabajos que muestran cómo FOS e inulina aumentan la absorción de minerales como el calcio y el magnesio [324] y modulan la digestión, absorción y metabolismo de lípidos hacia un patrón más beneficioso [325]. A su vez, actúan sobre el sistema inmunitario, reduciendo el riesgo de enfermedades relacionadas con alteraciones en el funcionamiento del sistema inmunitario gastrointestinal como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal [326]. En lo que respecta al cáncer de colon, los fructooligosacáridos han demostrado suprimir el desarrollo de cáncer inducido en diversos modelos animales [327]. Además de los efectos relacionados con alteraciones de la defensa gastrointestinal, se ha demostrado que el consumo de dietas ricas en fructooligosacáridos también puede reducir el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con disfunciones de la inmunidad sistémica, reduciendo el riesgo de infecciones [9] y modulando negativamente la carcinogénesis en un modelo de inducción de cáncer de mama [328], retardando el crecimiento de tumores implantados [329], disminuyendo la incidencia de metástasis en un modelo experimental [330] y potenciando la efectividad de la terapia contra el cáncer [331, 332].

## 5.4. Galactooligosacáridos (GOS)

Los GOS se obtienen a partir de sirope de lactosa concentrado mediante la acción de la enzima lactasa, dando lugar a oligosacáridos compuestos por monómeros de galactosa con una glucosa terminal unidos mediante enlaces  $\beta 1 \rightarrow 3$ ,  $\beta 1 \rightarrow 4$  y  $\beta 1 \rightarrow 6$  (Esquema 7)[333, 334]. Han sido objeto de estudio en virtud de su semejanza con los oligosacáridos de la leche materna. Los GOS actúan como prebióticos, modificando la microbiota intestinal y produciendo múltiples efectos beneficiosos para el organismo (mejora en el tránsito intestinal, aumento de la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$ , y prevención del desarrollo de cáncer de colon entre otros) [2]. Cabe destacar que GOS fue el oligosacárido con mayor capacidad para inhibir la adhesión de bacterias patógenas a células HEP-2 y Caco-2 en un estudio realizado *in vitro* [314].



**Esquema 7: Estructura de los oligosacáridos. A) Fructooligosacáridos y B) galactooliosacáridos.**

## 5.5. Oligosacáridos de leche de cabra

Los oligosacáridos de leche materna han demostrado ejercer efectos beneficiosos para el recién nacido no solo por su carácter prebiótico, sino también por su capacidad para modular la respuesta inmunitaria [335-337]. La leche de cabra es la más parecida a la materna en cuanto a concentración, composición y complejidad de los oligosacáridos [338]. Esto sugiere que los oligosacáridos de leche de cabra (OSLC) podrían tener efectos fisiológicos similares a los de la leche materna. La actividad antiinflamatoria intestinal de los oligosacáridos de leche de cabra y su efecto prebiótico han sido demostrados en distintos modelos animales [4, 16].

# Objetivos

EL objetivo principal de esta tesis es contribuir a un mejor entendimiento del mecanismo de acción de los OND. La novedad de este objetivo radica en las escasas referencias a las acciones directas de oligosacáridos sobre la mucosa intestinal y en el hecho de que se estudien tanto oligosacáridos ampliamente conocidos como FOS e inulina como productos más novedosos como GOS y OSLC. Actualmente existen gran cantidad de aplicaciones para prebióticos, por lo que el conocimiento en profundidad de su mecanismo de acción es de gran interés. Los objetivos concretos de esta tesis doctoral son los siguientes:

- Efecto directo de FOS e inulina sobre distintas características de la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*.
- Caracterización de los efectos inmunomoduladores directos de los OND en células epiteliales intestinales.
- Caracterización de los efectos directos de los OND in vivo.

A raíz de los resultados obtenidos durante la realización de experimentos en condiciones de esterilidad, surge objetivos adicionales durante el desarrollo de esta tesis doctoral:

- Estudio del papel de la microbiota en el transporte de agua y electrolitos en colon en condiciones basales.
- Estudio del papel de la microbiota en el transporte de agua y electrolitos en colon en colitis inducida por DSS.

# **Material y Métodos**



## 1. Materiales

Excepto en caso de que se indique expresamente, todos los reactivos empleados se obtuvieron de Sigma (Madrid, España). Beneo-Orafti nos suministró tanto FOS como Inulina, mientras que GOS fue suministrado por Vivinal Friesland Campina (Barcelona, España). Los OSLC fueron aislados por el departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada a partir de leche de cabra desnatada pasteurizada. El producto final contenía más del 80% en oligosacáridos con solo un 5% (peso/peso) de lactosa y libre de sales. Los principales oligosacáridos encontrados fueron Oligosacáridos ácidos: 6-sialil-lactosa, 3-sialil-lactosa, disialil-lactosa y N-glicolilneuraminil-lactosa y oligosacáridos neutrales: 3-galactosil-lactosa, lacto-N-hexaosa y N-acetilglucosaminil-lactosa [338].

## 2. Ensayos *in vitro*

### 2.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares utilizadas en este estudio, IEC18, HT29, y Caco-2 se obtuvieron del Servicio de Cultivo Celular de la Universidad de Granada. Estas células fueron cultivadas en DMEN suplementado con suero fetal bóvido (10%), L-glutamina (2mM), estreptomina (100 mg/l), penicilina (100000 U/l ) y anfotericina B (2,5 µg/ml). La línea celular Caco-2/TC7 fue una donación de la Dra. Ana Isabel Alcalde de la Universidad de Zaragoza. Las condiciones de cultivo de estas últimas tan solo difieren de las anteriores en la que están suplementadas con suero fetal bovino al 20%. Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Los experimentos con IEC18, HT29 y Caco-2 se llevaron a cabo al alcanzar confluencia, exceptuando aquellos que implicaban el uso de células silenciadas en los que se evitó dicho estado con el fin de evitar la aparición de células satélite. Las células Caco-2/TC7 se sembraron en transwells hasta que la monocapa alcanzó al menos 300 Ωcm<sup>2</sup> de resistencia eléctrica transepitelial

(TEER) medida con un voltómetro epitelial (EVOM2), (World Precision Instruments, Hertfordshire, Reino Unido).

Los OND fueron disueltos en DMEN completo a las concentraciones de 0,05 mg/ml, 0,5 mg/ml y 5 mg/ml. Todas las soluciones fueron filtradas mediante filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Las células fueron expuestas a los distintos tratamientos con OND durante 24 horas. Se utilizó LPS (E.coli 055:B5) como referencia o cotratamiento junto con los OND a concentraciones submáximas (1  $\mu\text{g/ml}$  para IEC18, 3 $\mu\text{g/ml}$  para Caco-2 y HT29 y 5  $\mu\text{g/ml}$  para Caco-2/TC7).

## 2.2. Estudio de las vías de señalización: NF- $\kappa\text{B}$ y MAPK kinasas

Para determinar las distintas vías de señalización, las células fueron tratadas con Bay 11-7082 (10 $\mu\text{M}$ ), un inhibidor selectivo de la fosforilación de I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  y wortmanina, (1 $\mu\text{M}$ ) un inhibidor de la fosforilación de PI3K que inhibe la vía de señalización de Akt. También se emplearon inhibidores de MAPK: para p38 (SB203580 10  $\mu\text{M}$ ), ERK1/2 (PD98059 10  $\mu\text{M}$ ) y JNK (SP600125 10  $\mu\text{M}$ ). Todos los inhibidores se disolvieron en DMSO y se añadieron al medio de cultivo una hora antes del tratamiento con los OND.

## 2.3. Silenciamiento celular

Las células IEC18 fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Al alcanzar un 50% de confluencia se les añadió polybrene durante 10h. Posteriormente fueron incubadas durante 24 horas con medio de cultivo suplementado con polybrene y las partículas de lentivirus (Control, MyD88 y TLR4 shRNA en cada caso). Finalmente las células fueron seleccionadas con medio enriquecido con puromicina (5-10  $\mu\text{g/ml}$ ). Todos los reactivos empleados en este proceso proceden de Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Alemania).

## 2.4. Cepas bacterianas de *P. aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* y sus mutantes deficientes en ptxS y ptxR se obtuvieron mediante inserción de cassetes de estreptomina y tetraciclina respectivamente. Las bacterias se cultivaron en medio LB o medio mínimo M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/l; NaCl 0,5 g/l;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g/l,  $\text{MgSO}_4$  1mM  $\text{CaCl}_2$  0.3 mM y 1% de citrato de amonio férrico 0.2 ml/l) [339]. Cuando fue necesario se

añadieron antibióticos al medio de cultivo alcanzando las siguientes concentraciones finales: 50  $\mu$ /ml de ampicilina, 50  $\mu$ /ml de estreptomycin y 30  $\mu$ /ml de tetraciclina.

## **2.5. Estudio del crecimiento de *P. aeruginosa***

Se tomaron colonias individuales de *P. aeruginosa* PA01 de la superficie de una placa de LB y se cultivaron durante la noche en medio mínimo M9 (suplementado con citrato 5 mM) a 37°C. Los cultivos fueron diluidos en medio mínimo M9 hasta alcanzar una densidad óptica de 0,05 a 660 nm. A esta concentración se añadieron FOS e Inulina a 5, 15 y 20 mg/ml en placas de 96 pocillos que se incubaron a 37°C en continua agitación en un analizador Bioscreen C MBR FP-1100-C (OY Growth Curves Ab Ltd.Raisio, Finlandia). La turbidez se determinó cada 60 minutos durante 24 horas utilizando un filtro de banda amplia a 420-660 nm. Se empleó la medida a 580 nm para generar las curvas de crecimiento.

## **2.6. Determinación de la formación de películas por *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* se cultivo en medio mínimo M9 suplementado con glucosa al 2% (p/v) y ácidos casamino con y sin FOS e inulina a distintas concentraciones (concentración máxima a 20 mg/ml). La formación de películas se cuantificó a las 6 horas mediante tinción con cristal violeta según el método descrito [340]. La estructura de las películas se observó mediante microscopía de contraste de fase utilizando un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara Nikon DSS-Mc CCD y una lente de aumento 100x. Los resultados se expresan como la cantidad de formación de películas en función de la concentración de FOS e inulina (escala logarítmica). Los resultados son la media de dos experimentos independientes de un n=4 cada uno.

## **2.7. Ensayos de motilidad**

Se estudiaron tres tipos de movimiento bacteriano: *swimming*, *twitching* y *swarming*. Se añadieron FOS e inulina a 5 mg/ml a la suspensión de bacterias. Posteriormente se sembraron las bacterias en el centro de una placa compuesta por LB con 0,2% de ácido casamino (p/v) y 30 mM de glucosa con distintas proporciones de Bacto agar (0,3% para *swimming*, 1,5% para *twitching* y 0,5%

para *swarming*). Después de 24 horas de incubación a 37°C, se detectó la difusión radial (*swimming*), la expansión de la bacteria (*twitching*) así como el movimiento superficial de la bacteria (*swarming*)[341]. Los ensayos se realizaron en triplicado.

## 2.8. Aislamiento de macrófagos mediante purificación celular magnética

Para la obtención de poblaciones de macrófagos purificadas, se empleó el sistema de separación magnética de columnas (Miltenyi). Se extrajo el bazo de ratas Wistar hembra sacrificadas por dislocación cervical. Mediante la ruptura del bazo en DMEN, se obtuvo una suspensión celular que fue centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos. Para eliminar los eritrocitos, las células se resuspendieron en un tampón de lisis hipotónico (15mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH 7.3) durante 30 minutos en hielo. Las células mononucleares fueron lavadas y resuspendidas en MACs buffer (PBS suplementado con 0,5% (p/v) BSA, 2 mM EDTA, pH 7.2). A continuación se obtuvo una suspensión monocelular utilizando un filtro de 70 µm con el fin de facilitar el marcaje magnético y posterior purificación por selección negativa. La suspensión monocelular se incubó durante 30 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos: CD161.1-biotin (1:200), CD45RA-PE (1:200) y CD3-biotin (1:150) (Bioscience Erembodegem Bélgica). Se retiraron el exceso de anticuerpos mediante lavado con el tampón MACs y posterior centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Después de resuspender en tampón MACs se añadieron los anticuerpos para biotina y PE marcados con bolitas magnéticas, manteniendo la incubación durante 30 minutos a 4°C. Previo lavado, las células CD161.1+, CD45RA+ y CD3+ quedaron descartadas utilizando una columna LD (Miltenyi Biotec Alemania). La población purificada en macrófagos atraviesa la columna. Posteriormente es centrifugada y resuspendida en DMEN suplementado. La pureza de la población obtenida fue comprobada mediante citometría de flujo utilizando un FACSCalibur™ (BD Biosciences, California EE.UU.).

## 2.9. Co-cultivo de *P aeruginosa* y macrófagos

Se tomaron colonias individuales de *P aeruginosa* PA01 y sus mutantes PtxS y PtxR de la superficie de una placa de LB y se cultivaron durante la noche en LB (suplementado con los antibióticos anteriormente descritos) a 37°C. Se

eliminó el LB y los antibióticos mediante centrifugación (4500 rpm 15 minutos) y las bacterias fueron resuspendidas en DMEN completo y cultivadas junto con los macrófagos obtenidos por selección magnética (con una relación de 5 bacterias por macrófago) junto con FOS e Inulina a 5 mg/ml durante 4 horas.

### **2.10. Co-cultivo de *P. aeruginosa* e IEC18**

Las células IEC18 fueron infectadas con *P. aeruginosa* (ratio 1:5) al alcanzar la confluencia en presencia de FOS e inulina (5 mg/ml). Antes de recoger las células para la extracción de proteínas, fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con gentamicina (100 µg/ml) durante una hora para eliminar las bacterias. El protocolo de extracción y cuantificación de proteínas y la técnica de Western blot se describe posteriormente.

### **2.11. Extracción y cuantificación de proteínas. Western blot**

El medio de cultivo fue retirado y las células se recogieron en tampón de lisis (PBS, 0.1% SDS, 0.1% desoxicolato sódico, 1% triton X-100, ortovanadato sódico 2mM y una mezcla de inhibidores de proteasas preparada extemporáneamente: iodoacetamida, aprotinina, pepstatina A, fenantrolina y fenilmetilsulfonil fluoruro). Los homogenados fueron sonicados y centrifugados a 7000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método del ácido bicinchonínico [342]. Una vez obtenido el extracto proteico las células fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos junto con el tampón de carga (SDS 312 mM, glicerol 50% (v/v), 2-mercaptoetanol 1% (v/v), EDTA 22,5 mM, Tris 220mM pH 6.8 junto con trazas de azul de bromofenol). Tras la separación de proteínas mediante un gel de acrilamida, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF dependiendo del anticuerpo primario y bloqueadas durante 1 hora y 30 minutos con una solución 5 % de leche desnatada en polvo en TBS-T. Se realizó un control de carga mediante la exposición de la membrana a una solución de ácido acético al 1% (v/v) que contiene Rojo Ponceau al 0.5% (p/v). Las membranas fueron expuestas al anticuerpo primario durante la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron ERK y p-ERK, exotoxina A (Sigma, Madrid España), p-p38, p-JNK y p-IkB (cell signalling, Danvers, MA). Como control de carga, las membranas fueron expuestas a un anticuerpo frente a  $\alpha$ -actina obtenido a través de la Universidad de Iowa. Se utilizaron distintos anticuerpos

secundarios, en función del anticuerpo primario, conjugados con peroxidasa. Las bandas se detectaron utilizando un reactivo para el aumento de la quimioluminiscencia (PerkinElmer, Waltham, MA) y cuantificadas mediante el programa Image J.

### **2.12. Test de citotoxicidad**

La población de macrófagos aislada mediante selección magnética fue cultivada con *P. aeruginosa* con una ratio 1:5 durante 4 horas. Se determinó el porcentaje de citotoxicidad siguiendo el protocolo del kit (cytotox 96 non-radiactive cytotoxicity assay kit Promega Madison, WI, EEUU). Este test determina la cantidad total de lactato deshidrogenasa (LDH) citoplasmática liberada al medio como consecuencia de daño celular, mediante una reacción colorimétrica [343].

### **2.13. Extracción nuclear y determinación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B**

La población de macrófagos purificada fue infectada con *P. aeruginosa* en presencia de FOS e Inulina (5 mg/ml) durante una hora. Tanto la extracción nuclear como la cuantificación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B se realizaron siguiendo las instrucciones de los kits correspondientes: kit de extracción nuclear (Active Motif Bélgica y kit TransAM (Active Motif Bélgica).

## **3. Ensayos *ex vivo***

En estos experimentos se utilizaron ratones machos y hembras de 10 a 15 semanas B6.B10ScN-Tlr4<sup>lps-del/JthJ</sup> (Tlr4 KO) y sus correspondientes animales control C57 BL/6J obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los animales se mantuvieron en jaulas de makrolon equipados con filtros de 45  $\mu$ m (Tecniplast, 1290D420R) sometidos a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad con libre acceso a agua autoclavada y comida (Harlan-Teklad 2014)

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo el colon, posteriormente fue lavado con una solución de PBS enriquecida con antibióticos: (Penicilina 500 U/ml, estreptomina 0,5mg/ml y anfotericina B 1,5

µg/ml. Una vez lavado, el colon fue dividido en fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup> y cultivado con los OND (5 mg/ml) o LPS (10 µg/ml). Después de una incubación de 24 horas, los fragmentos de tejido y el medio fueron congelados a -80°C. Se determinaron los niveles de MCP1 por ELISA y los resultados fueron normalizados en función de la cantidad de proteína de cada fragmento de tejido.

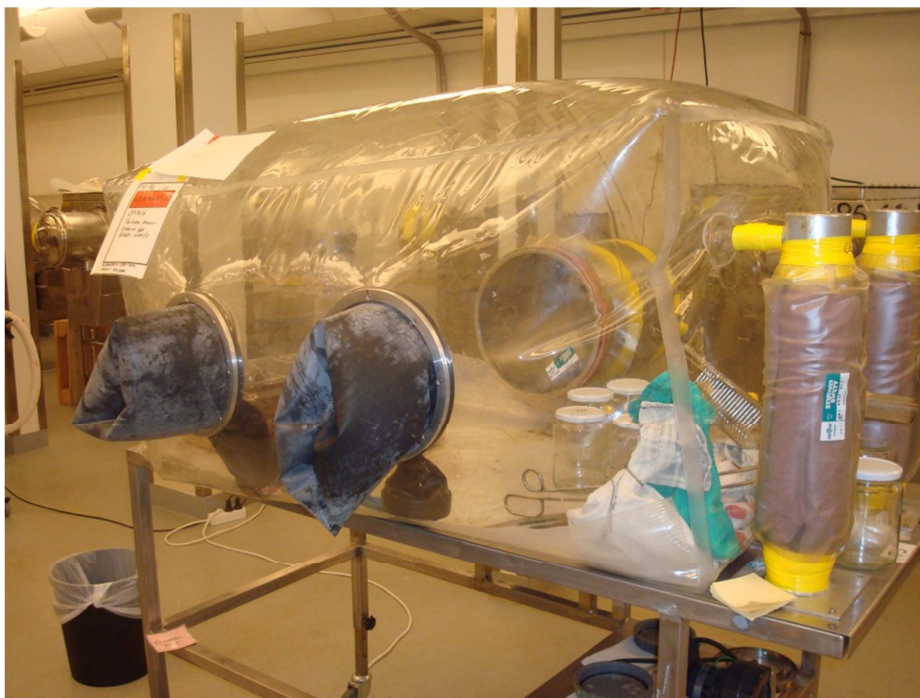
## **4. Ensayos *in vivo***

### **4.1. Animales de experimentación**

Durante la elaboración de esta tesis doctoral se emplearon ratones de distintas cepas. En los experimento ex vivo se utilizaron ratones de 10 a 15 semanas machos y hembras B6.B10ScN-Tlr4<sup>lps-del/JthJ</sup> (Tlr4 KO) y sus correspondientes animales control C57 BL/6J obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Esta última cepa también se utilizó en los experimentos de depleción de microbiota. Los ratones utilizados en experimentos con animales libres de gérmenes y sus correspondientes experimentos controles fueron de la cepa NMRI obtenida del Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia). Para el aislamiento de macrófagos por purificación celular magnética se utilizaron ratas Wistar Hembra obtenidas de Harlan Laboratories (Barcelona, España).

Los animales convencionales se mantuvieron en las instalaciones de la Universidad de Granada en jaulas de makrolon equipados con filtros de 45 µm (Tecniplast, 1290D420R) sometidos a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad con libre acceso a agua autoclavada y comida (Harlan-Teklad 2014). Los animales libre de gérmenes se mantuvieron en aisladores de plástico en las instalaciones del Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia) con libre acceso a agua autoclavada y comida. La esterilidad de los animales se comprobó de forma periódica mediante el cultivo de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de muestras de heces.

Todos los experimentos realizados han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se han llevado a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación.

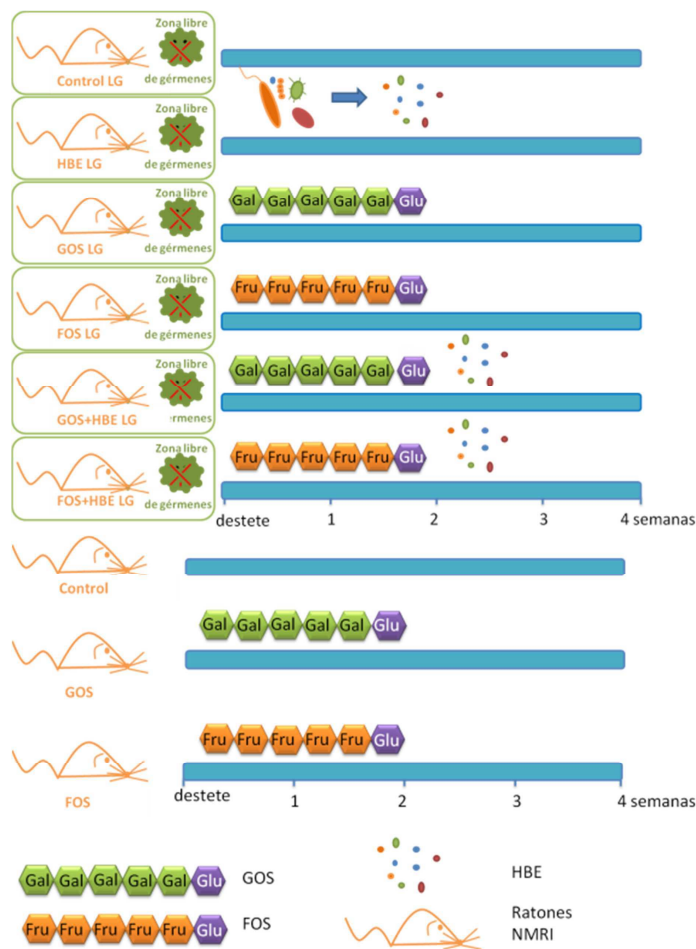


## 4.2. Diseño experimental

### 4.2.1. Efecto de los OND en animales libre de gérmenes

Puesto que el objetivo de esta tesis doctoral es determinar el efecto directo de los OND, independiente de su efecto prebiótico, la realización de un experimento *in vivo* requiere el uso de animales que carezcan de microbiota. Para ello, se utilizaron ratones NMRI machos y hembras mantenidos en condiciones de esterilidad en las instalaciones del Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia). Al alcanzar las 4 semanas de edad, los animales fueron divididos en 6 grupos (n=9), un grupo control, y 5 grupos a los que se les añadió las distintas dietas enriquecidas con: un homogenado de bacterias muertas estéril HBE (1g/6kg de dieta) para simular la presencia de antígenos luminales en intestino, GOS (5 g/kg de dieta), FOS (5 g/kg de dieta) y la combinación de estos últimos con el HBE en las cantidades mencionadas (Esquema 8). Las dietas fueron elaboradas por Lantmännen Lantbruk (Kimstad, Sweden) y esterilizadas mediante radiación gamma. Se realizó un experimento paralelo con animales convencionales en las instalaciones de la Universidad de Granada en el que se excluyeron los grupos tratados con el HBE (Esquema 8). Después de 4 semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical previa anestesia con isoflurano. Se extrajeron los siguientes órganos: duodeno, yeyuno, íleon, colon, hígado y ciego y plasma sanguíneo.

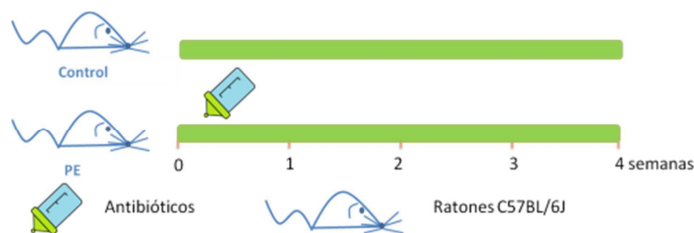




**Esquema 8: Diseño experimental: efecto de los OND en ratones libre de gérmenes y convencionales**

#### 4.2.2. Depleción de la microbiota

Con el objetivo de reducir la microbiota en animales convencionales, se administró una combinación de antibióticos en agua de bebida compuesto por ampicilina 1 g/l, neomicina 1 g/l, metronidazol 0,25 g/l y vancomicina 0,5 g /l a ratones C57 BL/6J [344]. A estos animales se les denominó pseudo estériles. La reducción de la flora bacteriana fue demostrada mediante la obtención de ADN de heces (QIAamp DNA stool Minikit, QIAGEN, Hilden, Alemania) y posterior amplificación de 16s mediante RT-PCR. Los cebadores utilizados fueron: hebra sentido TCCTACGGGAGGCAGCAGT y hebra antisentido GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT. También se realizaron cultivos de heces en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical previa administración de ketamina/xilacina y determinación de la absorción colónica mediante el procedimiento de colon ligado descrito posteriormente en este capítulo. Se extrajeron los siguientes órganos: colon, hígado y ciego además de muestras de suero sanguíneo (Esquema 9).



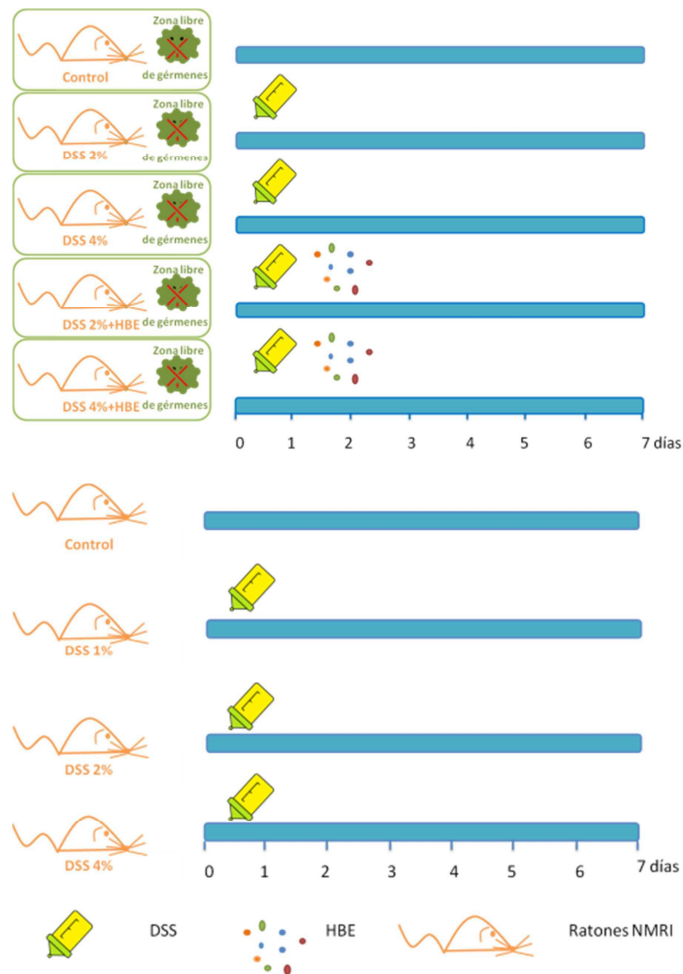
Esquema 9: Diseño experimental: depleción de microbiota.

#### 4.2.3. Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones libres de gérmenes

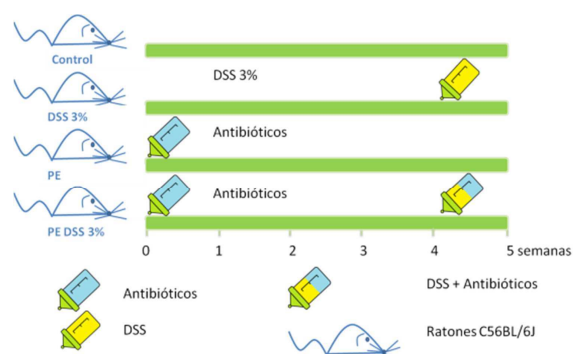
La colitis se indujo mediante la administración de varias concentraciones de DSS (1-4%) en agua de bebida durante 7 semanas a ratones NMRI machos y hembras de entre 16 y 18 semanas en condiciones de esterilidad. A algunos grupos se les administró el HBE en la dieta. Los animales libres de gérmenes fueron mantenidos en las instalaciones del karolinska institutet en las condiciones anteriormente mencionadas. Los ratones fueron distribuidos en cinco grupos: control no colítico (n=8), DSS 2% (n=8), DSS 4% (n=8), DSS 2% + HBE (n=8) y DSS 4% + HBE (n=8) (Esquema 10). Se realizó un experimento en paralelo con ratones NMRI convencionales en las instalaciones de la Universidad de Granada en el que se incluyeron los siguientes grupos: control no colítico (n=11), DSS 1% (n=11), DSS 2% (n=11) y DSS 4% (n=10) (Esquema 10). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical previa anestesia con isoflurano y se recogieron los distintos órganos: colon, e hígado.

#### 4.2.4. Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones pseudo estériles

Se utilizaron ratones C57 BL/6J cuya microbiota fue parcialmente eliminada mediante el protocolo de depleción de microbiota descrito anteriormente. Después de 4 semanas, se indujo la colitis administrando DSS en agua de bebida. Los ratones fueron distribuidos en los siguientes grupos: control (n=4), DSS 3% (n=4), control PE (n=3) y PE DSS 3% (n=7) (Esquema 11). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical previa administración de ketamina/xilacina y determinación de la absorción colónica mediante el procedimiento de colon ligado descrito posteriormente en este capítulo. Se extrajeron los siguientes órganos: colon, ciego, e hígado y suero sanguíneo.



**Esquema 10: Diseño experimental: Colitis experimental inducida por DSS en ratones libres de gérmenes**



**Esquema 11: Diseño experimental: Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones pseudo estériles.**

### 4.3. Obtención de muestras

Los distintos segmentos intestinales se lavaron con solución salina y se secaron en papel de filtro. Posteriormente se eliminó la grasa y adhesiones mesentéricas y se determinó el peso y la longitud. El colon se abrió con el fin de analizar el estado general del tejido. En los experimentos en los que se indujo colitis por DSS, se calculó el índice de daño macroscópico (IDM) evaluando diversas características de la colitis: adhesiones, hiperemia, fibrosis, necrosis deformación, obstrucción, cicatrices y fragilidad (tabla 3). Los segmentos intestinales se dividieron en 3 tiras longitudinales. Se realizaron dos tiras transversales que se emplearon para las muestras histológicas y la obtención de ARN. El resto de órganos se lavaron en solución salina, se secaron en papel de filtro y posteriormente se pesaron. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso a excepción de las muestras de histología.

**Tabla 3: Índice de daño macroscópico**

Parámetro	Aspecto	Valoración
Adhesiones	Ninguno	0
	Diseción dificultosa	1
	Adhesiones visibles	2
	Ovillo	3
Obstrucción	Limpieza normal	0
	Limpieza manual	1
	Impacto fecal	2
Hiperemia	Aspecto normal	0
	Ligera o intensa parcheada	1
	Intensa generalizada	2
	Hemorragia	3
Fibrosis	No hay rigidez	0
	Cierta rigidez	1
	Marcada rigidez	2
Necrosis	Ninguna	0
	Restos aislados	1
	Parcheada	2
	Lesión focal	3
	Lesión continua y extensa	4
Deformación	Forma normal	0
	Ligeramente anormal	1
	Deformación en circulo	2
	Deformación total	3
Otros	Dilatación proximal	2
	Fragilidad	1
	Cicatrices	1

#### **4.4. Determinaciones en suero sanguíneo**

La extracción de sangre se realizó en la bifurcación aorto-femoral en el momento del sacrificio. La sangre fue sometida a una centrifugación de 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C obteniéndose el suero sanguíneo. Para la obtención de plasma sanguíneo se empleó heparina como anticoagulante (5000 UI/ml). Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso. Se determinó la concentración de iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, albúmina y proteínas totales en suero mediante el analizador modular Cobas 8000.

#### **4.5. Preparación del homogenado de bacterias estéril**

Para elaborar un homogenado rico en bacterias que pudiera ser administrado en condiciones de esterilidad se recogieron heces frescas procedentes de rata y se almacenaron a -80°C. Dichas heces fueron homogenizadas en agua destilada en proporción 1:4 y posteriormente sonicadas durante 15 minutos a 4°C. Se realizaron continuas centrifugaciones recogiendo el sobrenadante hasta eliminar los grumos. A continuación, el homogenado fue sometido a un nuevo ciclo de sonicación durante 10 minutos a 4°C. Finalmente el sobrenadante resultante fue filtrado primero con un filtro de 70 µm y posteriormente de 20 µm y se almacenó a -80 para su posterior liofilización.

#### **4.6. Histología**

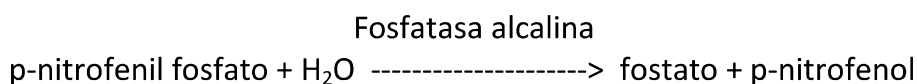
Uno de los fragmentos transversales de tejido procedente de yeyuno y colon fue fijado en paraformaldehído 4% (p/v). Se elaboraron bloques de parafina que sirvieron como soporte para la realización de cortes de aproximadamente 5 µm de sección mediante un micrótopo. Los cortes fueron montados en portas que fueron sometidos a una tinción eosina-hematoxilina con el objetivo de estudiar la morfología e integridad del tejido. Las imágenes fueron captadas por un microscopio Leica DMI3000B acoplado a una cámara Leica DFC420.

#### 4.7. Determinación de actividades enzimáticas:

Las muestras de duodeno, yeyuno, íleon y colon fueron homogenizadas en solución salina 0,4% (p/v) y posteriormente centrifugadas, utilizando el sobrenadante para la determinación de distintas actividades enzimáticas.

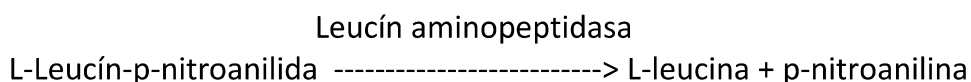
##### 4.7.1. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina

La actividad fosfatasa alcalina se determinó utilizando un método espectrofotométrico descrito por Sanchez de Medina y colaboradores en 2004 [345]. El sustrato de la reacción p-nitrofenil fosfato es catalizado por la enzima fosfatasa alcalina dando lugar a p-nitrofenol. El p-nitrofenol es un producto de la reacción que presenta color amarillo con un máximo de absorción a 405 nm siendo la intensidad del color proporcional a la actividad enzimática ensayada. Los resultados se expresan como mU/mg proteína.



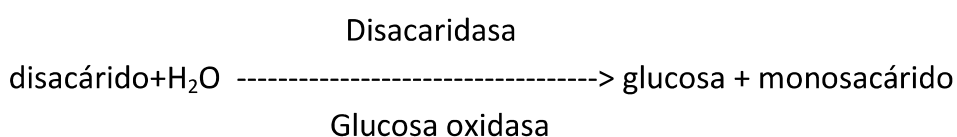
##### 4.7.2. Determinación de la actividad leucín aminopeptidasa

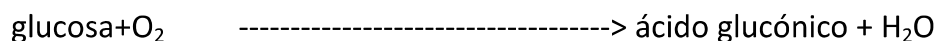
La actividad leucín aminopeptidasa se determinó mediante la hidrólisis del sustrato L-leucín-p-nitroanilida, hasta L-leucina y p-nitroanilina. Este último producto de la reacción presenta color amarillo con un máximo de absorción a 405 nm. La intensidad del color es proporcional a la actividad enzimática de la enzima. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína.



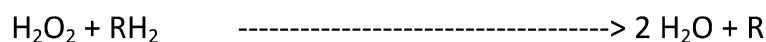
##### 4.7.3. Determinación de las actividades disacaridasas

Se estudiaron las enzimas lactasa y maltasa. El método fue desarrollado por Dahlqvist [346] y consta de dos etapas. En la primera etapa, los disacáridos son hidrolizados por las enzimas correspondientes y en la segunda se determina la glucosa producida en esta primera reacción. Para la determinación de glucosa se emplea glucosa oxidasa y peroxidasa con el fin de oxidar a la o-dianisidina produciéndose un compuesto coloreado cuyo máximo de absorción se presenta a 450nm. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína.





Peroxidasa



#### 4.7.4. Determinación de la actividad mieloperoxidasa

Las muestras de colon fueron homogenizadas en solución tampón TRIS base 50mM y HTAB al 0,5% (p/v) y posteriormente centrifugadas, utilizando el sobrenadante para la determinación de la actividad mieloperoxidasa. En los experimentos en los que se indujo colitis con DSS también se determinó la actividad fosfatasa alcalina en este tampón. La actividad mieloperoxidasa como marcador de infiltración de neutrófilos se realizó mediante el método descrito por Krawisz en 1984 [347] en el que se utiliza peróxido de hidrógeno y o-dianisidina que es oxidada produciéndose un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 450 nm. Los resultados se expresaron como mU/mg de proteína.

#### 4.8. Determinación de absorción colónica: colon ligado

Los animales fueron anestesiados mediante la administración de una solución de ketamina/xilacina vía intraperitoneal. Una vez comprobado el estado de anestesia, se procedió a la apertura de la cavidad abdominal partiendo de un corte medio hacia la zona caudal. Mediante una pequeña incisión en el colon proximal, se introdujo una cánula de 22G (Braun, Melsungen, Alemania) con el objetivo de lavar el colon insuflando solución de Ringer. La solución de Ringer se caracteriza por ser una solución isotónica (NaCl 115 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, glucosa 10 mM). Se introdujo aire en el colon con el fin de eliminar posibles restos de solución y a continuación se ligó el colon distal con hilo de sutura. Finalmente, se insuflaron 300 µl de solución de Ringer, ligando posteriormente la zona proximal del colon. Los animales se mantuvieron durante 30 min próximos a una fuente de calor hasta que fueron sacrificados. La absorción de agua se determinó calculando el volumen inicial introducido en el colon (300 µl) y el volumen restante después de 30 minutos. Los resultados se expresaron como volumen /min.cm.

#### 4.9. Porcentaje de materia seca en heces

Se determinó el peso de heces antes y después de someterlas a un proceso de desecación en estufa de 37°C durante 72 horas. El porcentaje de materia seca se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ materia seca} = (P_{72h} / P_0) * 100$$

#### 4.10. Análisis del transcriptoma de colon y yeyuno: extracción de ARN, hibridación del microarray y análisis de datos

En el estudio del efecto de los OND en animales libre de gérmenes se realizó un análisis del transcriptoma de colon y yeyuno. El ARN total de las muestras, se obtuvo mediante Trizol (Invitrogen, Barcelona, España) y se purificó mediante columnas de afinidad RNeasy (Qiagen, Madrid, España). La cantidad e integridad del ARN fue determinada mediante la relación de absorbancia a 260/280 nm y posterior electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). El análisis del microarray fue realizado por Biogune (Vizcaya, España) utilizando la plataforma MouseWG-6V2 Beadchip (Illumina) Se dispuso de un n=3 en cada grupo siendo a su vez cada muestra, la mezcla de 3 muestras de ratones distintos del mismo grupo. Los datos crudos se extrajeron para su análisis mediante Illumina's GenomeStudio data analysis software. Estos datos fueron analizados utilizando R/Bioconductor statistical computer environment ([www.r-project.org/bioconductor.org](http://www.r-project.org/bioconductor.org)). Los datos fueron transformados a log<sub>2</sub> y normalizados utilizando el paquete lumi Bioconductor. Para la detección de diferencias significativas en la expresión de genes, los datos fueron ajustados a un modelo lineal y posteriormente sometidos a un test estadístico empírico moderado de Bayes mediante el paquete lina de Bioconductor. Con el fin de disminuir la aparición de falsos positivos el valor de p fue ajustado utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg. Se consideró que existían diferencias significativas en aquellos genes cuyo fold change al comparar con el grupo control fue mayor de 1,5 o menor de -1,5 (p-value<0,05).



## 5. Determinaciones generales

### 5.1. Determinación de citoquinas

Tras el cultivo de las distintas líneas celulares, el sobrenadante se recogió y centrifugó a 10.000 rpm 5 minutos. Las distintas alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Se utilizaron diversos kit de ELISA para la determinación de citoquinas: IL-6, TNF- $\alpha$ , IL10 de rata y MCP1 de ratón (BD Biosciences, Erembodegem Bélgica) y GRO $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN)

En un experimento independiente se midieron MCP1, GRO $\alpha$ , RANTES, CXCL10, eotaxina, MIP2, ICAM e IL6 utilizando la tecnología Multiplex (Affymetrix, Santa Clara, CA).

En plasma sanguíneo se determinó la concentración de aldosterona (Alpha Diagnostic International, Texas EE.UU.) y corticosterona (Enzo Life Sciences Bélgica). La determinación de IgA, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> y IgG<sub>3</sub> se realizó simultáneamente mediante tecnología multiplex (Millipore Missouri, EE.UU)

### 5.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR

Se extrajo el ARN total procedente de tejido o de cultivos celulares mediante Trizol (Invitrogen, Alcobendas, España). Se comprobó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando midori green (Nippon Genetics Europe, Dueren, Alemania) como marcador. El ARN fue cuantificado mediante un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 y 1  $\mu$ g de ARN fue retrotranscrito (iScript, BioRad, Alcobendas, España). Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó Syber green como fluoróforo (Promega Madison, WI, EEUU). El gen de referencia elegido fue la subunidad 18s del ARN ribosómico y su expresión fue utilizada como control de carga en los distintos experimentos. La administración de DSS oral puede interferir con la amplificación de ADN<sub>c</sub> mediante RT-PCR [348]. Para evitar este inconveniente, se utilizó el kit de purificación de ARN<sub>m</sub> Dynabeads (Life Technologies, Alcobendas, Madrid) que se basa en la complementariedad entre los residuos de poly A del extremo 3' del ARN<sub>m</sub> y los residuos de oligo (dT)<sub>25</sub> unidos

covalentemente a la superficie de las bolitas magnéticas. En las muestras de ARN<sub>m</sub> purificado se utilizó como gen de referencia GAPDH exceptuando los genes de transportadores en los cuales se empleó villina como gen de referencia, para evitar errores derivados del daño en la integridad del epitelio colónico consecuencia del DSS. Los distintos cebadores empleados se describen en la tabla 4.

**Tabla 4: Secuencia de los cebadores utilizados en PCR**

Gen/ especie	Hebra sentido 5'-3'	Hebra antisentido 5'-3'
<i>TLR4</i> rata	CTGGGACTCTGATCATGGCATT	GTCAGTACCAAGGTTGAGAGC
<i>TLRA</i> humano	GCCAGGAGAACTACGTGTGAAG	TCAAGGAGCATTGCCAACAG
<i>18s</i> rata	GGACACGGACAGGATTGAC	TCGCTCCACCAACTAAGAAC
<i>18S</i> humano	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>Edn1</i> ratón	ACCTGGACATCATCTGGGTCAACA	TGGTCTGTGGCCTTATTGGGAAGT
<i>Aqp8</i> ratón	GCCGTGTGTTCTGGTATGAGCAAT	GTTGAAGTGTCCACCGCTGATGTT
<i>Slc9a3</i> ratón	AAGCGCCTGGAGTCCTTAAAGTCA	ATGCTGCTATTCTCCGCTTCTGT
<i>Slc26a3</i> ratón	ACTTTGAAGACAGTTTGGCGTGG	TATTTGAGGGAGTACACGCTGGCA
<i>Atp1a1</i> ratón	ACCAAATGCATCTGAGCCAAAC	AAGCGTCTTCAGCTCTTCATCCA
<i>Atp1b1</i> ratón	ACGAGGCCTACGTGTAACATCA	TTGAACCTGCACACCTTCTCTCT
<i>Scnn1a</i> ratón	GCAGTTTGCTTTGCTGTTGAGGA	AGACCAGCTTGCCGAATTGAGGT
<i>Scnn1b</i> ratón	TCCAGTACTCCAAGGTCAAGCACT	TGGTCAGGGTCCGCTCATCAATA
<i>Scnn1g</i> ratón	CAAGGTGCTTGCCATCAGCAGAA	TCTGGAGGGAATAGGCAGCATTGT
<i>Cldn4</i> ratón	GACTGTGCAAAGTTACTAGC	ACCAGCAATTTGGATGTAAG
<i>Cldn5</i> ratón	AACAGTTCCTACTGAGATCC	CTTTTTAACACGTCCCTCTG
<i>Ocln</i>	ACGGACCCTGACCACTATGA	TCAGCAGCGCCATGTACTC
<i>Defa1</i> ratón	GTCCTACTCTTGCCCTTG	GCAGCCTCTTGATCTACAATA
<i>Itlnb</i> ratón	CTATGACTTTGGTGATGCTC	AGTATTACATCCAGTGACCC
<i>Cxcl10</i> ratón	AAAAAGGTCTAAAAGGGCTC	AATTAGGACTAGCCATCCAC
<i>Reg3g</i> ratón	CAGAGGTGGATG GGA GTG GAG	CACAGTGATTGCTGAGGAAGAG
<i>Ang4</i> ratón	TTTGGAACTACTGTTGGAAG	TGCTGACGTAGGAATTTTC
<i>Pla2g2a</i> ratón	CAAGAAACCATACCACCATC	TCTTAAGCCGAATCATTTCC
<i>ZO1</i> ratón	GGGGCCTACACTGATCAAGA	TGGAGATGAGGCTTCTGCTT
<i>Muc3</i> ratón	AAA GAT TAC CTC CCA TCT CC	TAAAACCTAAGCATGCCCTTG
<i>Il10</i> ratón	CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG	ATTTTCACAGGGGAGAAATC
<i>Il17</i> ratón	ACG TTT CTC AGC AAA CTT AC	CCCCTTACACCTTCTTTTC
<i>Tnfa</i> ratón	CGT GGA ACT GGC AGA AGA GG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC
<i>Ifng</i> ratón	GCT CTG AGA CAA TGA ACG CTA CAC	TTCTTCCACATC ATGCCACTTGAG
<i>IL1b</i> ratón	AAG GGC TGC TTC CAA ACC TTT GAC	TGCTGAAGCTCTTGTGATGTGC
<i>S100a8</i> ratón	GCC CTC TAC AAG AAT GAC TTC AAG	ATCACCATCGCAAGGAACCTCC
<i>Gapdh</i> ratón	CATTGACCTCAACTCATGG	GTGAGCTTCCCGTTGAGC
<i>18s</i> ratón	TGGTGGAGCGATTTGTCTGG	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTAGC
<i>Villina</i> ratón	TATGGAGGATCGAGGCTATG	AGGTAGTCATCCATCTGTGT

## 6. Análisis estadístico

Todos los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para determinar la significancia estadística, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un test de significancia a posteriori (Fisher LSD). La significancia estadística se consideró para un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó mediante la plataforma informática Sigma Stat 3.5 (Jandel Corporation, San Rafael CA EE.UU.)

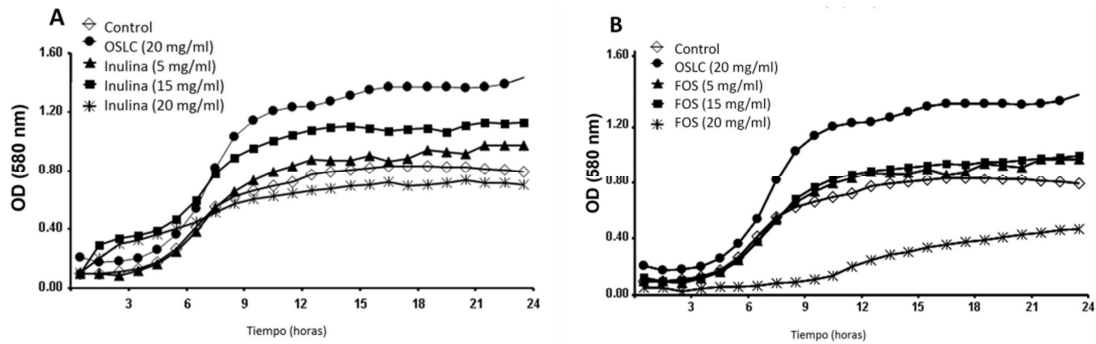
## ***Resultados***

## **1. Efecto de FOS e inulina sobre distintos mecanismos relacionados con la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* es el agente causante de un gran número de infecciones en pacientes inmunodeprimidos en hospitales. El problema fundamental de estas infecciones radica en la gran virulencia y la resistencia a antibióticos que presenta esta bacteria, las cuales se deben, entre otras causas, a su capacidad para formar biopelículas y liberar toxinas mediante distintos sistemas de secreción. Diversos productos naturales han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. En concreto, FOS e inulina inhiben el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* y *Listeria monocytogenes*, así como del hongo *Candida albicans*. El objetivo de esta sección es estudiar el efecto de FOS e Inulina sobre la proliferación de *P. aeruginosa* y de diversos mecanismos que contribuyen a su virulencia.

### **1.1. Efecto de FOS e inulina sobre la proliferación de *Pseudomonas aeruginosa***

Para estudiar el efecto de la inulina y de FOS sobre la proliferación de *P. Aeruginosa* PAO1, se utilizaron concentraciones de ambos productos entre 5 y 20 mg/ml disueltas en medio mínimo M9 suplementado con citrato. La inulina causó solo cambios mínimos en el crecimiento bacteriano, promoviéndolo a concentraciones entre 5-15 mg/ml e inhibiéndolo mínimamente a 20 mg/ml (Fig 1A). Del mismo modo, la adición de FOS a concentraciones entre 5 y 15 mg/ml estimuló el crecimiento bacteriano (Fig 1B). Sin embargo, a la concentración de 20 mg/ml se observó una inhibición importante del crecimiento. Dado que FOS e inulina tan solo difieren en el grado de polimerización, este debe ser un parámetro importante en la actividad antibacteriana. Como control se realizó una curva con OSLC a 20 mg/ml que mostró como estos promovían el crecimiento bacteriano, a las mismas concentraciones a las que FOS presenta efecto inhibitor, por lo que el efecto parece ser específico de este. FOS e inulina favorecieron el crecimiento bacteriano al utilizar medio mínimo M9 (datos no mostrados).

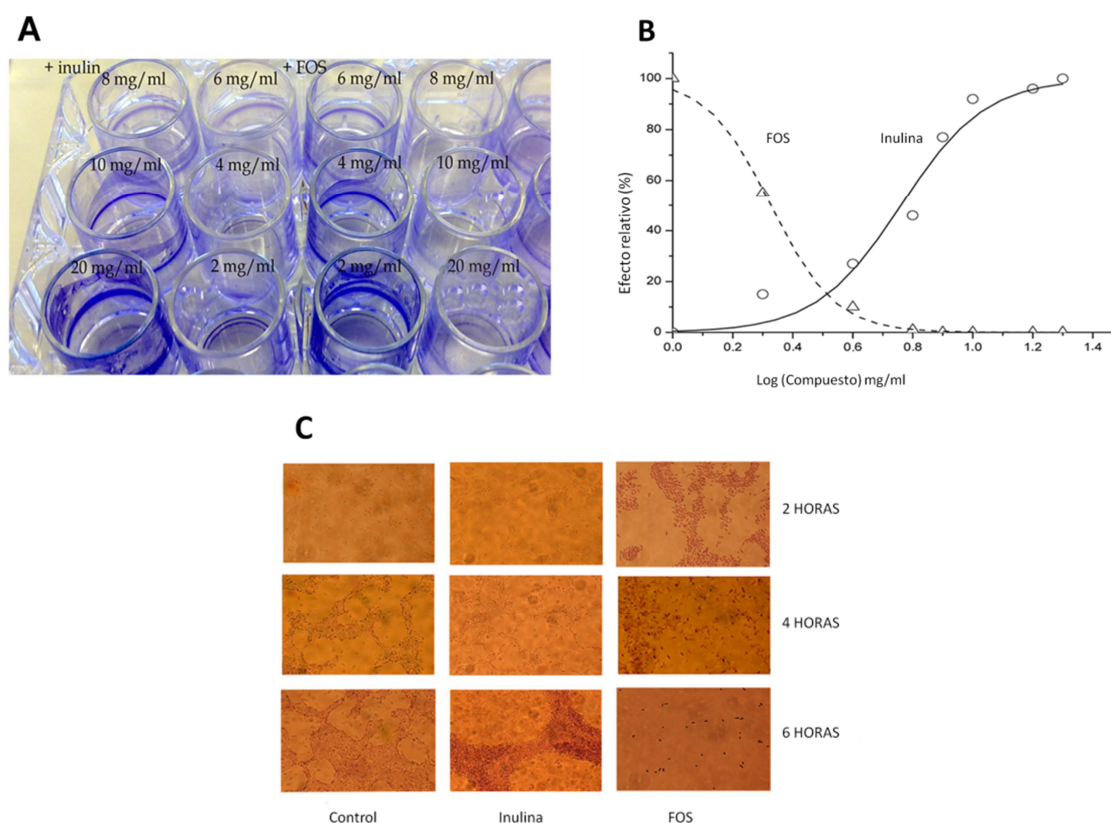


**Figura 1: Efecto de FOS e inulina sobre la proliferación de *P. aeruginosa* PAO1.** Las curvas de crecimiento de *P. aeruginosa* se realizaron en medio mínimo M9 suplementado con citrato 50 mM a 37°C durante 24 horas. Los datos son representativos de uno de tres experimentos independientes en los que se obtuvieron resultados similares.

## 1.2. Efecto de FOS e inulina sobre la formación de biopelículas por *Pseudomonas aeruginosa*

Con el propósito de estudiar la influencia de FOS e inulina en la formación de biopelículas, se cultivó *P. aeruginosa* PAO1 en presencia de distintas concentraciones de ambos compuestos durante 6 horas (Fig 2 A). Posteriormente se cuantificó la formación de las biopelículas (Fig 2B). La figura 2B muestra la cantidad relativa de formación de biopelículas en función de la concentración de inulina y FOS (escala logarítmica). Los resultados muestran que estos compuestos tienen efectos opuestos; mientras que la inulina estimula la formación de biopelículas, FOS ejerce un efecto inhibitorio dependiente de concentración. Al ajustar los datos a una ecuación logística sigmoidea (Fig 2B) obtuvimos un valor de  $EC_{50}$  de 2,1 mg/ml para FOS (inhibición) y 5,8 mg/ml para inulina (estimulación). La formación de biopelículas fue inhibida casi completamente por FOS (4-8 mg/ml) en contraste con la inulina, que causó un aumento del orden de 10 veces a concentraciones de hasta 10 mg/ml.

A continuación, las biopelículas formadas por los compuestos a 20 mg/ml fueron examinadas al microscopio (Fig 2C). En el grupo control se detectó la formación de biopelícula después de 4-6 horas. La adición de inulina dio lugar a una biopelícula más consistente a las 6 horas, mientras que las bacterias tratadas con FOS presentaron una biopelícula similar al control a las 4 horas, pero que había desaparecido a las 6 horas (Fig 2C).

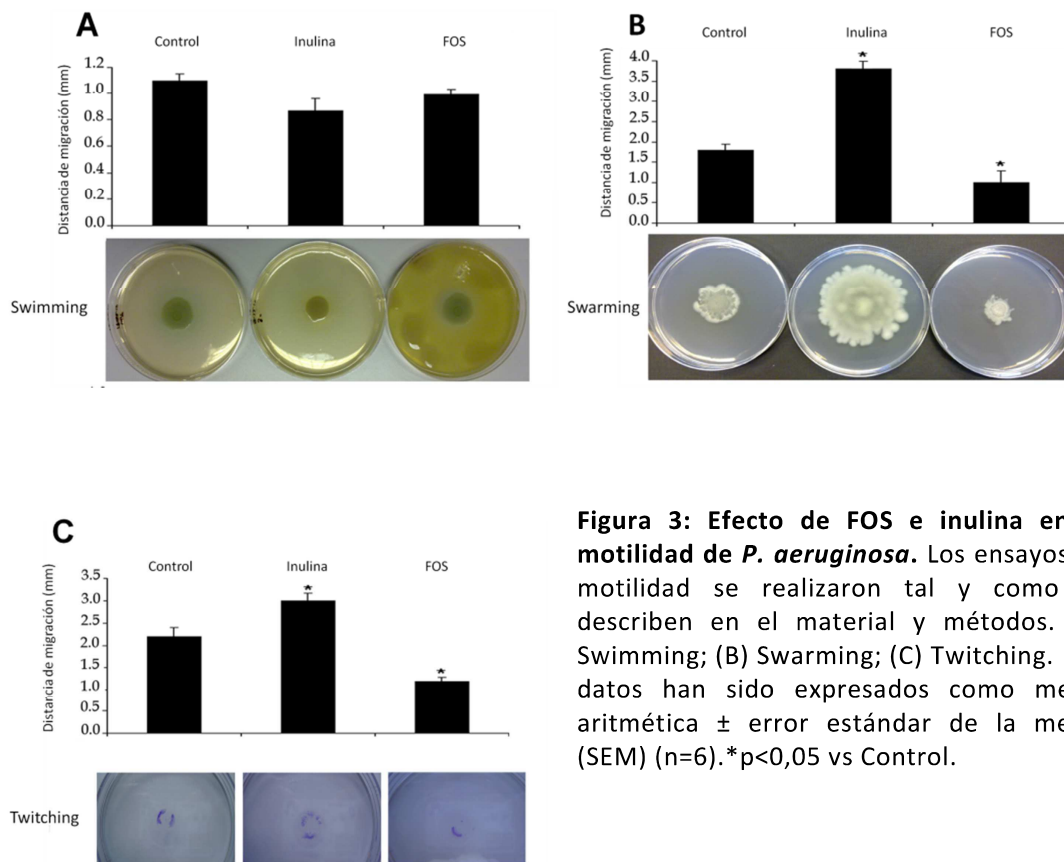


**Figura 2: Formación de biopelículas por *P. aeruginosa*.** (A) Formación de biopelículas en placas de 24 pocillos. (B) Representación de la cantidad relativa de biopelícula frente al logaritmo de la concentración de los compuestos. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea con el fin de calcular los valores de  $EC_{50}$ . Los datos han sido expresados como media aritmética y son representativos de 3 experimentos independientes. (C) Imágenes al microscopio de la biopelícula formada por *P. aeruginosa* a 2, 4 y 6 horas.

### 1.3. Efecto de FOS e inulina sobre la motilidad de *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* presenta tres tipos diferentes de motilidad: *swimming*, *swarming* y *twitching*. La motilidad tipo *swimming* (“natación” o “nado”) se debe a un movimiento natatorio propio de bacilos flagelados y se realiza en la película de agua que queda sobre los medios de cultivo sólidos. La tipo *swarming* (“bullir” o “en manada”) es un movimiento coordinado de bacterias a lo largo de una superficie que también requiere la existencia de flagelos, en contraposición a la motilidad tipo *twitching* (“movimiento espasmódico”) caracterizado por un movimiento desorganizado en el que no se necesitan estas estructuras. Tanto el fenómeno *swarming* como el *twitching* son necesarios para la formación de biopelículas. Estudiamos el efecto de inulina y FOS (5 mg/ml) sobre la motilidad de *P. aeruginosa* en placas de agar y en suspensión

(Fig 3A). FOS inhibió la motilidad tipo *swarming* y *twitching*, mientras que la inulina tuvo efectos contrarios (Fig 3B y C).



**Figura 3: Efecto de FOS e inulina en la motilidad de *P. aeruginosa*.** Los ensayos de motilidad se realizaron tal y como se describen en el material y métodos. (A) Swimming; (B) Swarming; (C) Twitching. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=6). \*p<0,05 vs Control.

#### 1.4. Efecto de FOS e inulina en la producción de citoquinas en macrófagos infectados con *Pseudomonas aeruginosa*

La infección y el daño tisular producen la activación y reclutamiento de células del sistema inmunológico, siendo probablemente los macrófagos las primeras células que se enfrentan con *P. aeruginosa*. La activación de los macrófagos se basa en el reconocimiento de patógenos a través de receptores de patrones moleculares como los TLR. Esto provoca grandes cambios en la expresión génica y precipita la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$ , que a su vez participan en el reclutamiento de células inflamatorias. También afecta a la producción de IL-10, citoquina antiinflamatoria cuyo objetivo es moderar la respuesta inflamatoria. Con el fin de estudiar las mejores condiciones para el experimento, incubamos las células con *P. aeruginosa* PAO1 y determinamos la secreción de IL-6 a distintos intervalos de tiempo (datos no mostrados). Puesto que la máxima

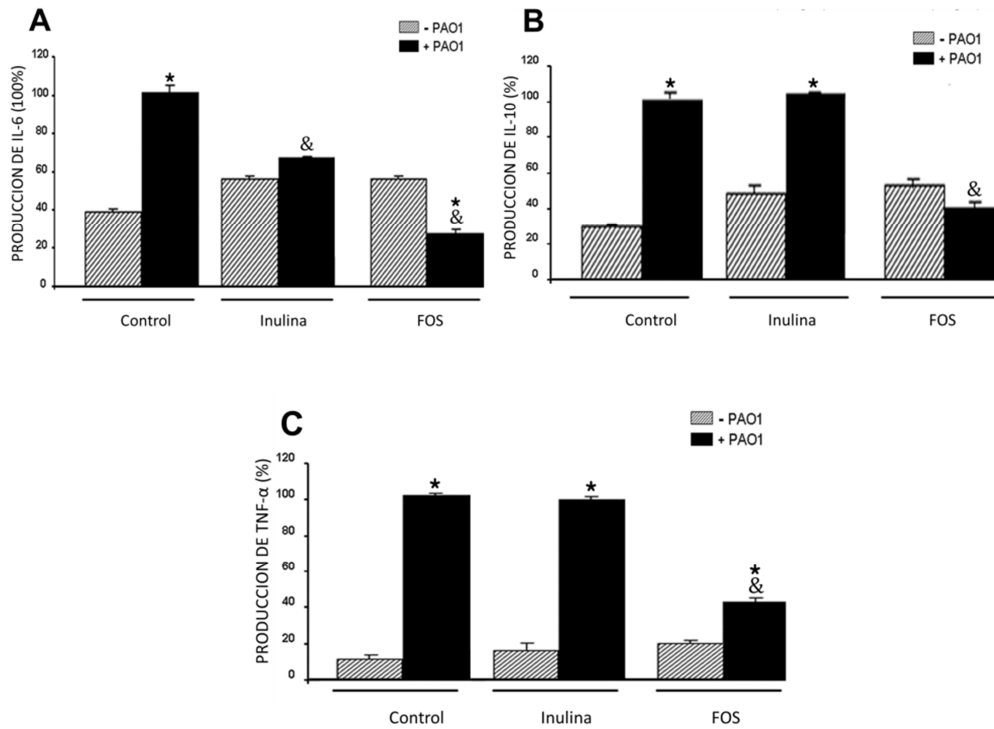


concentración de IL-6 se alcanzó a las 4 horas, se determinó la secreción de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 en macrófagos infectados con *P. aeruginosa* en presencia de FOS e inulina en estas condiciones. En ausencia de bacterias (Fig 4), FOS e inulina ejercieron un aumento no significativo de la secreción de citoquinas. La infección con *P.aeruginosa*, por su parte, provocó un aumento significativo. La secreción de citoquinas desencadenada por *P. aeruginosa* se vio atenuada de forma generalizada en presencia de FOS, mientras que la inulina provocó tan solo un descenso en los niveles de IL-6. En consecuencia, la presencia de inulina y, especialmente, de FOS, reduce la respuesta inflamatoria de los macrófagos frente a la infección bacteriana con *P.aeruginosa*. El efecto inhibitorio se debe probablemente a una interacción directa con *P. aeruginosa*, puesto que ni FOS ni inulina inhiben la producción de citoquinas en ausencia de la bacteria.

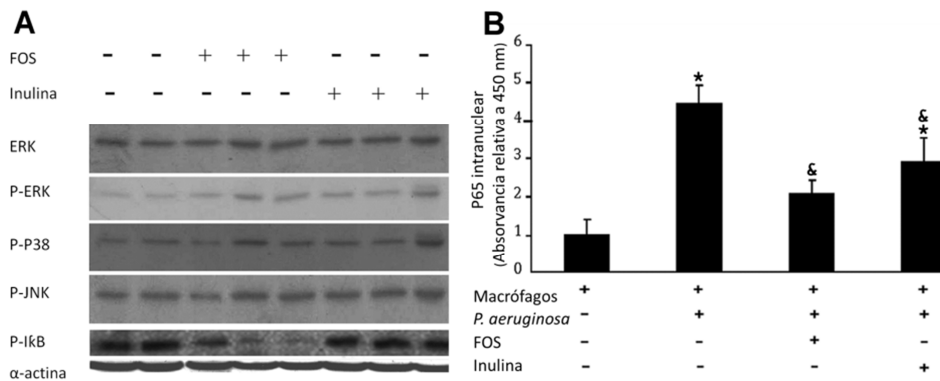
### **1.5. Efecto de FOS e inulina en la Activación de NF- $\kappa$ B por *Pseudomonas aeruginosa***

Puesto que las vías de señalización de MAPK y NF- $\kappa$ B están implicadas en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en macrófagos, decidimos estudiar el papel de estas dos vías en la respuesta en la producción de citoquinas mediada por FOS. Una de las formas de activar NF- $\kappa$ B implica la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  como consecuencia de su fosforilación por IKK. Estudiamos el efecto de inulina y FOS en la fosforilación (activación) de I $\kappa$ B- $\alpha$  y MAPK (ERK, JNK, p38) mediante western blot en macrófagos infectados con *P. aeruginosa*. Ni FOS ni inulina afectaron a la fosforilación de las tres MAPK, lo que sugiere que no están implicadas en la inhibición de la secreción de citoquinas. Por el contrario, FOS redujo la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , demostrando una modulación de la vía de NF- $\kappa$ B.

La activación de NF- $\kappa$ B está asociada con la translocación al núcleo de p65, uno de los componentes del complejo. Para confirmar el efecto de inulina y FOS en la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B/p65, la cantidad de p65 fue cuantificada mediante ELISA en un extracto nuclear de macrófagos después de una hora de activación con *P.aeruginosa* e inulina o FOS (Fig 5B). Los resultados confirmaron que FOS reduce la translocación de NF- $\kappa$ B/p65, mientras que la inulina no tuvo ningún efecto. Por tanto, el efecto de FOS está asociado con una menor activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B.



**Figura 4: Efecto de FOS e inulina en la respuesta inflamatoria de los macrófagos contra *P. aeruginosa*.** Los macrófagos fueron incubados con *P. aeruginosa* (ratio 1:5) durante 4 horas en presencia de FOS e inulina (5 mg/ml). Posteriormente se determinó la producción de (A) IL-6, (B) IL-10, y (C) TNF- $\alpha$  en sobrenadantes mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM)(n=6). \*p<0,05 vs Control sin bacteria; &p<0,05 vs Control con bacteria.

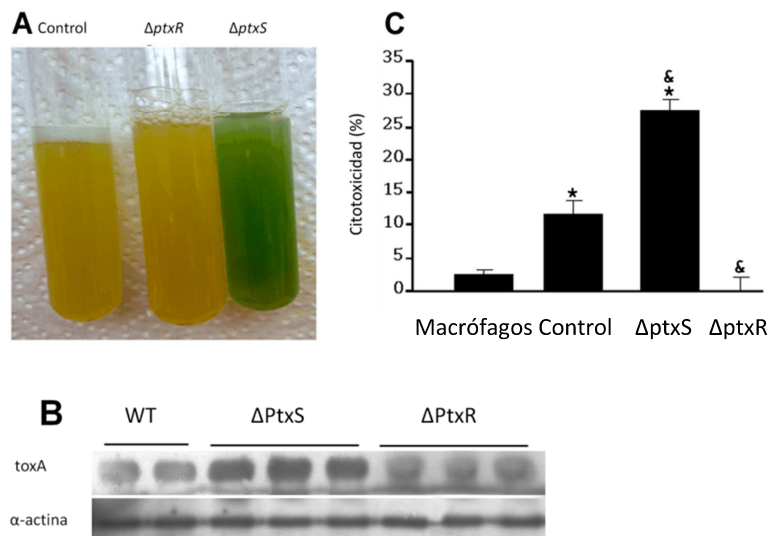


**Figura 5: Efecto de FOS e inulina en la activación de NF- $\kappa$ B por *Pseudomonas aeruginosa*.** (A) Los macrófagos fueron infectados con *P. aeruginosa* en presencia de FOS e inulina (5 mg/ml). Después de 4 horas se determinó por Western blot la expresión de ERK, p-ERK, p-p38, p-JNK. Después de una hora de incubación se determinó la expresión de p-I $\kappa$ B. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control. (B) La activación de NF- $\kappa$ B se determinó mediante la medida de la translocación al núcleo de p65. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM)(n=3). \*p<0,05 vs Control sin bacteria; &p<0,05 vs Control con bacteria.

## 1.6. Efecto de la virulencia de *P. aeruginosa* en la regulación por FOS e inulina

Puesto que la inhibición del crecimiento bacteriano y de la formación de biopelículas mediada por FOS podría reducir la virulencia de la bacteria, planteamos la posibilidad de que la respuesta de células eucariotas a la infección podría estar modulada por la presencia de este oligosacárido y por su influencia en la virulencia de la bacteria. Al objeto de verificar esta hipótesis, estudiamos inicialmente el efecto de dos cepas de *P. aeruginosa* con distintos niveles de virulencia en la respuesta de los macrófagos. Concretamente utilizamos mutantes PtxS y PtxR, dos reguladores transcripcionales que controlan la expresión del gen *toxA*, que codifica un factor de virulencia, la exotoxina A.

Tanto PtxR como PtxS juegan un papel importante en la regulación del promotor  $P_{toxA}$ . La mutación en *ptxS* aumenta la expresión de *toxA*, mientras que la delección de *ptxR* provoca su reducción. Como puede observarse en la Fig 6B el mutante *ptxS* produjo significativamente mayor cantidad de exotoxina A que el mutante *ptxR* (Fig 6B). Asimismo, el mutante *ptxS* se caracterizó por un incremento en la secreción de pirocianina por *P. aeruginosa*, pigmento relacionado con su virulencia y con la formación de biopelículas, como puede observarse en la Fig 6. Por el contrario, el color del mutante *ptxR* fue similar al de la cepa control. Como cabría esperar, la virulencia de las distintas cepas se tradujo en diferencias en cuanto a la citotoxicidad en macrófagos, examinada en nuestro caso 4 horas después de la infección mediante un kit que determinó la actividad lactato deshidrogenasa resultante de la ruptura de los macrófagos y su consecuente liberación al medio de cultivo. La citotoxicidad fue mayor con el mutante *ptxS* (Fig 6C), que produjo la muerte de aproximadamente el 25% de las células, seguida de la cepa control (10% de muerte celular) y del mutante *ptxR*, que de hecho no llegó a ser citotóxico.

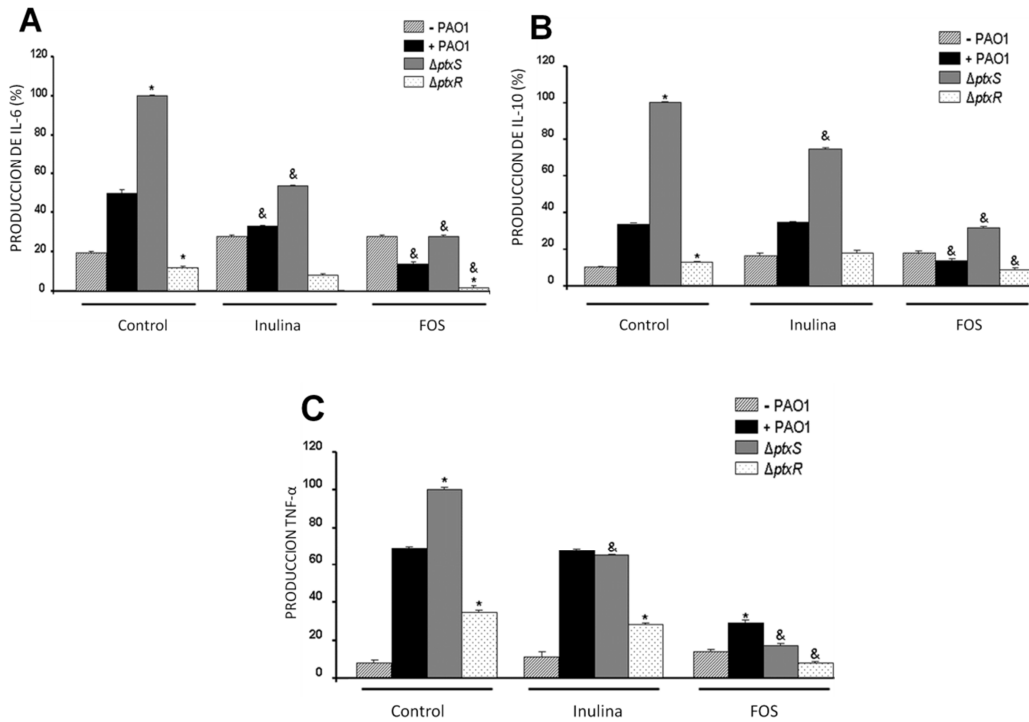


**Figura 6: Efecto de las distintas cepas de *P. aeruginosa* PAO1 en macrófagos.** (A) La cepa control y las mutantes deficientes en *ptxS* y *ptxR* se cultivaron en medio mínimo M9 suplementado con citrato 50mM durante 24 horas. El color azul-verdoso indica la secreción de pirocianina. (B) Determinación de la secreción de exotoxina A mediante western blot. (C) La mortalidad de los macrófagos inducida por *P. aeruginosa* se calculó mediante la liberación de lactato deshidrogenasa citoplasmática. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media. \* $p < 0,05$  vs Control sin bacteria; & $p < 0,05$  vs Control con bacteria.

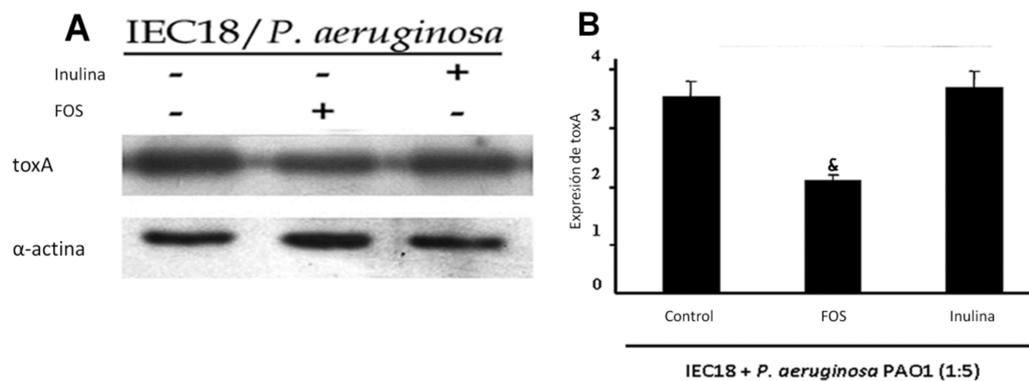
El perfil de secreción de citoquinas siguió un patrón similar, siendo mayor cuando los macrófagos fueron cultivados en presencia de la cepa mutante *ptxS*, seguida por la cepa control y finalmente por la cepa mutante *ptxR* (Fig 7). Para las tres cepas bacterianas analizadas, FOS causó una reducción bastante pronunciada en la producción de citoquinas (Fig 7), que fue menor en el caso de la inulina. La reducción mediada por FOS e inulina fue mayor en el mutante *ptxS* que en la cepa control, lo que sugiere que las cepas virulentas podrían ser más sensibles al efecto de los oligosacáridos.

Con el fin de analizar el efecto de FOS e inulina en la virulencia de *P. aeruginosa*, la exotoxina A fue cuantificada en sobrenadantes de bacterias cocultivadas con células eucariotas, así como en el interior células eucariotas. Se utilizaron con este fin células IEC18, que forman monocapas y son capaces de responder a *P. aeruginosa*, por tratarse de células adherentes y por tanto ser más fácil la separación de las bacterias de las células eucariotas mediante lavado con PBS y gentamicina. La adición de FOS e inulina no afectó a los niveles de exotoxina A secretados al medio en ausencia de células IEC18 (datos no mostrados). FOS redujo los niveles de exotoxina A intracelular en células IEC18

cocultivadas con *P. aeruginosa*, mientras que no se observaron cambios significativos al adicionar inulina (Fig 8). Estos datos sugieren que la secreción de exotoxina A dependiente del sistema tipo II de *P. aeruginosa* al citosol es inhibida por FOS, limitando su virulencia.



**Figura 7: Efecto de inulina y FOS en la respuesta inflamatoria de los macrófagos contra las distintas cepas de *P. aeruginosa*.** Los macrófagos se incubaron con las distintas cepas de *P. aeruginosa* (ratio 1:5) durante 4 horas en presencia de FOS e inulina (5 mg/ml). Se determinó la producción de (A) IL-6, (B) IL-10, y (C) TNF- $\alpha$ . Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (n=6). \*p<0,05 vs Control con bacteria control; &p<0,05 vs Control con mutante ptxS.



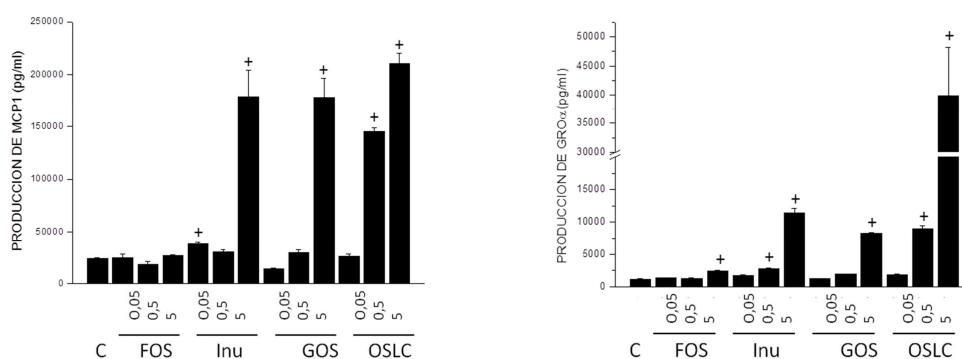
**Fig 8: Expresión de exotoxina A en células IEC18 infectadas con *P. aeruginosa* tratadas con FOS e inulina.** (A) Determinación de exotoxina A intracelular en células IEC18 cocultivadas con *P. aeruginosa* en presencia de FOS e inulina. (B) Cuantificación densitométrica utilizando  $\alpha$ -actina como control. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (n=3). &p<0,05 vs Control.

## 2. Efecto de los OND sobre células del epitelio intestinal

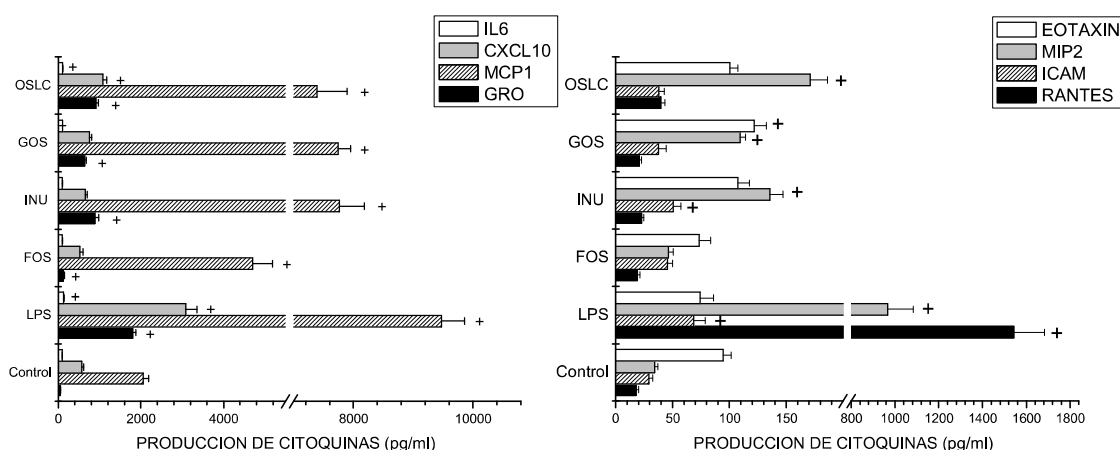
### 2.1. Efecto de los OND en la producción de citoquinas en células epiteliales intestinales

En objetivo inicial de nuestro trabajo consistió en caracterizar el posible papel inmunomodulador de los OND, independiente de su efecto prebiótico, sobre células de epitelio intestinal. Con este fin se estudiaron los OND más utilizados (FOS, inulina y GOS) y oligosacáridos aislados de leche de cabra, más similares a los de la leche humana en complejidad que los de otras especies de mamíferos [338]. Estos OND fueron adicionados en distintas concentraciones (0,05, 0,5 y 5 mg/ml) al medio de cultivo de células IEC18. Las células IEC18 constituyen una línea celular de íleon de rata de carácter no tumoral. Tras 24 horas de incubación se determinó la producción de GRO $\alpha$  y MCP1 en el medio de cultivo. Todos los OND incrementaron la producción de ambas citoquinas, siendo los de mayor eficacia los OSLC, seguidos por inulina, GOS y finalmente FOS, que no llegó a producir ningún efecto sobre la producción de MCP1 (Fig 9). El efecto fue dependiente de concentración, alcanzándose el máximo a 5 mg/ml en todos los OND.

Dada la efectividad de los tratamientos, se estudió un mayor rango de citoquinas y otras proteínas inflamatorias expresadas por las células epiteliales intestinales en general, y por las IEC18 en particular, mediante un análisis multiplex. Estos resultados confirmaron el incremento en la producción de GRO $\alpha$  y MCP1 y mostraron también este efecto sobre MIP2 aunque no se observaron cambios generalizados en ICAM, IL6, eotaxina, CXCL10 o RANTES (Fig 10). Por el contrario, la producción de estas proteínas sí fue estimulada por el control tratado con LPS. De hecho, producción de RANTES, la citoquina que fue inducida en mayor medida por el LPS (86,2 $\pm$ 7,8 veces), no se vio afectada por ninguno de los OND. Todo esto confirma que los efectos inmunomoduladores de los OND y el LPS en células IEC18 se solapan, al menos parcialmente, aunque son diferentes.



**Figura 9: Producción de GRO $\alpha$  y MCP1 inducida por los OND en la línea celular IEC18.** Las células fueron incubadas durante 24 horas con los OND a 0,05, 0,5 y 5 mg/ml. Se determinó GRO $\alpha$  y MCP1 en el sobrenadante mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de dos experimentos distintos (n=6). <sup>†</sup>p<0,05 vs grupo control.

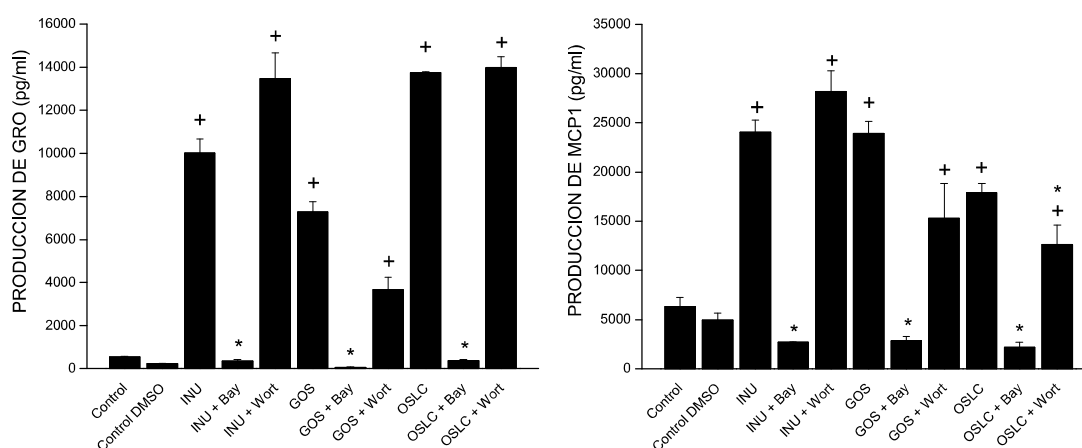


**Figura 10. Secreción de citoquinas e ICAM inducida por LPS y los OND en la línea celular IEC18:** Las células fueron incubadas con los OND (5 mg/ml) o LPS (1  $\mu$ g/ml) durante 24 horas. Se determinó la producción de citoquinas e ICAM en el sobrenadante mediante un ensayo multiplex. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de dos experimentos distintos (n=10). <sup>†</sup>p<0,05 vs grupo control.

## 2.2. Mecanismo de acción implicado en el efecto inmunomodulador de los OND en células epiteliales intestinales

Una vez evidenciado el efecto de los OND sobre la producción de citoquinas en IEC18, nos dispusimos a estudiar el mecanismo de acción de dicho efecto. Dada la escasa magnitud de la acción de FOS, este oligosacárido fue excluido del estudio. En primer lugar nos centramos en una de las principales vías inmunológicas, ya mencionada en la introducción: la vía de NF- $\kappa$ B. Para

conocer la implicación de esta vía utilizamos Bay11-7082, un inhibidor farmacológico de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , proceso indispensable para la translocación del factor de transcripción al núcleo mediante la vía clásica. La presencia del inhibidor dio lugar a un descenso significativo de la producción de GRO $\alpha$  y MCP1 provocada por inulina, GOS y OSLC. Por el contrario, la wortmanina, un inhibidor de fosfoinositol 3 kinasa (PI3K), enzima responsable de la activación de AKT, no produjo ningún efecto (Fig 11). Finalmente se estudió la implicación de las principales MAPK mediante el uso de inhibidores para p38, ERK1/2 y JNK. El efecto de los OND fue parcialmente inhibido, aunque dicha disminución fue menor que la producida por Bay11-7082. En consecuencia, P38 y JNK, pero no ERK, están implicados en la secreción de MCP1 y GRO $\alpha$  inducida por los OND, aunque con un papel muy secundario (Fig 12).

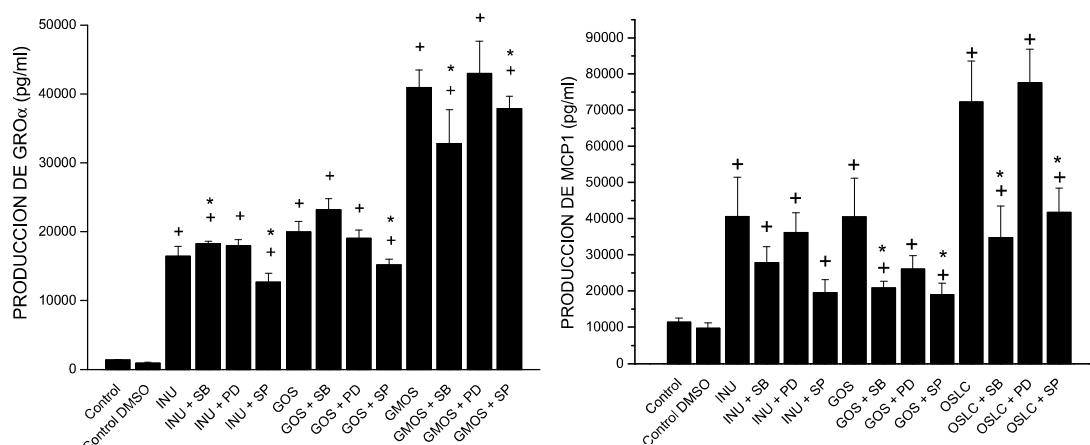


**Figura 11: Secreción de citoquinas inducida por los OND en IEC18 tratadas con inhibidores de NF- $\kappa$ B y PI3K.** Los inhibidores de NF- $\kappa$ B y PI3K Bay 11-7085 (10  $\mu$ M) y wortmanina (1  $\mu$ M) se añadieron a monocapas confluentes de IEC18 durante 1 hora antes de la adición de los OND (5 mg/ml). Se determinó la producción de GRO $\alpha$  y MCP1 en sobrenadantes recogidos a las 24 horas mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de dos experimentos distintos (n=6). <sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control DMSO; \*p<0,05 vs el correspondiente grupo de OND.

Dado que las células epiteliales intestinales expresan TLR4, el cual reconoce el LPS bacteriano, una molécula glicosilada compleja como los OND, formulamos la hipótesis de que estos pudieran actuar como ligandos de este receptor. Al objeto de contrastar esta hipótesis, procedimos a la generación de líneas estables de células IEC18 en las que la expresión génica de TLR4, así como de su molécula transductora de señal MyD88, estaba silenciada mediante el uso



de shRNA introducido a través de partículas de lentivirus. MyD88 actúa de hecho como proteína adaptadora común a todos los TLR, exceptuando TLR3. Los resultados muestran que el silenciamiento de TLR4 se tradujo en un descenso en la secreción de citoquinas del 59-77%, a excepción de la secreción de GRO $\alpha$

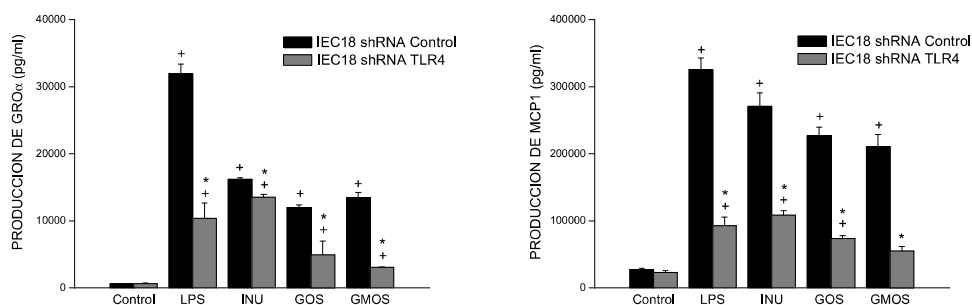


**Figura 12: Efecto de los inhibidores de MAPK en la producción de citoquinas inducida por los OND en células IEC18.** Los inhibidores de MAPK SB-203580 (p-38), PD-98059 (ERK1/2) y SP-600125 (JNK) se añadieron a una concentración final de 10  $\mu$ M, 1 hora antes de la adición de los OND (5 mg/ml). La producción de GRO $\alpha$  y MCP1 se determinó en el sobrenadante recogido a las 24 horas mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de cuatro experimentos distintos (n=12).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control DMSO; \*p<0,05 vs el correspondiente grupo de OND.

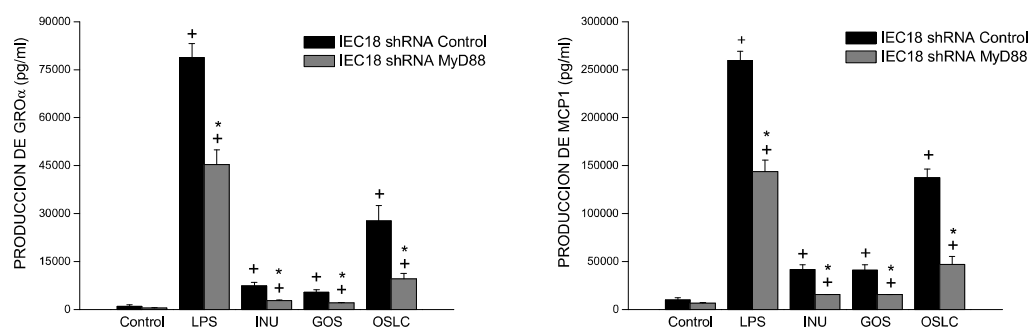
producida por inulina, que apenas se vio inhibida (Fig 13). Análogamente, el 42-65% de la respuesta a inulina, GOS y OSLC fue sensible al silenciamiento de MyD88 tanto al medir GRO $\alpha$  como MCP1 (Fig 14). La producción de citoquinas provocada por la estimulación de LPS fue inhibida sustancialmente como consecuencia de ambas estrategias, indicando un silenciamiento efectivo.

Con el propósito de estudiar el efecto de los OND en líneas celulares humanas se utilizaron células Caco-2 y HT29, ambas de carácter tumoral, procedentes de un adenocarcinoma de colon la primera y colorrectal la segunda. También se incluyeron células Caco-2/TC7, un subtipo de las Caco-2, seleccionadas a partir de un pase tardío de estas, y que se caracterizan por ser una población más homogénea. Tal y como muestra la Figura 15, las células HT29 respondieron a FOS, inulina y OSLC aumentando la producción de IL8,

quimioquina homóloga a GRO $\alpha$  en humanos, aunque en menor medida que en células IEC18. Sin embargo, la adición de GOS no tuvo ningún efecto. Ni las Caco-2 ni su subtipo Caco-2/TC7 respondieron a la estimulación con OND. Estos resultados concuerdan con la respuesta de las diferentes líneas celulares a LPS, que fue menor en HT29 comparando con IEC18 y apenas existente en Caco-2 y Caco-2/TC7 (Fig 15).

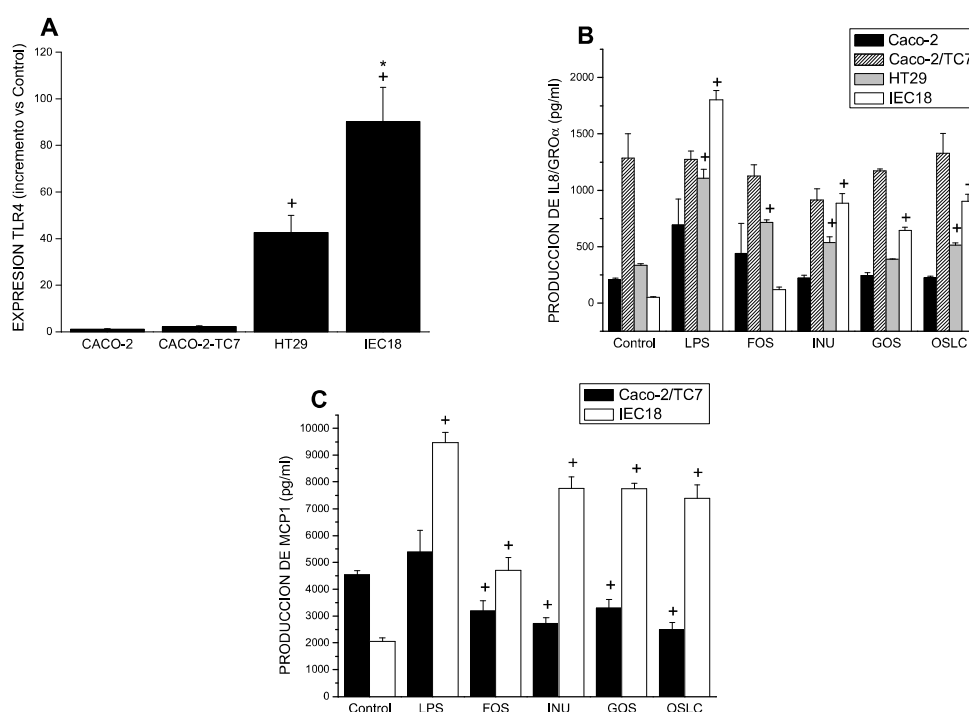


**Figura 13: Efecto del silenciamiento de TLR4 en la secreción de citoquinas inducida por los OND en IEC18.** La expresión de MyD88 en IEC18 fue silenciada mediante shRNA. Las células silenciadas fueron incubadas con los OND (5 mg/ml) durante 24 horas y la producción de GRO $\alpha$  y MCP1 se determinó en el sobrenadante mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de dos experimentos distintos (n=6).<sup>†</sup>p<0,05 vs grupo control; \*p<0,05 vs el correspondiente grupo de OND.



**Figura 14: Efecto del silenciamiento de MyD88 en la secreción de citoquinas inducida por los OND en IEC18.** La expresión de MyD88 en IEC18 fue silenciada mediante shRNA. Las células silenciadas fueron incubadas con los OND (5 mg/ml) durante 24 horas y la producción de GRO $\alpha$  y MCP1 se determinó en el sobrenadante mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de dos experimentos distintos (n=6).<sup>†</sup>p<0,05 vs grupo control; \*p<0,05 vs el correspondiente grupo de OND.

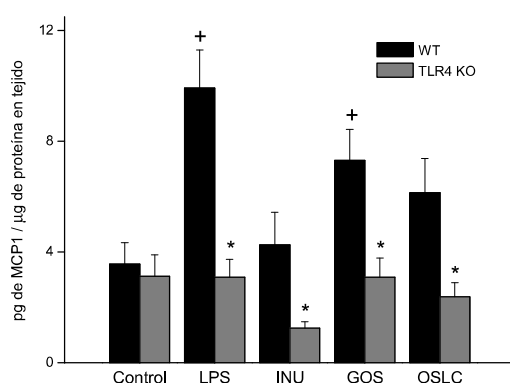
Por su parte, únicamente las células IEC18 y Caco-2/TC7 presentaron secreción de MCP1. Los resultados fueron similares a los observados en la producción de GRO $\alpha$  en IEC18, de forma que el tratamiento con los OND incrementó la expresión de MCP1. Por el contrario, los OND inhibieron la producción de MCP1 en células Caco-2. El análisis de la expresión de TLR4 en las distintas líneas celulares mostró una correlación entre los niveles de producción de IL8/GRO $\alpha$  y MCP1 y el nivel de expresión de TLR4. De esta forma, las células IEC18 expresaron TLR4 en mayor cantidad, seguidas de HT29, mientras que las dos líneas de Caco-2 apenas expresaron este receptor (Fig 15).



**Figura 15: Correlación entre la respuesta de las células epiteliales a LPS y OND y la expresión constitutiva de TLR4.** (A) Se aisló el ARN total de monocapas confluentes de células Caco-2, Caco-2/TC7, HT29 e IEC18. La expresión de TLR4 se analizó mediante RT-PCR utilizando el 18s como gen de referencia. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de dos experimentos distintos (n=6).  $^+p < 0,05$  vs grupo control. (B) Se añadieron los OND (5 mg/ml) o LPS (3  $\mu$ g/ml) a Caco-2 y HT29, (5  $\mu$ g/ml) a Caco-2/TC7 y (1  $\mu$ g/ml) a IEC18 durante 24 horas. Se determinó la producción de MCP1, GRO $\alpha$  en rata e IL8 en humano. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de dos experimentos distintos (n=6).  $^+p < 0,05$  vs grupo control.

Con el fin de estudiar más a fondo la implicación de TLR4 en el efecto inmunomodulador de los OND, se utilizaron explantes colónicos de ratones con delección génica de *Tlr4* y sus correspondientes controles (Fig 16). Una vez

extraídos, los explantes se lavaron con una mezcla de antibióticos con el fin de eliminar las bacterias y el posible efecto prebiótico. La secreción basal de MCP1 fue similar en ambos tipos de ratones, mientras que la respuesta a LPS se vio inhibida en los explantes de los ratones con delección génica. La producción de MCP1 en los ratones control fue mayor en los explantes tratados con los OND, aunque tan solo GOS fue capaz de generar diferencias significativas. Sin embargo, en los ratones con delección génica de Tlr4, al añadir los OND, la secreción de MCP1 fue significativamente inferior comparada con la de sus correspondientes grupos en ratones control en todos los casos

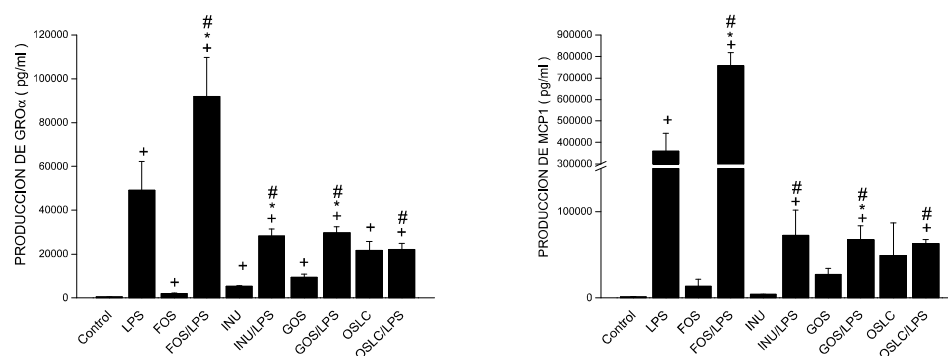


**Figura 16: Producción de MCP1 inducida por OND en explantes colónicos de ratones con delección génica de TLR4.** Se procesaron los fragmentos de colon de ratones control y ratones con delección génica de *Tlr4* tratándolos con una mezcla de antibióticos. Se añadieron los OND (5 mg/ml) o LPS (10 µg/ml). Después de 24 horas se determinó la producción de MCP1 en el sobrenadante mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de tres experimentos distintos (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control; \*p<0,05 vs el correspondiente control de OND.

### 2.3. Interacción LPS/OND

Considerando que los resultados obtenidos sugerían que TLR4 actúa como diana común tanto para LPS como para los OND, examinamos el efecto combinado de ambos productos en células IEC18. En concordancia con los resultados anteriores, OSLC, GOS, inulina y FOS estimularon la producción de GRO $\alpha$  y MCP1, aunque la respuesta fue mucho menor que la provocada por LPS (Fig 17). La coadministración de los distintos OND con LPS (con 60 minutos de diferencia) resultó en un cambio en la inducción de citoquinas. FOS y LPS tuvieron efectos sinérgicos, puesto que los niveles de GRO $\alpha$  y MCP1 fueron mayores que la suma de los efectos individuales. Por el contrario, inulina, GOS y

OSLC redujeron de forma significativa los efectos del LPS en un 50% aproximadamente para GRO $\alpha$  y en un 80% para MCP1 (Fig 17).



**Figura 17: Interacción entre los OND y LPS en células IEC18.** Las células IEC18 se incubaron con los OND (5 mg/ml) durante una hora y posteriormente con LPS (1  $\mu$ g/ml) durante 24 horas más. Se determinó la producción de GRO $\alpha$  y MCP1 en el sobrenadante mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y son representativos de dos experimentos distintos (n=6).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control; <sup>\*</sup>p<0,05 vs el correspondiente control de OND; <sup>#</sup>p<0,05 vs grupo LPS.

### **3. Efecto directo de GOS y FOS en ratones libres de gérmenes**

#### **3.1. Determinación de parámetros generales en el efecto directo de OND en ratones libres de gérmenes y convencionales**

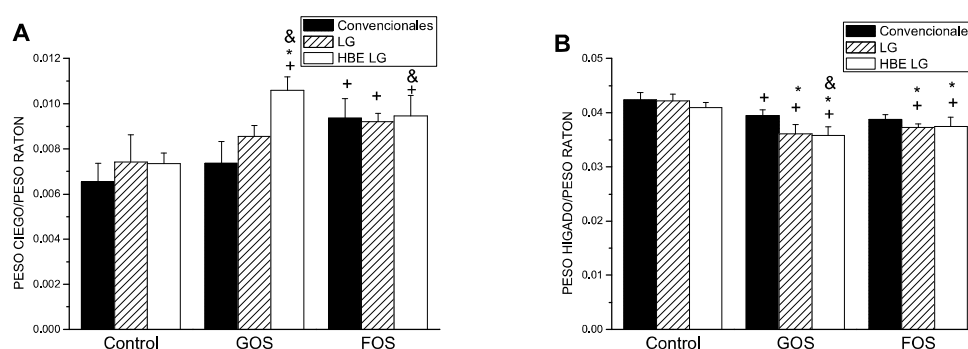
Con el propósito de estudiar los efectos directos de los OND independientes de su efecto prebiótico, se administraron dietas enriquecidas con GOS y FOS (5%), durante 4 semanas, a ratones al destete mantenidos en condiciones de esterilidad. Además, se incluyeron en el experimento varios grupos a los que se les administró un homogenado de bacterias muertas estéril (0,016% HBE), o bien la combinación de FOS o GOS con dicho homogenado, con el fin de reproducir el efecto de los OND en presencia de antígenos en el lumen. Finalmente, se utilizaron como controles, ratones mantenidos en condiciones convencionales a los que también se les añadió GOS y FOS en la dieta.

Debido a las dificultades que supone el control de la evolución del peso en animales mantenidos en instalaciones libres de gérmenes, tan solo se evaluó el peso de los ratones al final del experimento, no observándose diferencias significativas entre animales libres de gérmenes y convencionales, ni entre los animales tratados con FOS y GOS y sus respectivos controles (datos no mostrados).

Una de las principales características descritas en animales en condiciones de esterilidad es un incremento en el tamaño del ciego, que en ratas puede incluso alcanzar un 25% del peso total del animal [349]. Estos animales también presentan heces más blandas de lo normal [15]. En nuestro experimento observamos un incremento no significativo en la ratio entre el peso del ciego y la del ratón en animales libres de gérmenes, además de heces blandas. Cuando se asoció la administración del HBE a GOS o FOS, se observó un incremento del tamaño relativo del ciego. Este efecto fue también observado en ratones convencionales cuando se les administró FOS, pero no GOS (Fig 18A).

En animales en condiciones de esterilidad, la administración de GOS y FOS disminuyó significativamente la relación entre el peso del hígado y el peso del ratón. El tratamiento con GOS también redujo este parámetro en ratones

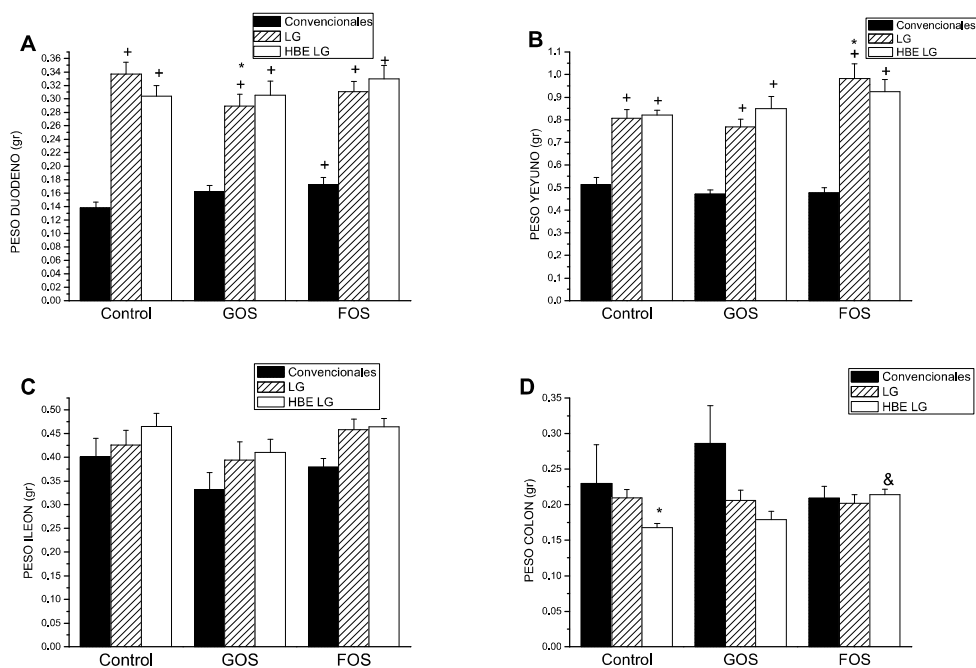
convencionales y en ratones en condiciones de esterilidad a los que se administró combinado con el HBE (Fig 18B).



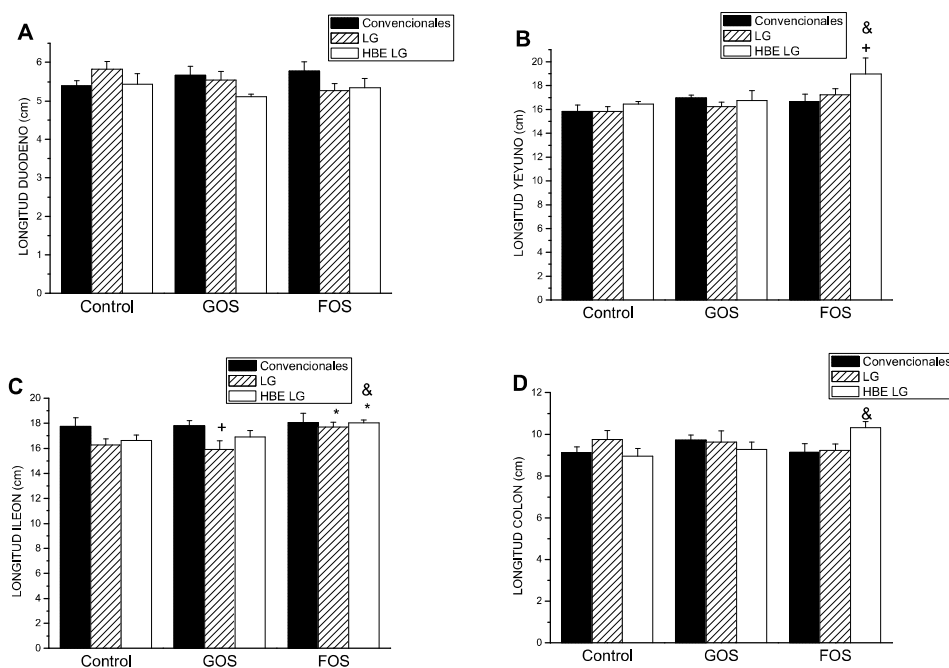
**Figura 18: Ratio relativas en el tratamiento con OND en ratones convencionales y libres de gérmenes.** (A) Relación entre el peso del ciego y el peso del animal. (B) Relación entre el peso del hígado y el peso del animal. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9). +p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs control LG; &p<0,05 vs control HBE LG

En lo que respecta al peso de los distintos segmentos intestinales, el peso del duodeno y del yeyuno aumentó en ratones mantenidos en condiciones de esterilidad (Fig 19) con y sin el HBE. Este aumento de peso no se correlacionó en general con un aumento en la longitud de los segmentos intestinales (Fig 20). Tan solo GOS revirtió ligeramente este efecto en duodeno, mientras que el tratamiento con FOS, por el contrario, incrementó de forma significativa el peso del yeyuno en ratones en condiciones de esterilidad. No hubo diferencias significativas importantes ni en el peso ni en la longitud del íleon y del colon, a excepción de un aumento en la longitud del íleon en el grupo FOS con y sin el HBE en condiciones de esterilidad, de la longitud del colon en el grupo FOS +HBE y un aumento del peso del colon en el grupo FOS+HBE. FOS en animales libres de gérmenes incrementó la ratio peso/longitud del colon en yeyuno (datos no mostrados).

Se realizó un estudio histológico del colon y Del yeyuno de ratones libres de gérmenes tratados con los distintos OND y el HBE. El estudio histológico muestra cómo las vellosidades en el yeyuno tienden a alcanzar una mayor longitud en animales que han sido tratados con GOS y FOS en condiciones de esterilidad (Fig 21). Estos datos se correlacionan con un aumento significativo de la cantidad de proteína por gramo de yeyuno en ratones tratados con GOS y con las combinaciones FOS y GOS con el HBE (Fig 22). En ratones convencionales los OND también aumentaron este parámetro.

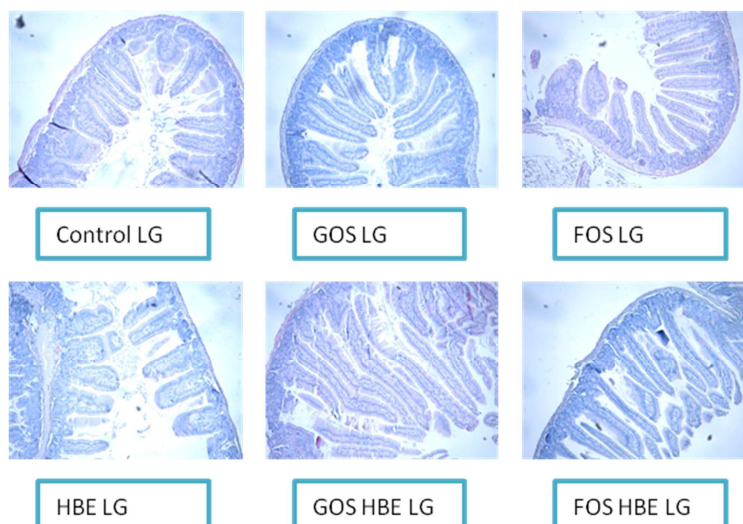


**Figura 19: Peso de los segmentos intestinales en el tratamiento con OND en ratones convencionales y libres de gérmenes.** (A) Duodeno, (B) yeyuno, (C) íleon y (D) colon. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs control LG; &p<0,05 vs control HBE LG.

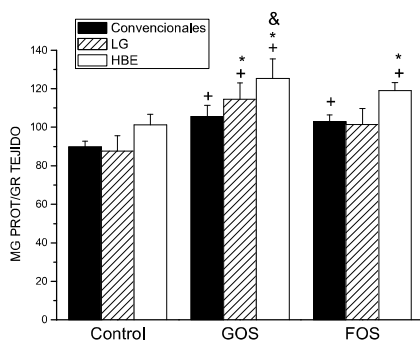


**Figura 20: Longitud de los segmentos intestinales en el tratamiento con OND en ratones convencionales y libres de gérmenes.** (A) Duodeno, (B) yeyuno (C) íleon y (D) colon. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs control LG; &p<0,05 vs control HBE LG.





**Figura 21:** Tinción eosina-hematoxilina en muestras histológicas de yeyuno en el tratamiento con OND en ratones libres de gérmenes.



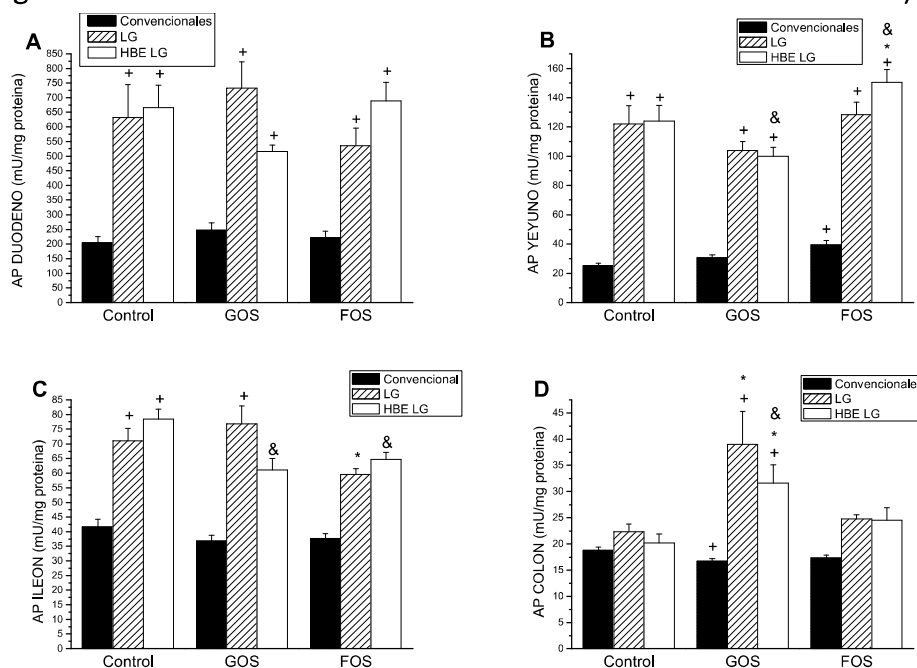
**Figura 22:** Relación mg de proteína y gr de tejido en yeyuno en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  (SEM) (n=9). <sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs control LG; &p<0,05 vs control HBE LG.

No se observaron diferencias en la histología del colon (datos no mostrados).

### 3.2. Efecto de los OND sobre la maduración intestinal en ratones libres de gérmenes y convencionales

La leche materna contiene aproximadamente un 12% de OND, que de hecho constituyen la denominada fibra soluble de la leche [21]. Se considera que estos podrían ejercer funciones importantes desde el punto de vista de la protección del neonato, incluyendo la potenciación de la maduración intestinal [22]. Para evaluar la posible relevancia de FOS y GOS en el proceso de maduración en presencia y ausencia de microbiota, se emplearon como parámetros específicos la actividad de distintas enzimas que se expresan en el borde en cepillo en intestino delgado: actividad fosfatasa alcalina (AP), leucín aminopeptidasa (LAP), sacarasa y maltasa, en los distintos segmentos del intestino.

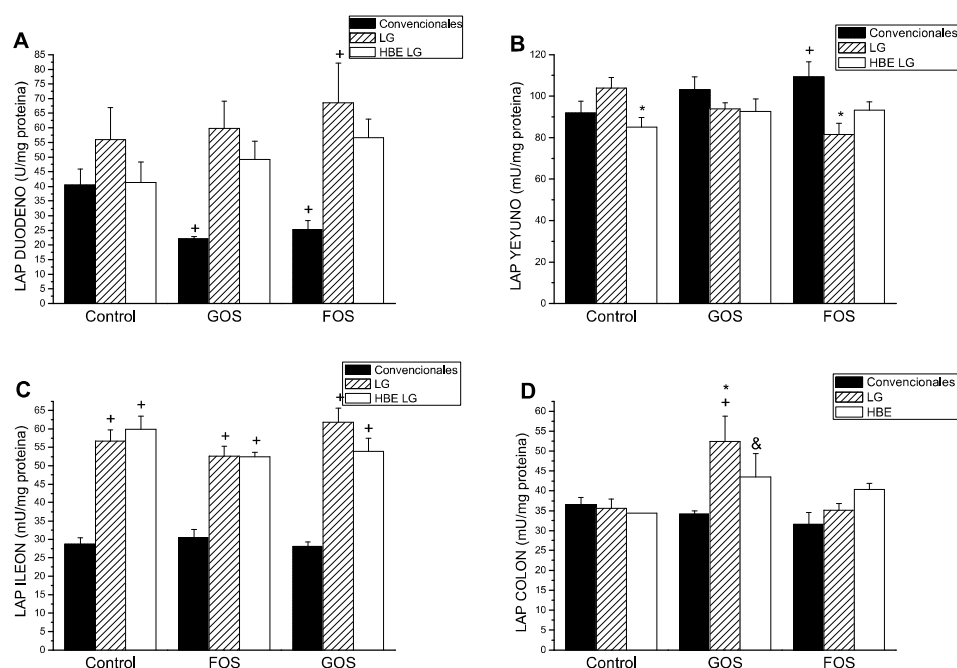
Los resultados más destacables pueden resumirse el siguiente modo. En primer lugar, la ausencia de bacterias produjo un incremento de la actividad AP en todo el intestino delgado, pero no en el colon. No hubo ningún efecto reseñable de los OND en el primer caso, mientras que en el colon los OND aumentaron la actividad enzimática en animales libres de gérmenes (significativamente solo en el caso de GOS) (Fig.23).



**Figura 23: Actividad fosfatasa alcalina en distintos segmentos intestinales en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.** (A) Duodeno, (B) yeyuno, (C) íleon y (D) colon. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9). <sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; <sup>\*</sup>p<0,05 vs control LG; <sup>&</sup>p<0,05 vs control LG HBE.

La actividad LAP se vio inducida específicamente en íleon en condiciones estériles, pero no se observaron efectos de los oligosacáridos. Sin embargo, tanto GOS como FOS inhibieron LAP en el duodeno de ratones convencionales, pero no en ratones libres de gérmenes. En yeyuno se apreció la tendencia opuesta, es decir, aumento de actividad enzimática en ratones convencionales e inhibición en condiciones de esterilidad, aunque en todo caso poco pronunciada. La actividad LAP se indujo nuevamente en colon por GOS pero no por FOS en ratones libres de gérmenes exclusivamente (Fig 24). El efecto de inhibición enzimática por OND en duodeno se observó asimismo para la sacarasa y la maltasa en ratones convencionales, aunque solo fue significativo en el primer caso. GOS incremento la actividad sacarasa en íleon y colon en y la maltasa en colon en ratones libres de gérmenes. (Fig 25 y 26).El tratamiento con

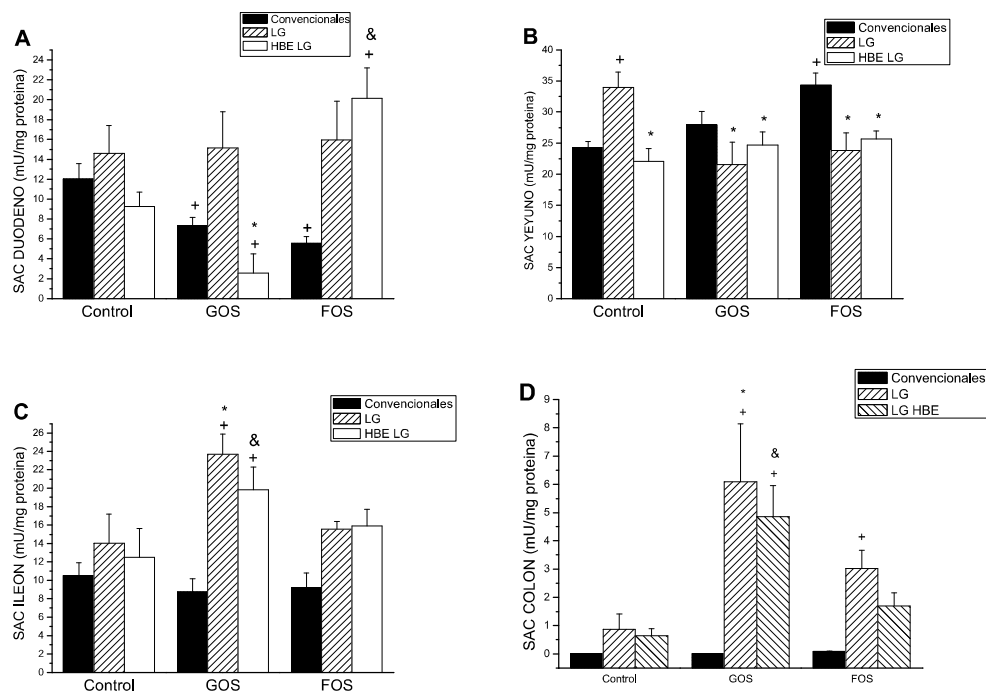
GOS, FOS y el HBE disminuyó la sensibilidad de la AP a su inhibidor en colon de ratones libres de gérmenes y convencionales. (Fig 27).



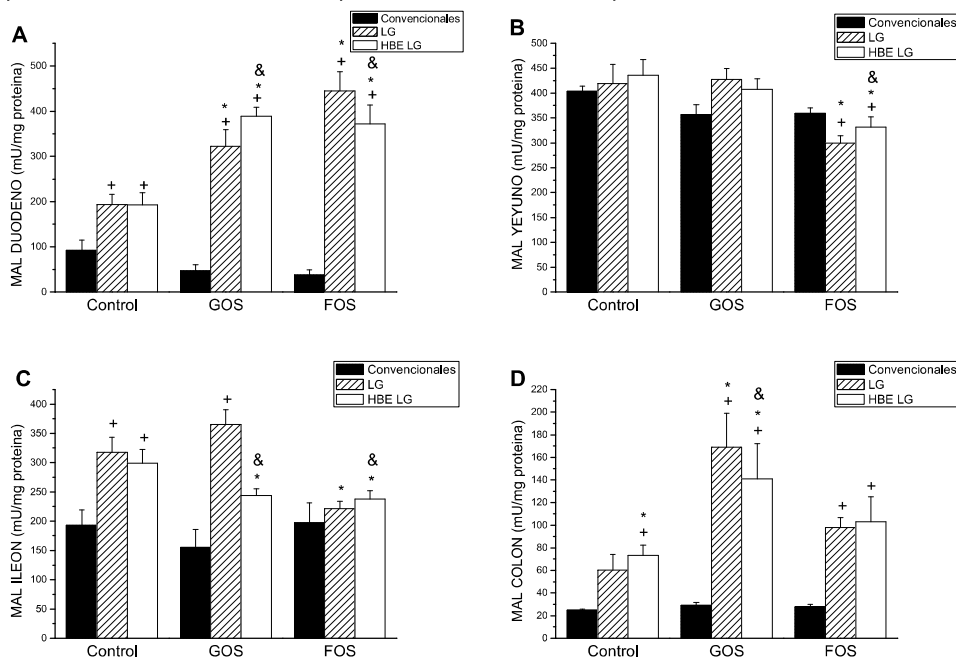
**Figura 24: Actividad leucín amino peptidasa en distintos segmentos intestinales en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.** (A) Duodeno, (B) yeyuno, (C) íleon y (D) colon. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  (SEM) (n=9). <sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs control LG; &p<0,05 vs control LG HBE.

### 3.3. Efecto de los OND en la concentración de inmunoglobulinas en plasma sanguíneo en ratones libres de gérmenes y convencionales

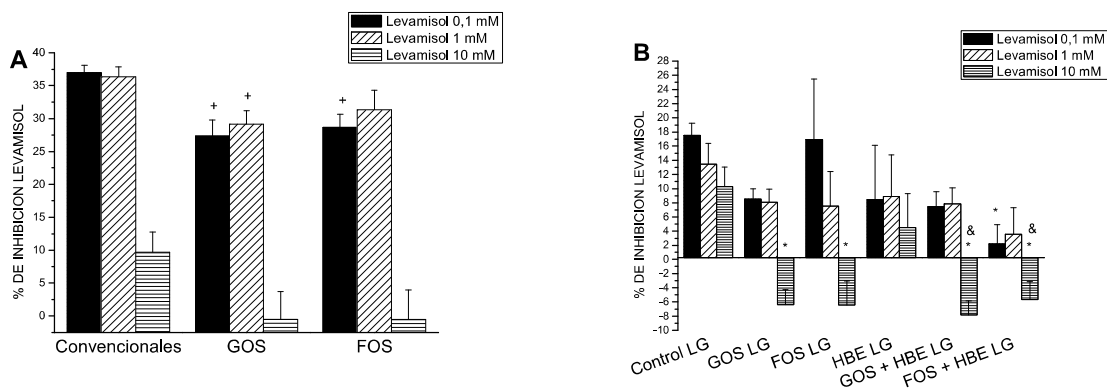
Con el propósito de estudiar el efecto inmunomodulador de los OND sobre la producción de inmunoglobulinas, se determinó la concentración de estas en el plasma de ratones libres de gérmenes tratados con el HBE, FOS y GOS, y sus combinaciones. Los datos obtenidos ponen de manifiesto una reducción en la concentración de inmunoglobulina G total en ratones tratados con FOS con y sin el HBE en condiciones de esterilidad. Por el contrario, no se observaron diferencias en la concentración de inmunoglobulinas A y M en plasma (Fig 28).



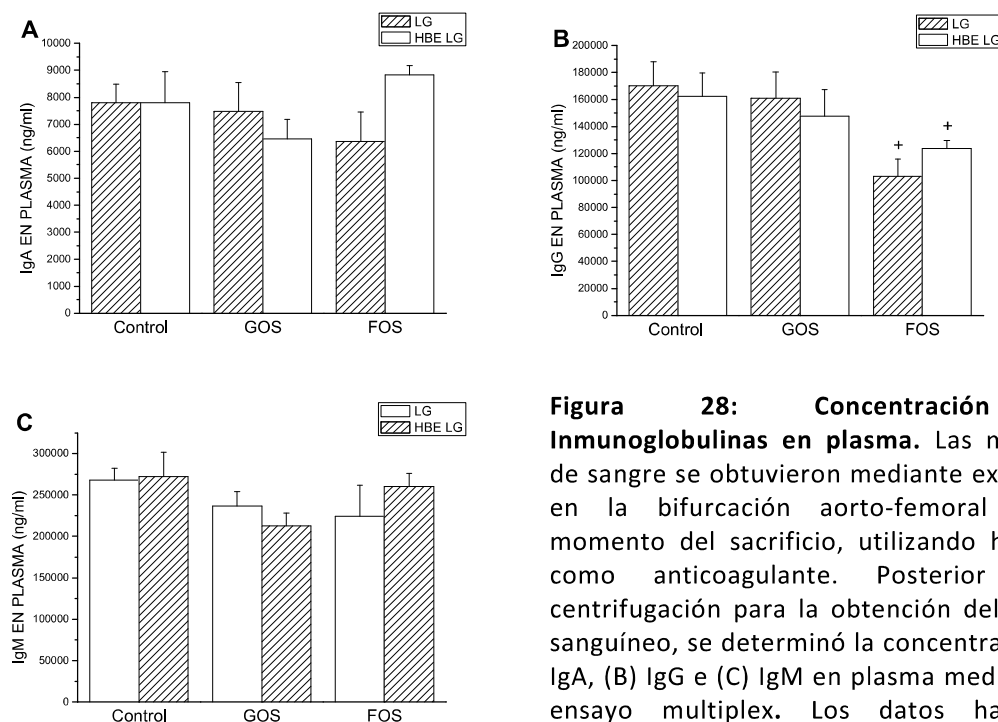
**Figura 25:** Actividad sacarasa en distintos segmentos intestinales en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND. (A) Duodeno, (B) yeyuno, (C) íleon y (D) colon. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs control LG; &p<0,05 vs control LG HBE.



**Figura 26:** Actividad maltasa en distintos segmentos intestinales en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND. (A) Duodeno, (B) yeyuno, (C) íleon y (D) colon. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs control LG; &p<0,05 vs control LG HBE.



**Figura 27: Sensibilidad de la AP a su inhibidor (levamisol) en colon de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.** (A) Ratones convencionales y (B) ratones libres de gérmenes. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9). +p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs control LG; &p<0,05 vs control LG HBE.



**Figura 28: Concentración de Inmunoglobulinas en plasma.** Las muestras de sangre se obtuvieron mediante extracción en la bifurcación aorto-femoral en el momento del sacrificio, utilizando heparina como anticoagulante. Posterior a la centrifugación para la obtención del plasma sanguíneo, se determinó la concentración (A) IgA, (B) IgG e (C) IgM en plasma mediante un ensayo multiplex. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  (SEM) (n=9). + p<0,05 vs grupo control LG.

### 3.4. Efecto de los OND en el estudio del transcriptoma en colon y yeyuno en ratones libres de gérmenes.

Con el fin de profundizar en los posibles efectos directos de FOS y GOS, independientes de sus acciones prebióticas, analizamos el transcriptoma de colon y yeyuno en ratones libres de gérmenes tratados con FOS y GOS solos o

combinados con el HBE mediante *microarrays*. Se utilizó la plataforma MouseWG-6V2-beadcheap compuesta por 45281 sondas empleando 3 *microarrays* en cada grupo, siendo a su vez cada muestra la mezcla de 3 muestras (ratones) del mismo grupo. Los datos crudos fueron transformados a  $\log_2$  y normalizados. Se consideró que existían diferencias significativas en aquellos genes cuyo  $\log_2$  *fold change* (tanto por uno) al comparar con el grupo control fue mayor de 1,5 o menor de -1,5 en una lista de genes con un valor de  $p < 0,05$ . El ajuste del valor de p-value se realizó utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg con el fin de disminuir la aparición de falsos positivos.

La administración de los distintos tratamientos modificó sustancialmente la expresión génica en colon y yeyuno (tablas 5 y 6).

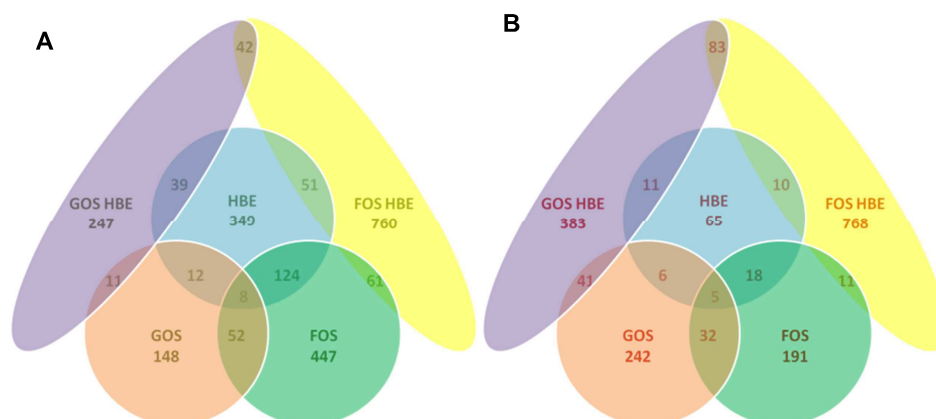
**Tabla 5: Número de genes cuya expresión está modificada de forma estadísticamente significativa en yeyuno de ratones libres de gérmenes**

	Genes modificados totales	Genes inducidos	Genes inhibidos
HBE LG vs Control LG	414	65	349
GOS LG vs Control LG	390	242	148
FOS LG vs Control LG	638	191	447
GOS+HBE LG vs HBE LG	630	383	247
FOS+HBE LG vs HBE LG	1528	768	760

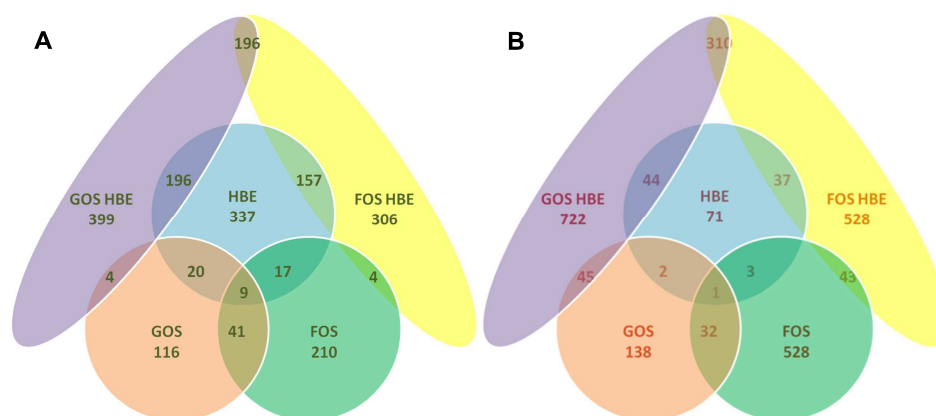
**Tabla 6: Número de genes cuya expresión está modificada de forma estadísticamente significativa en colon de ratones libres de gérmenes**

	Genes modificados totales	Genes inducidos	Genes inhibidos
HBE LG vs Control LG	408	71	337
GOS LG vs Control LG	254	138	116
FOS LG vs Control LG	306	96	210
GOS+HBE LG vs HBE LG	1121	722	399
FOS+HBE LG vs HBE LG	834	528	306

En las figuras 29 y 30 se describen los distintos genes modificados en común por los tratamientos en yeyuno y colon. En yeyuno cinco genes fueron inducidos en común por los tres tratamientos (GOS, FOS y el HBE), entre los que destaca el gen *Cttnb1*, que codifica la proteína catenina beta 1, componente del



**Figura 29: Número de genes cuya expresión está modificada de forma estadísticamente significativa en yeyuno de ratones libres de gérmenes A) Inhibición de la expresión y B) aumento de la expresión con respecto al control LG en los grupos HBE, GOS y FOS y con respecto al HBE LG en los grupos GOS HBE y FOS HBE.**



**Figura 30: Número de genes cuya expresión está modificada de forma estadísticamente significativa en colon de ratones libres de gérmenes A) Disminución de la expresión y B) aumento de la expresión con respecto al control LG en los grupos HBE, GOS y FOS y con respecto al HBE LG en los grupos GOS HBE y FOS HBE.**

complejo de adhesión cadherina, mediador en el proceso de adhesión célula-célula. La catenina beta 1 también está implicada en la regulación de genes relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Ocho genes fueron inhibidos por los tres tratamientos. Entre ellos cabe destacar *Defcr-rs1* (secuencia 1 relacionada con defensina alpha), gen expresado por las células de Paneth [350] que codifica un péptido con función antimicrobiana [351]. En lo que respecta a la expresión de genes en colon, tan solo el gen *Prrx1* fue inducido por los tres tratamientos. Este gen codifica la proteína PRRX1, que actúa como un coactivador de la transcripción del factor de respuesta al suero, una proteína requerida para la inducción de genes por factores de crecimiento y diferenciación. Tan solo 9 genes fueron inhibidos por los 3 tratamientos en

colon. Entre ellos cabe destacar la represión del gen que codifica la subunidad  $\gamma$  de EnaC, responsable del transporte electrógeno de sodio, implicado en el mantenimiento de la homeostasis del agua en el organismo .

A continuación se utilizó la plataforma informática Ingenuity, la cual permite valorar las distintas funciones celulares y moleculares que se encuentran modificadas utilizando bases de datos genómicas previamente establecidas. Dicha plataforma también es capaz de predecir en que sentido (activado o inhibido) se encuentra modificado un efecto concreto. La implicación de funciones biológicas, vías de señalización, etc., se basa en el mayor o menor peso de los genes alterados en cuanto a su nivel de expresión por los distintos tratamientos comparado con el total de genes del transcriptoma, filtrados por un test estadístico adecuado (z-score). Existe cierta concordancia en las funciones modificadas por los distintos tratamientos en yeyuno (tabla 7). Cabe destacar que la principal función molecular afectada por la administración del HBE fue el metabolismo lipídico, mientras que GOS afectó principalmente al crecimiento y proliferación celular. Esta función fue la segunda más afectada por la administración de FOS y se encontró también entre las más afectadas en los otros grupos que recibieron OND en combinación con el HBE. EL HBE solo o combinado con GOS y FOS produjo una alteración en la función definida como bioquímica de moléculas de pequeño tamaño. Las alteraciones en el metabolismo lipídico en el grupo tratado con el HBE se debieron a una disminución de la absorción, síntesis y metabolismo de ácidos grasos mientras que en el grupo tratado con FOS y GOS implicaron un aumento en estos procesos. Los tres tratamientos, HBE, GOS y FOS provocaron una modificación de la función movimiento celular. En los grupos HBE y FOS. esta alteración se debió principalmente a un descenso en el movimiento de leucocitos. Resultó imposible predecir el sentido de la alteración en el grupo tratado con GOS. FOS solo y en combinación con el HBE tuvo un efecto específico sobre el desarrollo celular, mientras que GOS y FOS alteraron las interacciones célula-célula mediante la inhibición de distintos procesos biológicos.



**Tabla 7: Funciones moleculares modificadas en yeyuno en ratones libres de gérmenes tratados con los OND.**

Funciones moleculares modificadas	Moléculas asociadas	Valor de p
<b>HBE LG vs Control LG</b>		
Metabolismo lipídico	78	5,16E-11-1,19E-03
Bioquímica de moléculas de pequeño tamaño	90	5,16E-11-1,19E-03
Transporte molecular	70	6,35E-10-9,70E-04
Movimiento celular	72	1,27E-08-1,16E-03
Producción de energía	16	2,27E-07-4,39E-04
<b>GOS LG vs Control LG</b>		
Crecimiento y proliferación celular	100	3,22E-07-1,54E-02
Modificaciones post-transcripcionales	16	1,04E-05-1,54E-02
Plegamiento de proteínas	8	1,04E-05-3,52E-05
Interacción y señalización célula-célula	35	3,53E-05-1,54E-02
Movimiento celular	56	3,53E-05-1,54E-02
<b>FOS LG vs Control LG</b>		
Movimiento celular	110	3,08E-10-3,71E-03
Crecimiento y proliferación celular	162	3,91E-10-3,20E-03
Desarrollo celular	157	5,80E-09-3,70E-03
Interacción y señalización célula-célula	78	5,73E-08-3,80E-03
Muerte celular y supervivencia	144	5,18E-06-3,73E-03
<b>FOS HBE LG vs SBH LG</b>		
Metabolismo de aminoácidos	64	2,12E-11-4,04E-03
Bioquímica de moléculas de pequeño tamaño	237	2,12E-11-4,04E-03
Síntesis de proteínas	131	4,58E-10-2,50E-03
Crecimiento y proliferación celular	335	6,07E-10-4,04E-03
Desarrollo celular	284	4,92E-08-3,94E-03
<b>GOS HBE LG vs SBH LG</b>		
Metabolismo lipídico	83	9,18E-09-5,98E-03
Bioquímica de moléculas de pequeño tamaño	110	9,18E-09-6,97E-03
Crecimiento y proliferación celular	153	6,81E-08-6,91E-03
Producción de energía	20	1,14E-07-5,79E-03
Transporte molecular	108	2,73E-07-5,79E-03
Movimiento celular	56	3,53E-05-1,54E-02

**Tabla 8: Funciones moleculares modificadas en colon en ratones libres de gérmenes tratados con los OND.**

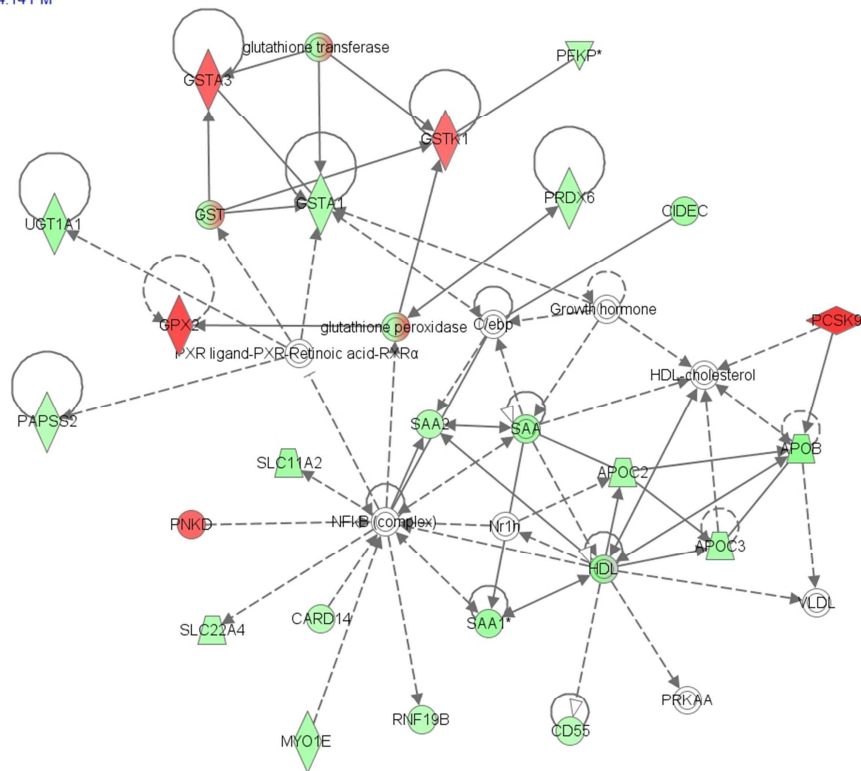
Funciones moleculares modificadas	Moléculas asociadas	Valor de p
<b>HBE LG vs Control LG</b>		
Metabolismo de fármacos	5	3,30E-06-1,33E-02
Metabolismo lipídico	37	3,30E-06-1,50E-02
Transporte molecular	66	3,30E-06-1,50E-02
Bioquímica de moléculas de pequeño tamaño	45	3,30E-06-1,50E-02
Crecimiento y proliferación celular	80	3,77E-06-1,50E-02
<b>GOS LG vs Control LG</b>		
Movimiento celular	51	4,68E-09-8,76E-03
Interacción y señalización célula-célula	43	2,51E-07-9,10E-03
Función y mantenimiento celular	42	6,95E-07-9,57E-03
Metabolismo lipídico	33	2,61E-06-9,29E-03
Transporte molecular	53	2,61E-06-9,10E-03
<b>FOS LG vs Control LG</b>		
Movimiento celular	47	2,17E-08-8,91E-03
Interacción y señalización célula-célula	44	4,59E-08-8,26E-03
Metabolismo lipídico	40	2,07E-07-8,18E-03
Bioquímica de moléculas de pequeño tamaño	53	2,07E-07-8,26E-03
Transporte molecular	50	5,13E-06-8,26E-03
<b>GOS HBE LG vs SBH LG</b>		
Movimiento celular	175	1,26E-10-4,39E-03
Muerte celular y supervivencia	215	4,61E-10-4,91E-03
Ciclo celular	99	7,02E-09-4,89E-03
Crecimiento y proliferación celular	236	1,02E-08-4,66E-03
Metabolismo lipídico	110	1,63E-08-4,89E-03
<b>FOS HBE LG vs SBH LG</b>		
Metabolismo lipídico	97	2,90E-07-6,54E-03
Bioquímica de moléculas de pequeño tamaño	133	2,90E-07-6,54E-03
Movimiento celular	132	8,16E-07-6,54E-03
Transporte molecular	157	1,77E-06-6,54E-03
Interacción y señalización célula-célula	110	5,53E-06-6,69E-03

En colon (tabla 8), se observó una modificación en el metabolismo lipídico en todos los grupos estudiados. A su vez, ambos OND, solos o combinados con el HBE, provocaron una activación de la función movimiento celular. De forma específica, FOS solo y asociado al HBE modificó las interacciones célula-célula debido a un aumento de la atracción leucocitaria.

#### **3.4.1. Efecto de los OND sobre genes implicados en el metabolismo lipídico y del glutatión en ratones libres de gérmenes**

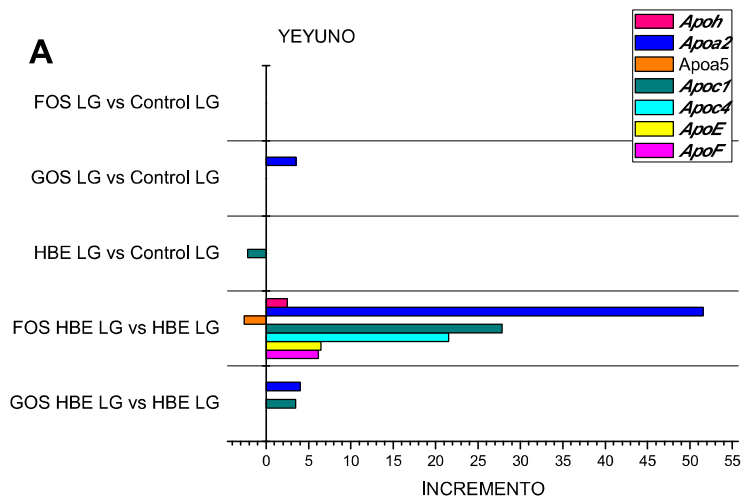
La detección de modificaciones en el metabolismo lipídico en colon fue una constante en todos los grupos ensayados; sin embargo, en la mayoría de los casos fue imposible establecer si este fue resultado de una inhibición o estimulación global del mismo. Con el fin de estudiar con mayor precisión los genes implicados en este fenómeno, y la relación existente entre estos, utilizamos la plataforma Ingenuity para elaborar redes moleculares relacionadas con distintos procesos biológicos. Así, las alteraciones en el metabolismo observadas en colon de ratones tratados con el HBE estaban asociadas a una disminución en la expresión de genes que codifican distintas apoproteínas, entre ellas APOB, APOC2 y APOC3 (Fig 31). A su vez, en la red molecular pudimos observar diferencias significativas en la expresión de varias enzimas implicadas en la inactivación de radicales libres, como glutatión S transferasa alpha 3 (Gsta3), glutatión S transferasa alpha 1 (Gsta1), glutatión S transferasa kappa1 (Gstk1) y glutatión peroxidasa 2 (Gpx2), esta última responsable de la mayoría de las reacciones de reducción de peróxido de hidrógeno dependiente de glutatión que se llevan a cabo en el epitelio del tracto gastrointestinal. Estas vías no solo estaban alteradas en el colon de ratones tratados con el HBE, sino que también se observaron diferencias en la expresión de distintas apoproteínas en el colon en el resto de los grupos tratados e incluso en yeyuno de ratones tratados con FOS+HBE (Fig 32A-B). La expresión de diversas enzimas implicadas en las reacciones redox del glutatión estaban modificadas principalmente en yeyuno de ratones tratados con FOS y GOS asociados al HBE y en colon en el grupo al que se administró el HBE, tal y como podemos ver en la red molecular, así como en los grupos en los que este está asociado a FOS y GOS (Fig 31, 32B-C).

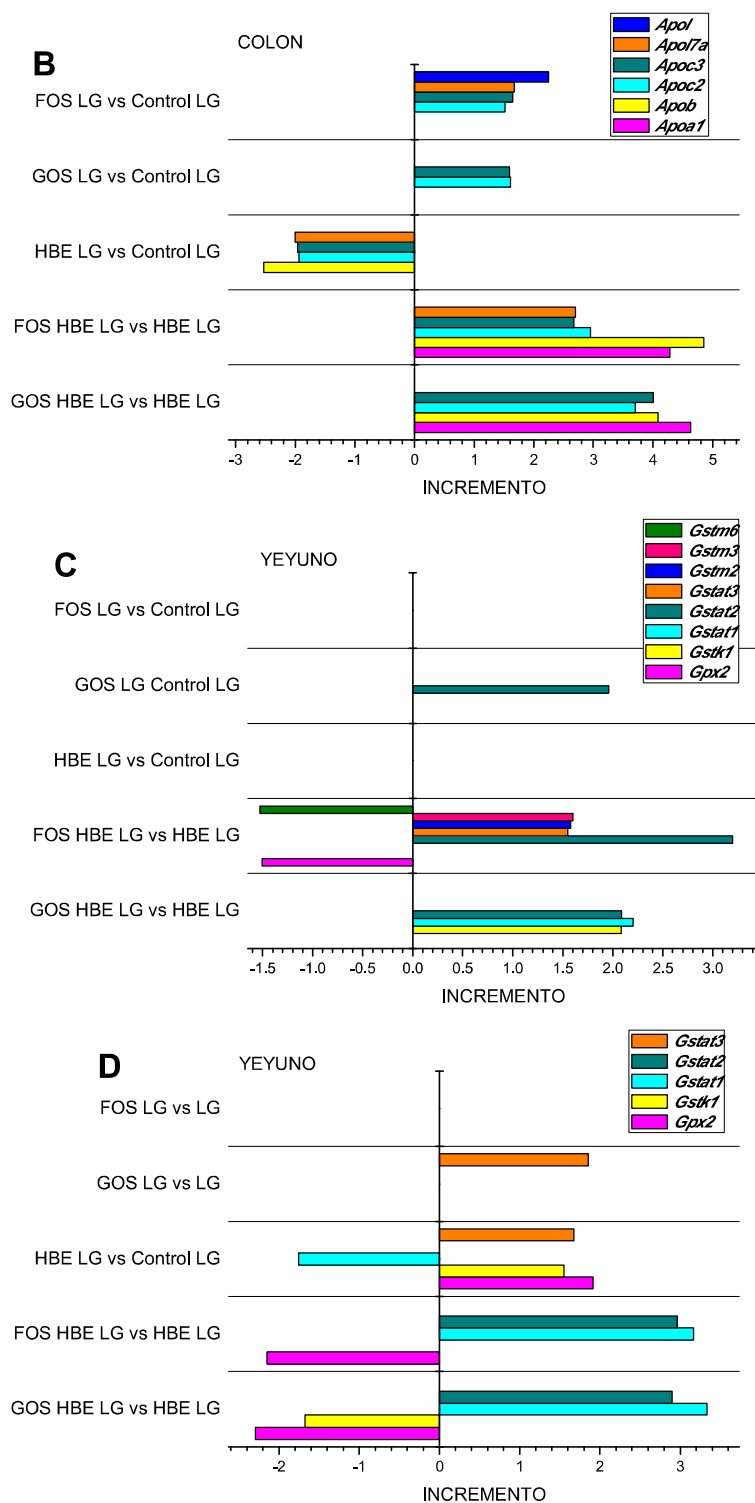
Network 2 : CO\_plus-CO\_woNR\_TABLE - 2013-02-04 04:14 PM : CO\_plus-CO\_woNR\_TABLE.txt : CO\_plus-CO\_woNR\_TABLE - 2013-02-04 04:14 PM



© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figura 31: Modificación de la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico y bioquímica de moléculas de pequeño tamaño en colon (HBE LG vs Control LG).** Esquema generado por la plataforma informática Ingenuity.





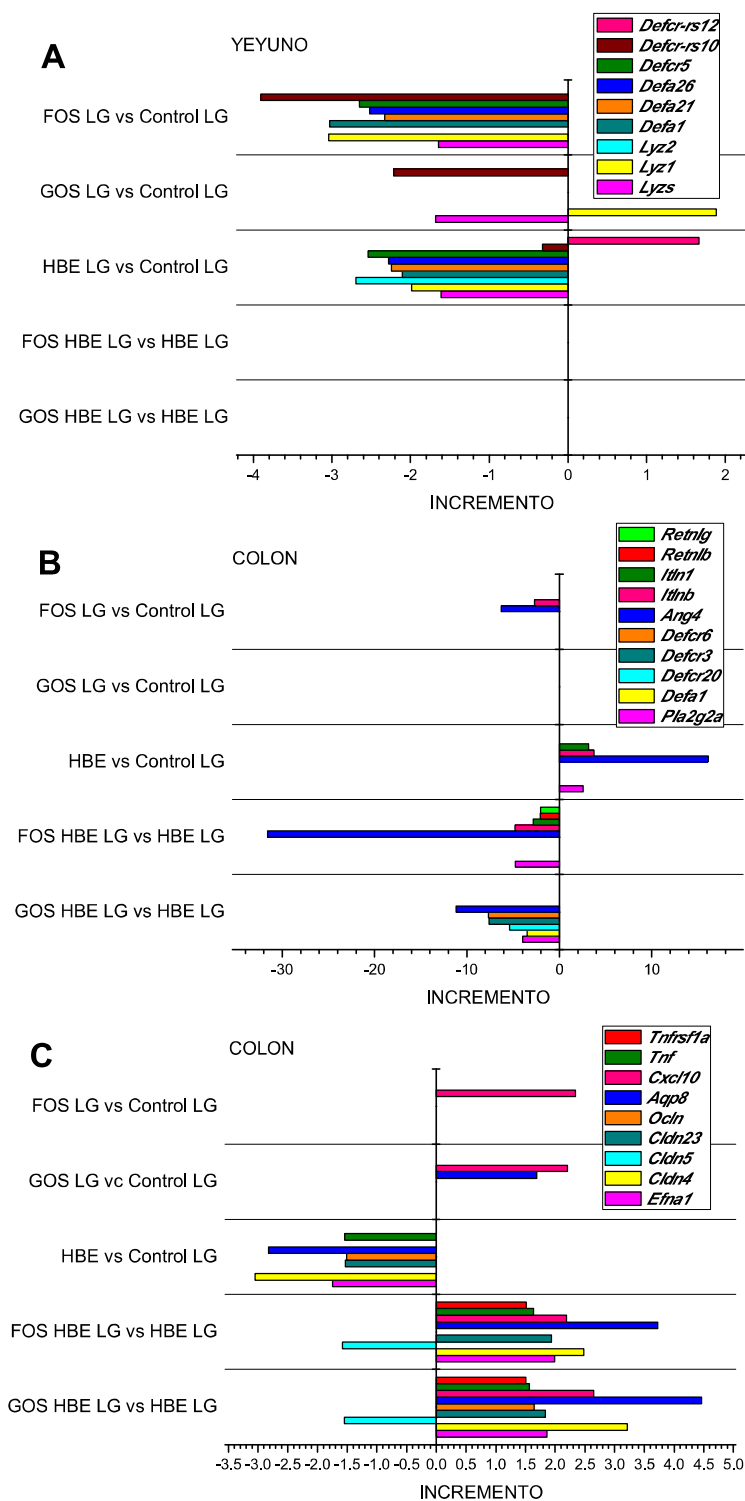
**Figura 32: Modificación en la expresión de genes en ratones libres de gérmenes tratados con los OND.** (A) Apoproteínas en yeyuno, (B) apoproteínas en colon, (C) enzimas implicadas en las reacciones redox del glutatión en yeyuno, (D) enzimas implicadas en las reacciones redox del glutatión en colon.

### 3.4.2. Efecto de los OND sobre genes implicados en la modulación de la microbiota y función barrera en ratones libres de gérmenes

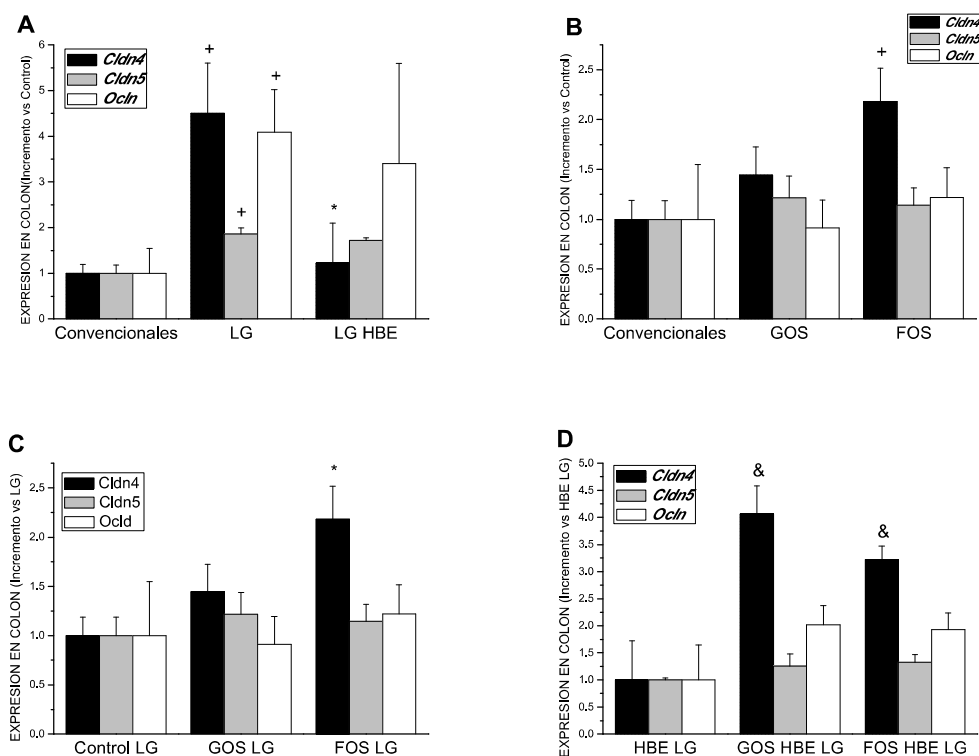
Finalmente, llevamos a cabo un estudio de expresión génica relacionada con la modulación de la microbiota por la mucosa intestinal, independientemente del análisis realizado con Ingenuity. En concreto, detectamos una inhibición en la expresión de distintas moléculas de carácter antimicrobiano en el yeyuno de los ratones tratados con HBE y FOS (alfa defensinas, lisozima C péptidos de secuencia relacionada con defensinas), así como en el colon de los grupos FOS+HBE y GOS+HBE (defensinas, angiogenina 4, fosfolipasa A2, y otras moléculas relacionadas como la intelectina 1, intelectina b y moléculas *resistin like*). La expresión de genes correspondientes a las proteínas que componen las *uniones estrechas* aumentó en colon de estos grupos, a excepción de *Cldn5*, cuya expresión estaba inhibida en ambos. Por el contrario, en general el HBE inhibió la expresión de estos genes. En colon el HBE inhibió la producción de TNF, mientras que FOS y GOS contrarrestaron este efecto. Los oligosacáridos incluso incrementaron la expresión del receptor de TNF (*Tnfsf1a*). Otras moléculas de interés, como acuaporina 8, *Cxcl10* o *Efna1*, también mostraron diferencias significativas en su expresión en los distintos grupos (Fig 33).

### 3.5. Estudio postgenómico

A continuación, se escogieron 16 genes basándonos en su importancia biológica y las diferencias obtenidas en los distintos grupos, para realizar una validación del *microarray* en colon mediante RT-PCR. Entre los genes seleccionados, encontramos genes que componen las *uniones estrechas* (*Cldn4*, *Cldn5*, *Ocln*), moléculas de carácter antimicrobiano o capaces de modular la microbiota (*Defa1*, *Pla2g2a*, *Ang4*, *Itln1*), transportadores o genes relacionados con el transporte hidroelectrolítico (*Edn1*, *Aqp8*, *Slc26a3*, *Slc9a3*, *Atp1a1*, *Atp1b1*, *Scnn1a*, *Scnn1b*, *Scnn1g*) y otros (*Cxcl10*). La determinación de la expresión de estos genes mediante RT-PCR también se realizó en animales convencionales. En condiciones de esterilidad aumentó significativamente la expresión de *Cldn4*, *Cldn5* y *Ocln*. El HBE inhibió parcialmente la expresión de estos genes (Fig 34A). En ratones convencionales y libres de gérmenes FOS incrementó la expresión de *Cldn4* (Fig 34B-C). Asociado al HBE, GOS y FOS también aumentaron la expresión de este gen de forma significativa (Fig 34D).



**Figura 33: Modificación en la expresión de genes en ratones libres de gérmenes tratados con los OND. (A) defensinas en yeyuno, (B) defensinas y moléculas relacionadas en colon y (C) otros genes en colon.**

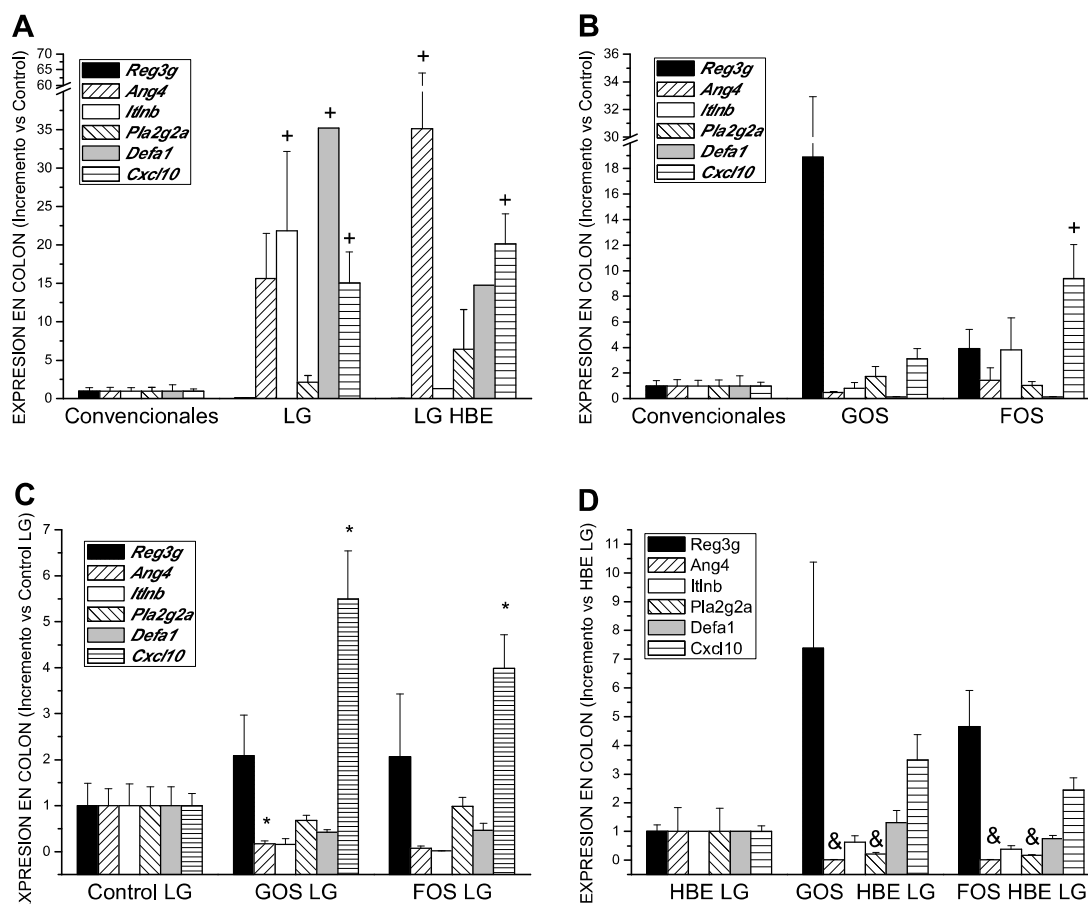


**Figura 34: Determinación de la expresión de claudinas y ocludina mediante RT-PCR en colon de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.** Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; <sup>\*</sup>p<0,05 vs grupo control LG; <sup>&</sup>p<0,05 vs control HBE LG.

La expresión de *Defa1*, *Itlnb* y *Cxcl10* fue inducida significativamente en animales en condiciones de esterilidad, así como la de *Ang4*, aunque esta última de forma no significativa. El tratamiento con el HBE en condiciones de esterilidad provocó una represión de los genes *Itlnb* y *Defa1* con respecto a los animales libres de gérmenes (no significativo)(Fig 35A). En animales convencionales FOS tiene un efecto inductor de la expresión de *Cxcl10* que se repite en condiciones de esterilidad al administrar no solo FOS sino también GOS. La expresión de *Ang4*, *Itlnb*, y *Defa1* fue reprimida por ambos tratamientos por sí mismos no significativamente (Fig 35 B-C). La combinación de FOS y GOS con el HBE inhibió la expresión de *Ang4* y *Pla2g2a* de forma significativa (Fig 35 D).

El estudio del transcriptoma colónico mostró un efecto predominantemente inhibitor del HBE sobre la expresión de distintos genes relacionados con el transporte entre los que destacamos *edn1*, *Scnn1b* y *Scnn1g* (subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  ENaC). Puesto que estos genes tienen una baja expresión en condiciones basales, estos resultados sugieren que en los animales libres de





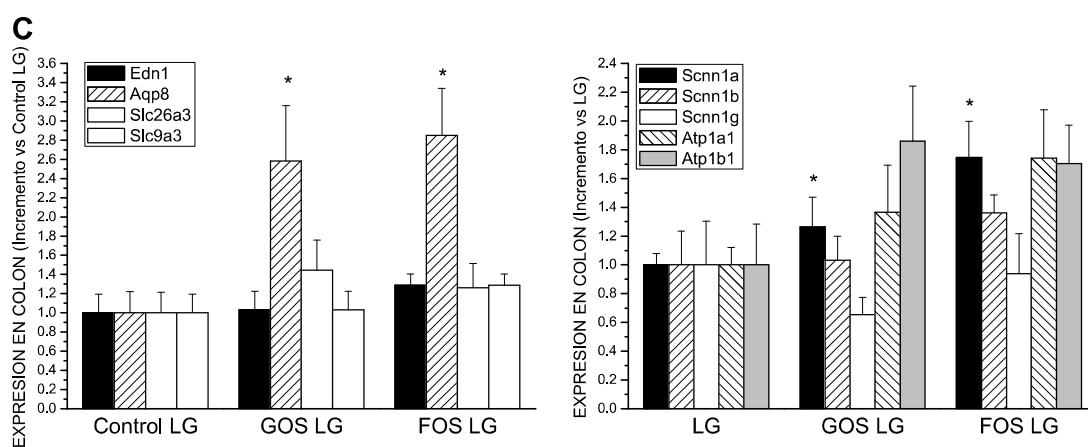
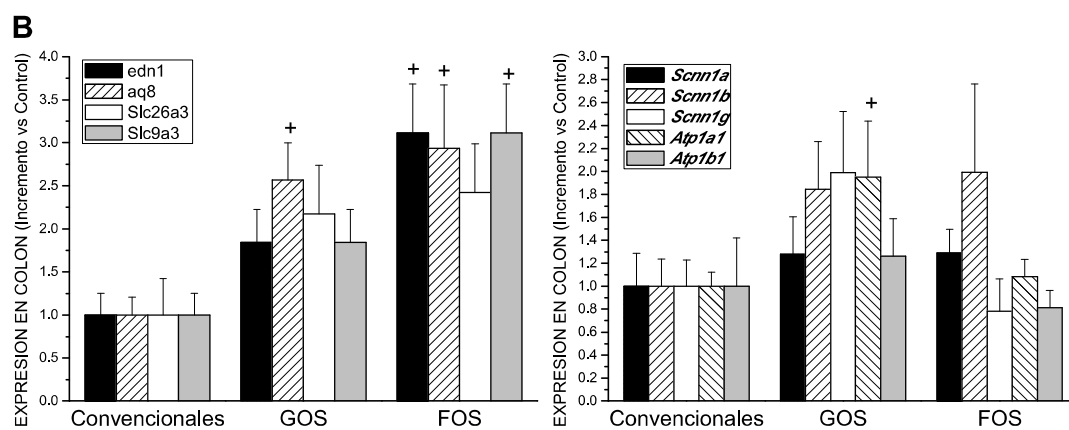
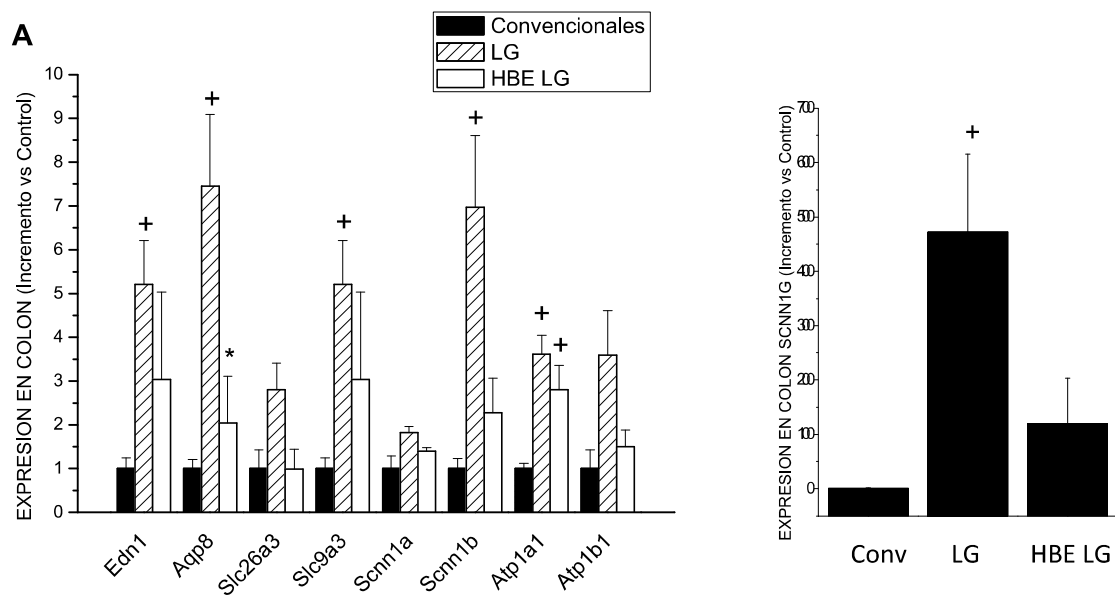
**Figura 35: Determinación de la expresión de moléculas secretadas en colon de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.** Expresión génica en (A) controles, (B) ratones convencionales y (C) ratones libres de gérmenes y (D) ratones libres de gérmenes + HBE. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9).  $^+$ p<0,05 vs grupo control convencionales;  $^*$ p<0,05 vs grupo control LG;  $^{\&}$ p<0,05 vs control HBE LG.

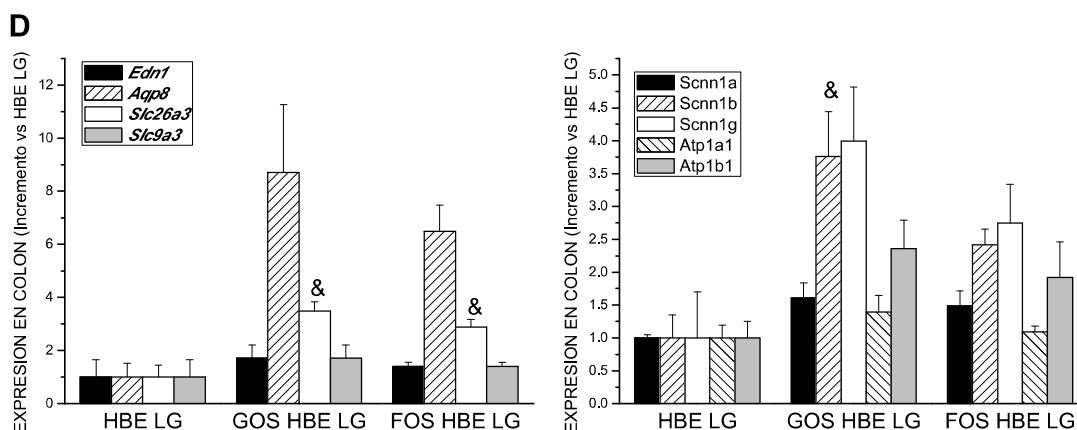
gérmenes están sobre expresados. La estimulación de la expresión de estos genes podría ser una respuesta a la alteración en la homeostasis del agua observada en ratas mantenidas en condiciones de esterilidad [15]. Por tanto, estudiamos mediante RT-PCR el efecto de los OND y de la microbiota en la expresión de estos genes y de otros transportadores, que también estaban modificados de forma significativa en distintos grupos según el *microarrays*. En concordancia con nuestra hipótesis, los animales libres de gérmenes mostraron un aumento significativo en la expresión de *Scnn1b* y *Scnn1g* (subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de ENaC), así como de *edn1* (endotelina 1). Del mismo modo, el resto de genes estudiados, *Slc9a3* (NHE3), *Aqp8* (*acuaporina 8*) y *Atp1a1* (la subunidad  $\alpha$  de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) estaban incrementados de forma significativa en ratones libres de gérmenes, mientras que *Atp1b1* ( $\beta$  ATPasa) y *Slc26a3* (DRA), mostraron tan

solo una tendencia en el mismo sentido. La subunidad  $\alpha$  de ENaC (*Scnn1a*) no se afectó por la microbiota. Al administrar el HBE, la presencia de antígenos en el lumen normalizó parcialmente el nivel de expresión de todos los genes estudiados, exceptuando *Atp1b1* ( $\beta$  ATPasa) (Fig 36A). En ratones convencionales GOS aumentó la expresión de *Atp1a1* ( $\alpha$  ATPasa), FOS de *edn1*, y *Slc19a3* (NHE3) y ambos la de *Aqp8* (Fig 36 B). En animales libres de gérmenes FOS y GOS aumentaron la expresión *Scnn1a* (la subunidad  $\alpha$  de ENaC) y de *Aqp8* (Fig 36 C). La combinación GOS con el HBE aumentó la expresión de *Scnn1b* ( $\beta$  ENaC). La combinación de ambos OND con el HBE incrementó los niveles de ARNm de *Slc26a3* (DRA). Los datos confirman una inhibición en la expresión de *Scnn1g* ( $\gamma$  ENaC) al administrar FOS y GOS en ratones en condiciones de esterilidad. Sin embargo esta inhibición no fue significativa en ninguno de los casos (Fig 36D). En conclusión, los datos obtenidos mediante RT-PCR confirman el aumento en la expresión de distintos genes implicados en el transporte electrolítico en ratones libres de gérmenes, así como la capacidad de normalizar parcialmente este incremento mediante el tratamiento con el HBE. Este efecto inhibitorio del HBE no se produce al asociarlo a los OND en la dieta.

Al realizar la validación del *microarray* mediante RT-PCR en colon se obtuvo una buena correlación global entre los datos obtenidos mediante ambos métodos ( $R=0,83$ ) (Fig 37). La mayoría de los genes mostraron una modificación en la expresión en el mismo sentido en *microarrays* y RT-PCR (*Aqp8*, *Ang4*, *Cxcl10*, *Cldn4*, *Ocln*, *pla2g2a*, *slc26a3* y *Scnn1g*). En algunos casos, se observaron diferencias en los resultados obtenidos mediante ambos métodos. Al determinar la expresión de *Scnn1b* y *edn1* mediante RT-PCR se observó un aumento en los grupos FOS y GOS en contraposición con la inhibición detectada mediante *microarray*. Sin embargo, mediante ambas técnicas se detectó una inhibición en la expresión de ambos genes en el grupo HBE. Tampoco coincidieron los resultados obtenidos mediante RT-PCR y *microarray* en la expresión de *Cldn5* en los grupos GOS+HBE y FOS+HBE y la expresión de *Itlnb* en los grupos FOS y FOS+HBE.

## Resultados

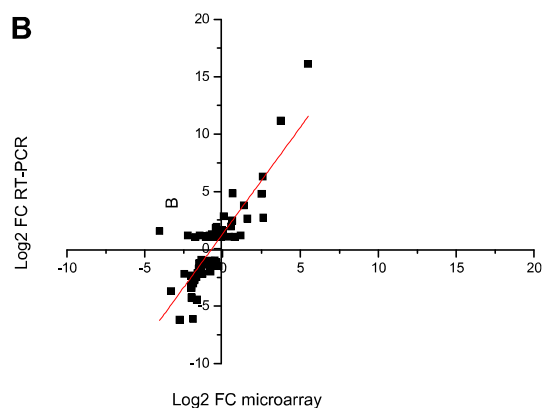




**Figura 36: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos mediante RT-PCR en colon de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.** Expresión génica en (A) controles, (B) ratones convencionales (C) ratones libres de gérmenes y (D) ratones libres de gérmenes + HBE. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs grupo control LG; &p<0,05 vs control HBE LG.

**A**

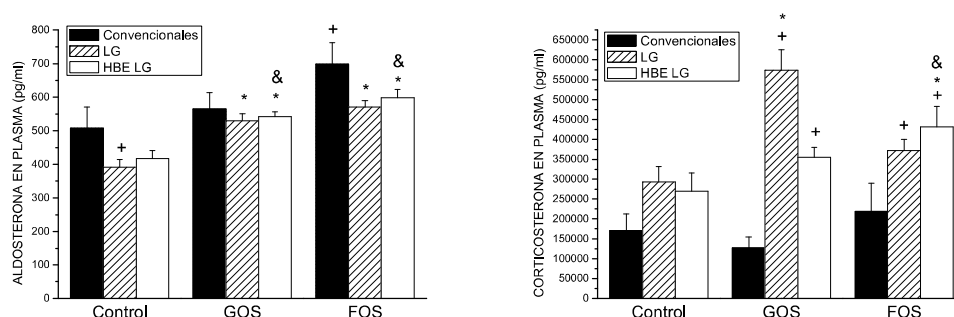
<i>Cldn4</i>	<i>Edn1</i>
<i>Cldn5</i>	<i>Aqp8</i>
<i>Ocln</i>	<i>Slc26a3</i>
<i>Defa1</i>	<i>Atp1a1</i>
<i>Pla2g2a</i>	<i>Atp1b1</i>
<i>Ang4</i>	<i>Scnn1a</i>
<i>Itln1</i>	<i>Scnn1b</i>
<i>Cxcl10</i>	<i>Scnn1g</i>



**Figura 37: Validación de los datos obtenidos mediante *microarrays* en el tratamiento con OND en animales libres de gérmenes.** (A) Genes seleccionados para realizar la validación y (B) correspondencia entre la media del log2 del *fold change* obtenido mediante *microarrays* y la media del log2 del *fold change* obtenida mediante RT-PCR.

### 3.6. Efecto de los OND en la concentración de aldosterona y corticosterona en plasma sanguíneo en ratones libres de gérmenes

Uno de los principales reguladores del transporte de sodio en el intestino es la aldosterona. Este mineralocorticoide, entre otras acciones, induce la transcripción de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de ENaC en colon distal, y facilita la inserción del trímero funcionalmente activo en la membrana apical, estimulando la reabsorción de sodio y agua tanto en colon distal como en el riñón. Por otra parte, la corticosterona es el principal glucocorticoide en rata y ratón y tiene funciones reguladoras del transporte hidroelectrolítico en el intestino, además de ser un precursor de la aldosterona. Puesto que los resultados anteriores muestran una alteración en la expresión de estas subunidades, decidimos determinar los niveles de estos corticoides en plasma. La ausencia de microbiota afectó de forma diferente a los niveles de aldosterona y corticosterona, produciendo una disminución significativa de la primera y un incremento de la segunda (Fig 38). EL HBE no alteró estos efectos. FOS incrementó los niveles de aldosterona en ratones convencionales y en ratones libres de gérmenes, solo o con el HBE. La administración de GOS se asoció con una tendencia similar en animales convencionales, la cual llegó a ser significativa en ratones libres de gérmenes (con y sin el HBE). Los niveles de corticosterona en plasma no se vieron afectados por los oligosacáridos en condiciones convencionales, mientras que aumentaron en ratones libres de gérmenes, efecto que sólo llegó a ser significativo en los grupos GOS y FOS+HBE.



**Figura 38: Concentración de aldosterona y corticosterona en plasma de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.** Las muestras de sangre se obtuvieron, utilizando heparina como anticoagulante. Se determinó la concentración de aldosterona y corticosterona en plasma mediante ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9).+p<0,05 vs grupo control convencionales; \*p<0,05 vs grupo control LG; &p<0,05 vs control HBE LG.

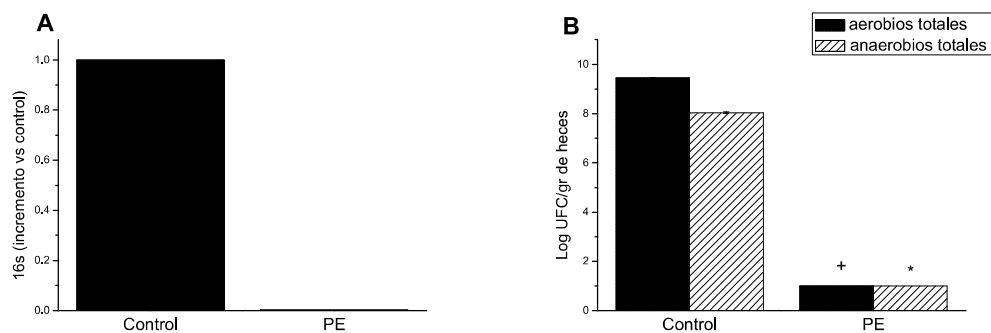
## **4. Estudio del papel de la microbiota en la expresión de transportadores en colon**

Dado que los resultados obtenidos indican un aumento en la expresión de distintos transportadores en colon de ratones en condiciones de esterilidad, decidimos estudiar en profundidad este fenómeno. En concreto, nos planteamos en primer lugar confirmar el efecto que las alteraciones en la expresión génica asociadas a la vida en esterilidad tienen a nivel fisiológico, y concretamente en el transporte hidroelectrolítico. En segundo lugar, quisimos abordar el estudio de estas alteraciones en ausencia (depleción masiva) de microbiota no innata sino sobrevenida. Este enfoque tiene gran interés, pero venía dado también por la dificultad de realizar estos experimentos en condiciones libres de gérmenes. A continuación, estudiamos el papel de FOS y el HBE en el transporte hidroelectrolítico en ratones cuya microbiota había sido eliminada (animales pseudo estériles). Por último, planteamos el papel de la microbiota en transporte en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones mantenidos en condiciones de esterilidad y en ratones pseudo estériles.

### **4.1. Expresión de transportadores en colon y ciego de ratones pseudo estériles.**

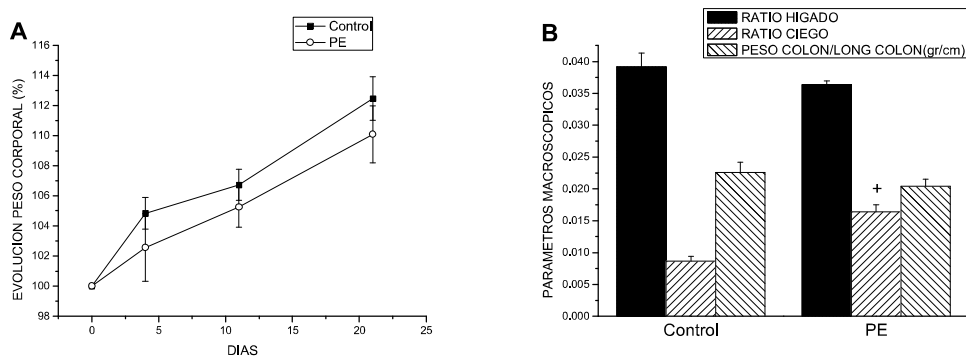
Con el objetivo de eliminar la microbiota, se administró una mezcla de antibióticos en agua de bebida durante 4 semanas, siguiendo protocolos anteriormente establecidos [344].

La depleción de la microbiota se comprobó mediante la extracción de ADN de heces y posterior cuantificación del 16s mediante RT-PCR. A su vez, se realizaron cultivos de heces en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, que confirmaron una reducción significativa del número de bacterias en heces (Fig 39).



**Figura 39: Cuantificación de bacterias en heces en ratones pseudo estériles.** (A) Cuantificación 16s bacteriano en heces mediante RT-PCR y (B) cultivo de bacterias fecales en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=7).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control aerobios totales; <sup>\*</sup>p<0,05 vs grupo control anaerobios totales.

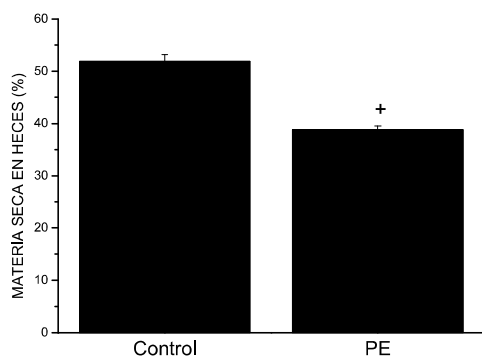
El tratamiento con antibióticos no afectó de forma significativa a la evolución del peso corporal de los animales (Fig 40A), al peso del hígado (ratio peso hígado: peso corporal) o al peso y longitud del colon (Fig 40B). Sin embargo, al igual que en los ratones estériles, los ratones pseudo estériles mostraron un aumento en la ratio del ciego que fue significativa en este experimento, confirmando la similitud existente entre ambos modelos (Fig 40B).



**Figura 40: Evolución del peso corporal y parámetros macroscópicos en ratones pseudo estériles.** (A) evolución del peso corporal, (B) ratio hígado (peso hígado/ peso ratón), ratio ciego (peso ciego/ peso ratón) y peso colon/ longitud del colon. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=7).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.

El estudio de las heces no solo reveló una disminución en la carga bacteriana, sino que también se observaron heces más blandas en ratones pseudo estériles, característica que por otro lado también está descrita en ratones en condiciones de esterilidad. Este hecho fue confirmado al determinar

el cálculo del porcentaje de materia seca en heces, el cual presentó una reducción significativa en ratones pseudo estériles frente a los controles normales (Fig 41).

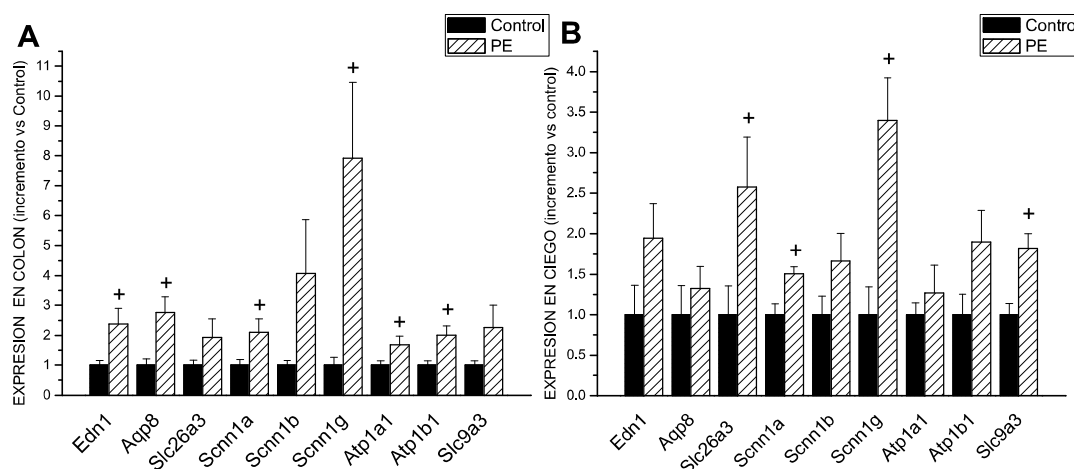


**Figura 41 :Porcentaje de materia seca en heces de ratones pseudo estériles.** El porcentaje de materia seca en heces se calculó a partir del peso de heces frescas y de heces sometidas a un proceso de deshidratación mediante incubación en estufa 37<sup>0</sup>C durante 72 horas. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=7).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.

A continuación se determinó la expresión de distintos transportadores y moléculas relacionadas con el transporte de agua e iones en el colon de ratones pseudo estériles. La reducción de la flora bacteriana provocó un aumento significativo en la expresión de genes que codifican diversos transportadores relacionados con el transporte de sodio, entre ellos las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  de ENaC (*Scnn1b* y *Scnn1g*), así como las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (*Atp1a1* y *Atp1b1*). También la acuaporina 8 (*Aqp8*), así como la endotelina 1 (*edn1*), mostraron un aumento significativo de su expresión al eliminar la microbiota. Otros transportadores también implicados en el transporte de sodio, como NHE3 (*Slc9a3*), o la subunidad  $\beta$  de ENaC (*Scnn1b*), así como el antiportador cloruro/bicarbonato DRA (*Slc26a3*), mostraron una tendencia no significativa a incrementar su expresión en colon.

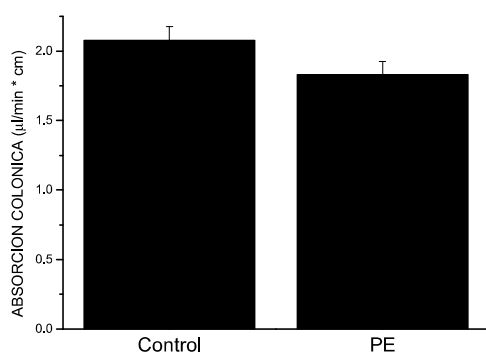
Dadas las diferencias observadas en el tamaño del ciego tanto en ratones en condiciones de esterilidad como en ratones pseudo estériles y la distinta bibliografía que confirma la existencia de diferencias importantes no solo en su tamaño sino también en su contenido, decidimos estudiar también la expresión de moléculas relacionadas con el transporte en este órgano. Al igual que en colon, la expresión de  $\alpha$  y  $\gamma$  de ENaC (*Scnn1a* y *Scnn1g*) se incrementó de forma significativa al reducir la microbiota. El incremento en la expresión de DRA (*Slc26a3*) y NHE3 (*Slc9a3*) también fue significativo, mientras que el resto de moléculas, endotelina 1 (*edn1*), acuaporina 8 (*Aqp8*),  $\beta$  ENaC (*Scnn1b*) así como las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (*Atp1a1* y *Atp1b1*) mostraron un aumento no significativo de su expresión en ciego.





**Figura 42: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos por RT-PCR en ratones pseudo estériles.** (A) colon y (B) ciego. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=7). + p<0,05 vs grupo control.

La alteración de la consistencia de las heces y de la expresión de transportadores sugiere una modificación en la absorción colónica. Con el fin de determinar la capacidad de absorción de agua se realizó un experimento de colon ligado durante 30 minutos, el cual puso de manifiesto una disminución no significativa de la absorción en ratones pseudo estériles.



**Figura 43: Absorción colónica en ratones pseudo estériles.** El volumen de absorción colónica expresado por unidad de tiempo y longitud del colon se determinó mediante la introducción de solución de Ringer en colon ligado durante 30 minutos y posterior cálculo del volumen restante. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=7). + p<0,05 vs grupo control.

#### 4.2. Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones libres de gérmenes

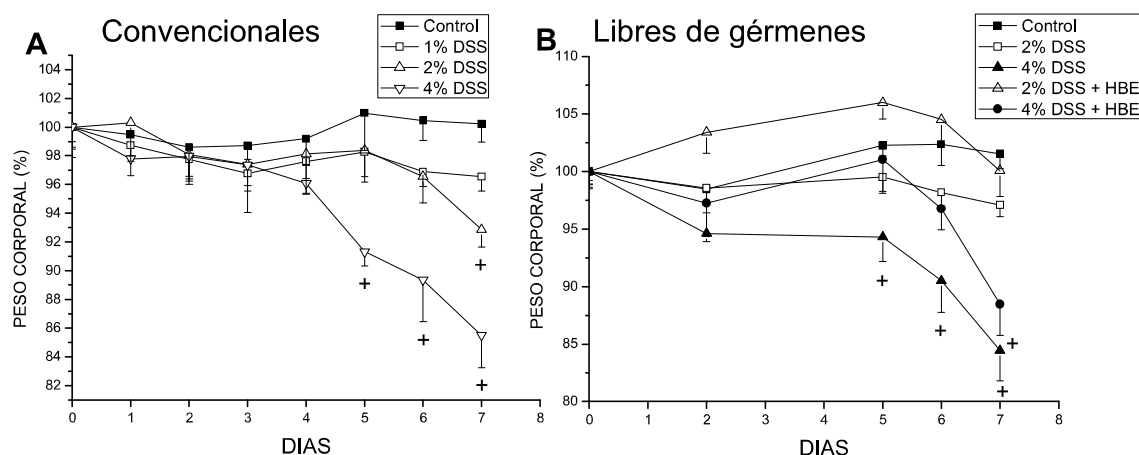
Una vez demostrada la influencia de la microbiota en el control de la homeostasis del agua y su capacidad para modificar la expresión de distintos

transportadores en ciego y colon, planteamos el estudio en un modelo de colitis experimental inducido por DSS en animales libres de gérmenes. La microbiota juega un papel crucial en el desarrollo de inflamación intestinal de forma que no es sencillo inducir colitis en condiciones de esterilidad. Elegimos el modelo de colitis por DSS dado que algunos estudios indican que los ratones libres de gérmenes desarrollan colitis en este modelo. La colitis se indujo mediante la administración de distintas dosis de DSS (2% y 4%) en agua de bebida durante una semana. Se incluyeron dos grupos a los que se añadió en combinación con el DSS el HBE (0,016%) con el fin de determinar la influencia de los antígenos de la microbiota en lumen. Finalmente, se realizó un experimento paralelo con ratones convencionales como control en los que se utilizaron dosis de 1% 2% y 4% de DSS. Este experimento se realizó con dos objetivos diferentes: la caracterización de la inflamación en ausencia de microbiota, objeto de estudio de la tesis doctoral del Dr. Fermín Capitán Cañadas y el estudio de la alteración génica en moléculas relacionadas con el transporte en colon. Algunos de los datos necesarios para constatar el grado de inflamación de los animales han sido previamente presentados en la mencionada tesis doctoral.

Tal y como está descrito, los animales a los que se administró DSS perdieron peso de forma significativa a partir del cuarto día (Fig 44), además de sufrir otros síntomas de colitis, como diarrea y hematoquecia. De los animales en condiciones de esterilidad murieron tres ratones en el grupo DSS 4%, uno en el DSS 2% + HBE y otro en el DSS 4% + HBE. Por el contrario, entre los animales convencionales solo murió prematuramente un ratón en el grupo DSS 4%. El efecto del DSS sobre la pérdida de peso corporal fue dependiente del tiempo y de la dosis. Cabe destacar que la suplementación con HBE evitó este efecto con la dosis de 2% de DSS.

Los animales convencionales tratados con DSS desarrollaron una inflamación intestinal de intensidad dosis dependiente caracterizada principalmente por fibrosis e hiperemia (Fig 45). La relación entre el peso y la longitud del colon no aumentó significativamente, a pesar del engrosamiento aparente (que fue valorado como parte del índice de daño macrocópico, ver Fig. 45). Además de colitis, los animales mostraron un incremento en el peso del hígado que fue significativo en el grupo DSS 2%.

Los animales libres de gérmenes presentaron un aspecto más enfermizo que los controles convencionales, con una menor movilidad espontánea y una mayor tendencia a acurrucarse y decoloración marcada de orejas y ojos. Una

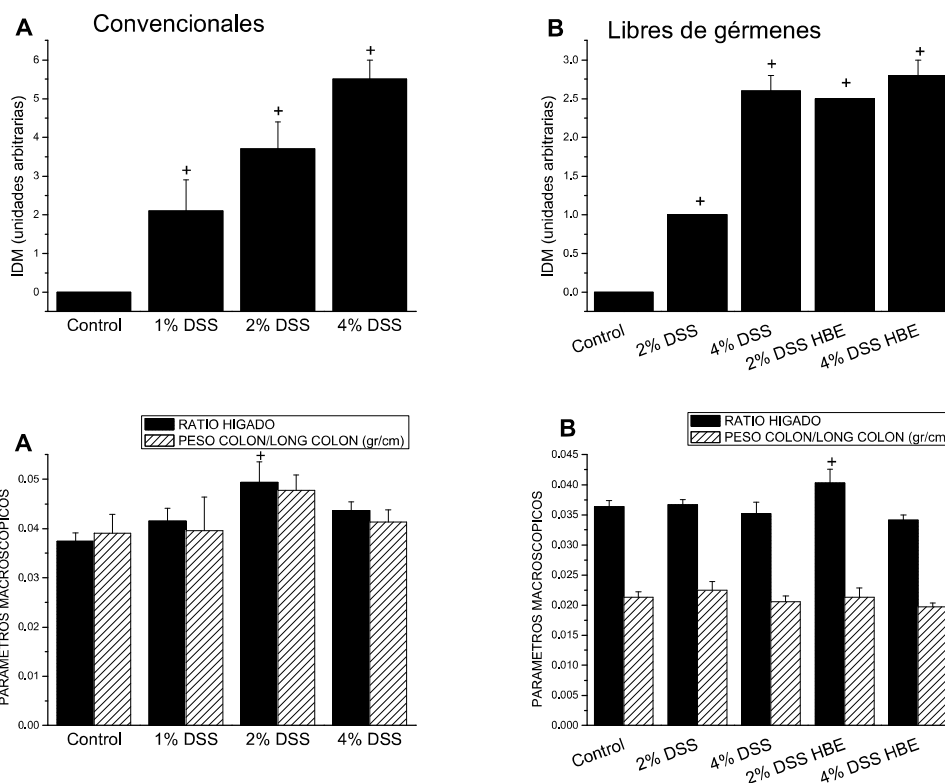


**Figura 44: Evolución del peso corporal en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes.** (A) Ratones convencionales y (B) ratones libres de gérmenes. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9). <sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.

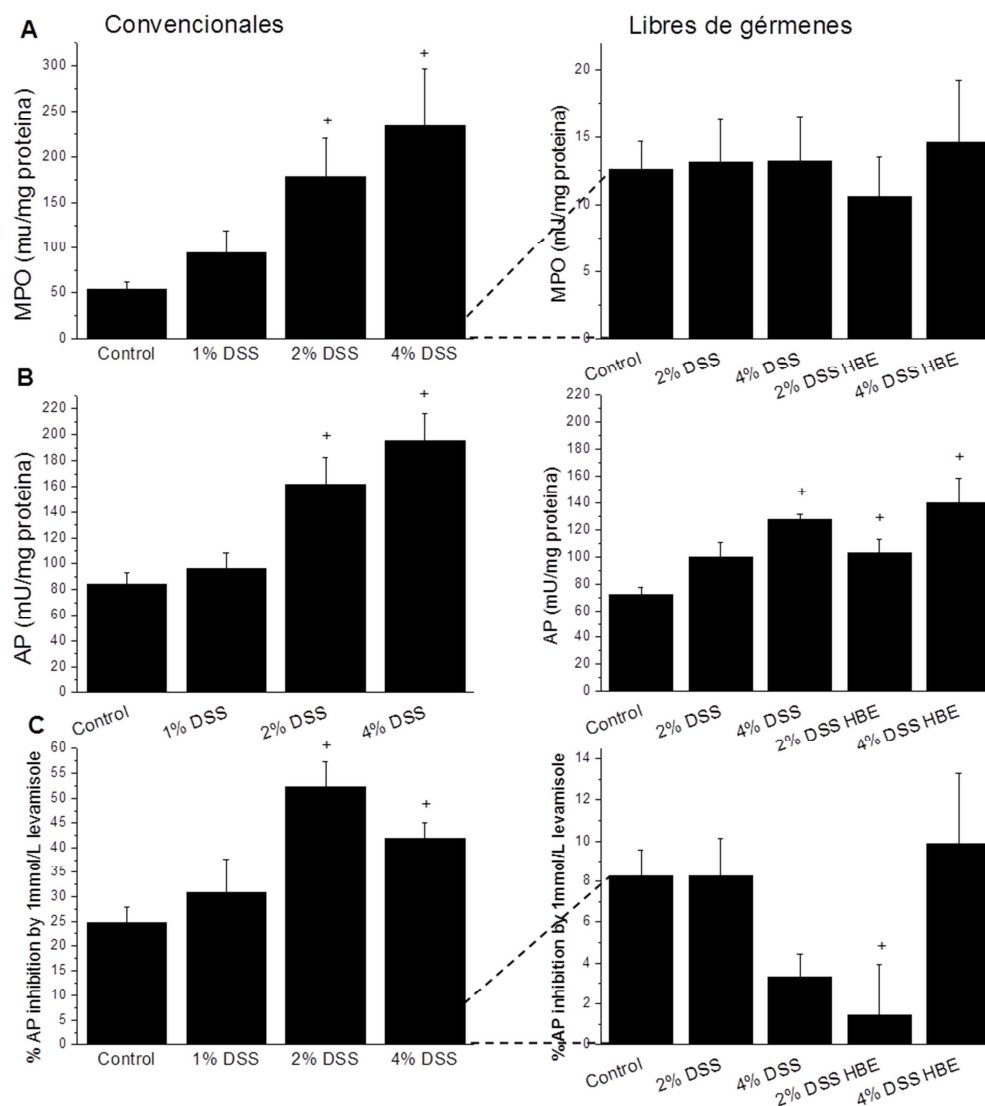
vez sacrificados, estos animales no mostraron hiperemia intestinal y se observó una decoloración patente de sangre e hígado. Todos estos datos sugieren que los animales libres de gérmenes tratados con DSS pierden sangre en mayor proporción que los animales convencionales. El colon de los ratones tratados con DSS presentaba algunos signos de inflamación, como fibrosis y fragilidad, pero no engrosamiento de forma que el IDM resultó menor en animales en condiciones de esterilidad, a pesar de que su estado general era más grave (Fig 45). A excepción del grupo tratado con DSS 2% y HBE, los ratones libres de gérmenes no mostraron hepatomegalia (Fig 45).

En animales convencionales se observó un incremento de la actividad mieloperoxidasa (MPO) colónica dependiente de la dosis de DSS, indicativo de un aumento en la infiltración de neutrófilos. También se determinó la actividad AP, marcador de inflamación y estrés epitelial, obteniéndose resultados similares (Fig 46). La sensibilidad de la actividad AP al levamisol aumentó en el tejido colónico, lo cual es coherente con una mayor infiltración de neutrófilos y/o con el cambio de isoforma descrito previamente en enterocitos [345]. Por el contrario, en los animales libres de gérmenes no se observaron cambios en la actividad MPO, ni en la sensibilidad de la actividad AP al levamisol, en tanto que el incremento en la actividad AP fue menos acusado. De hecho, tanto la actividad MPO basal como la sensibilidad de la AP al levamisol estaban claramente disminuidos en ratones libres de gérmenes. La adición del HBE no

tuvo ningún efecto sobre estos parámetros, a excepción de una disminución en el porcentaje de inhibición de la actividad AP en el grupo DSS 2% + HBE.



**Figura 45: Parámetros macroscópicos en el modelo de colitis experimental inducida por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes.** (A) Ratones convencionales y (B) ratones libres de gérmenes. Los datos han sido expresados como media aritmética ± error estándar de la media (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.

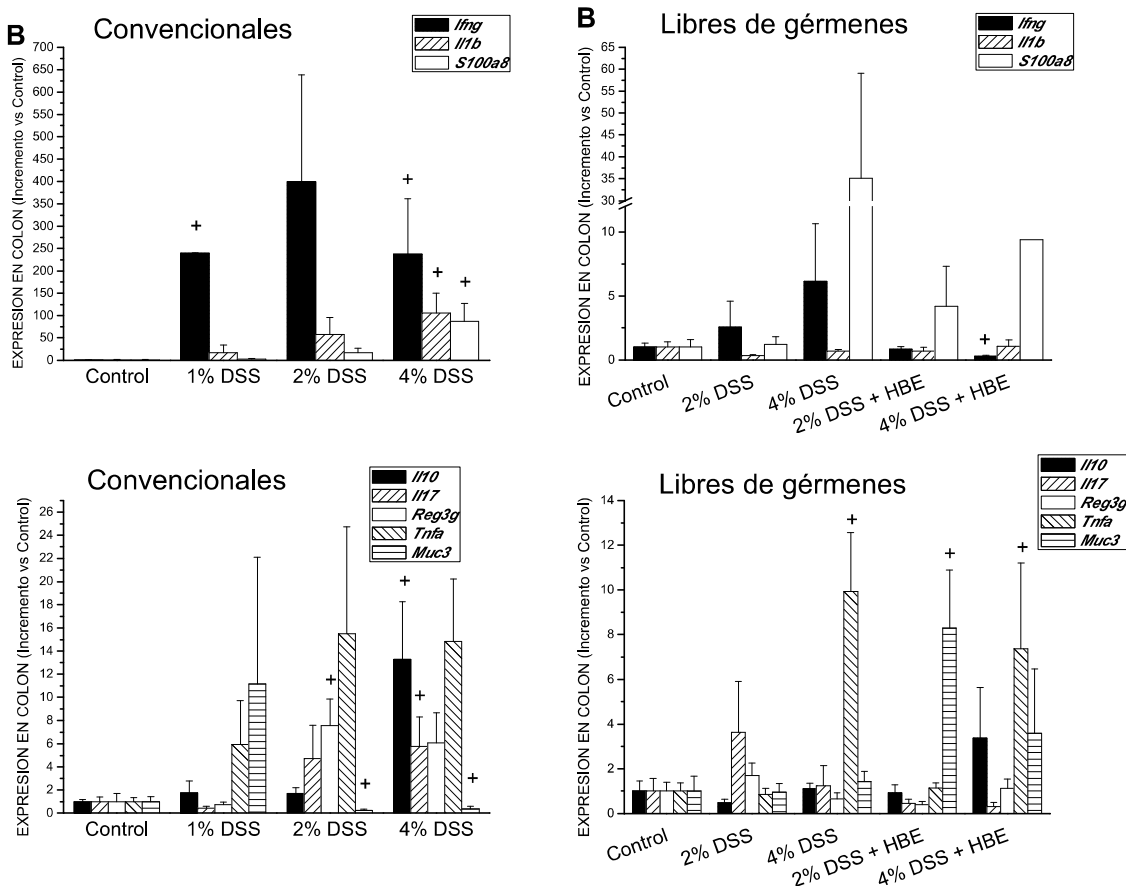


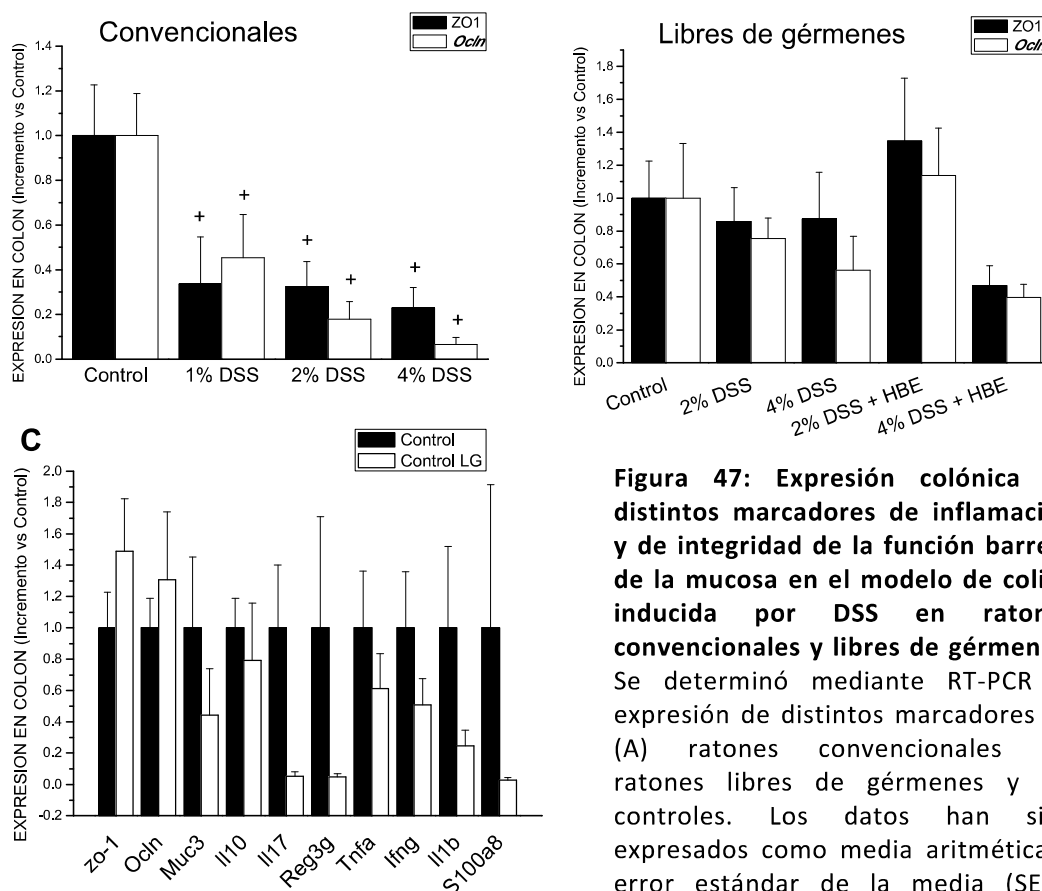
**Figura 46: Actividades enzimáticas en colon en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes** (A) Actividad mieloperoxidasa, (B) actividad AP y (C) sensibilidad de la AP a su inhibidor (levamisol 1mmol/l) en ratones libres de gérmenes y controles convencionales. La línea de puntos muestra la diferencia en la escala entre gráficas. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9). <sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.

A continuación determinamos la expresión de distintos marcadores de inflamación mediante RT-PCR. Observamos una inhibición en la expresión de *Il10*, *Il17*, *Reg3g*, *Tnfa*, *Ifng*, *Il1b* y *S100a8* en animales libres de gérmenes que no alcanzó significancia en ninguno de los genes estudiados (Fig 47C). En ratones convencionales, la administración de DSS 4% provocó por el contrario un aumento significativo de la expresión de *Il1b* y *S100a8*. Los niveles de ARNm de *Ifng* y *Tnfa* también aumentaron como consecuencia del tratamiento con DSS a todas las dosis estudiadas mientras que *Reg3g* e *Il17* solo a las dosis de 2 y 4%,

e *I110* al 4% (Fig 47A). En ratones libres de gérmenes, se observaron menos diferencias en los niveles de expresión de estos genes que incluyeron un aumento significativo en *Tnfa* al administrar DSS 4% con y sin el HBE. También un aumento no significativo de la expresión de *I110*, que revirtió como consecuencia del tratamiento con el HBE y de *S100a8* en el grupo DSS 4% con y sin el HBE (Fig 47B).

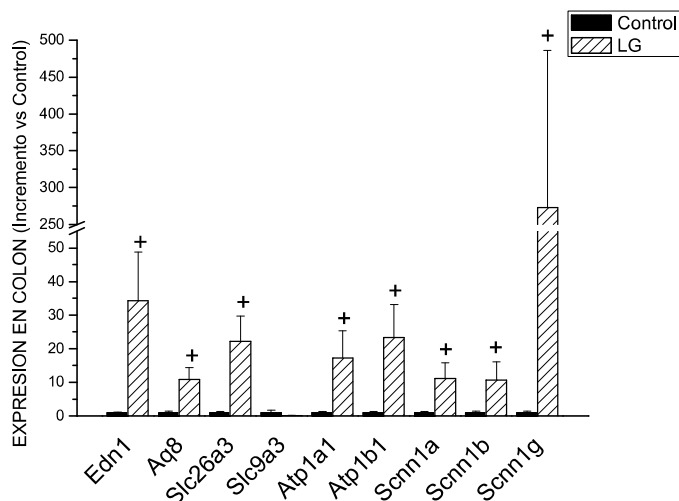
Para completar el estudio anterior se analizaron distintos genes relacionados con la función barrera en el epitelio. En animales libres de gérmenes los niveles de ARNm de ocludina y ZO1, proteínas que componen las uniones estrechas en el epitelio intestinal, aumentaron, mientras que MUC3 fue inhibido como consecuencia de la ausencia de microbiota (Fig 47). En ratones convencionales, la expresión de ocludina, ZO1 y MUC3 fue inhibida por el DSS a todas las dosis estudiadas en el caso de los dos primeros genes, y en los grupos DSS 2% y 4% para *Muc3*. En ratones libres de gérmenes el DSS no alteró la expresión de ocludina y ZO1. *Muc3* aumentó tan solo en los grupos a los que se administró el HBE.



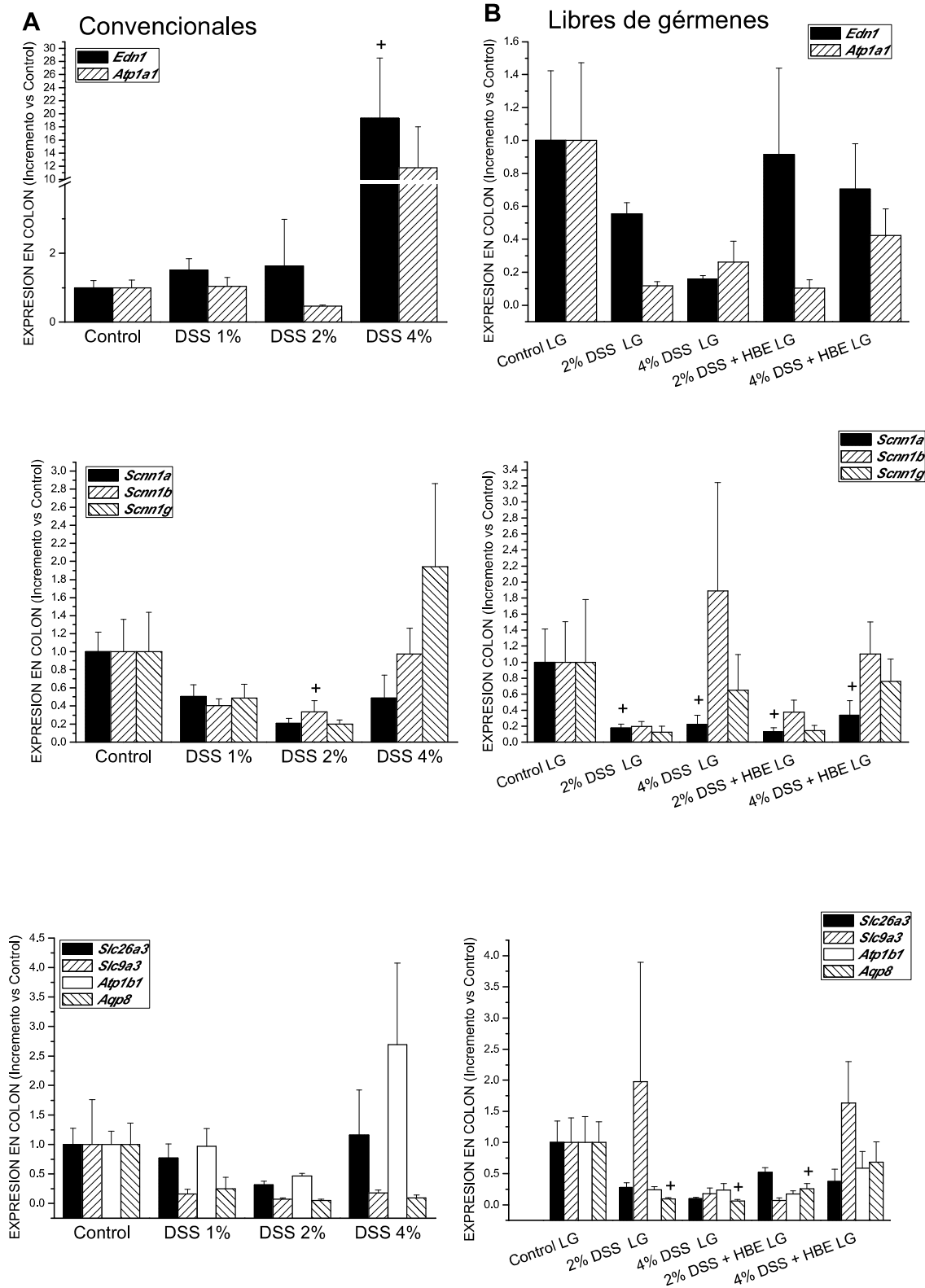


**Figura 47: Expresión colónica de distintos marcadores de inflamación y de integridad de la función barrera de la mucosa en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes.** Se determinó mediante RT-PCR la expresión de distintos marcadores en (A) ratones convencionales (B) ratones libres de gérmenes y (C) ratones controles. Los datos han sido expresados como media aritmética ± error estándar de la media (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.

A continuación, abordamos el estudio de la expresión de transportadores en el colon. La ausencia de microbiota provocó un incremento en la expresión de *edn1*, *aqp 8*, *Slc26a3* (DRA), *Atp1a1*, *Atp1b1* (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), *Scnn1a*, *Scnn1b* y *Scnn1g* (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de ENaC) en los animales no expuestos a DSS (Fig 48).



**Figura 48: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos mediante RT-PCR en ratones convencionales y libres de gérmenes.** Los datos han sido expresados como media aritmética ± error estándar de la media (SEM) (n=9).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.



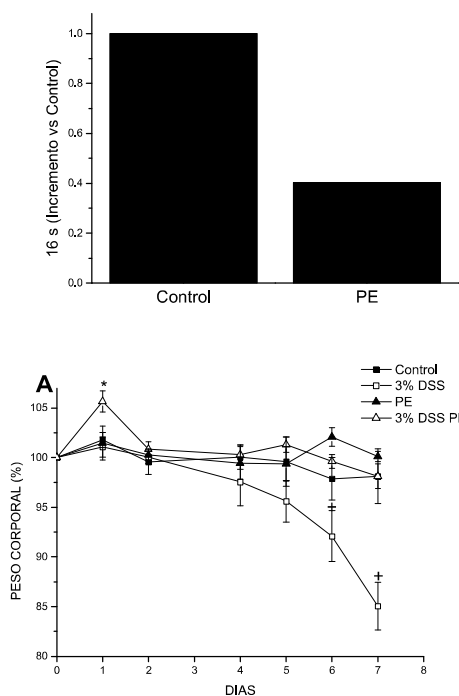
**Figura 49: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos mediante RT-PCR en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes.** (A) ratones convencionales y (B) ratones libres de gérmenes. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=9). <sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.



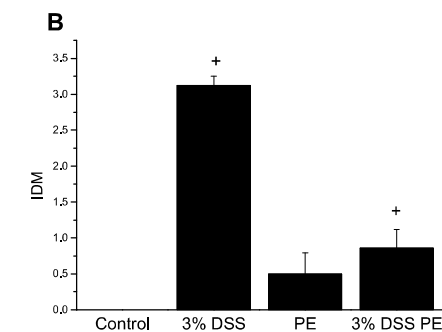
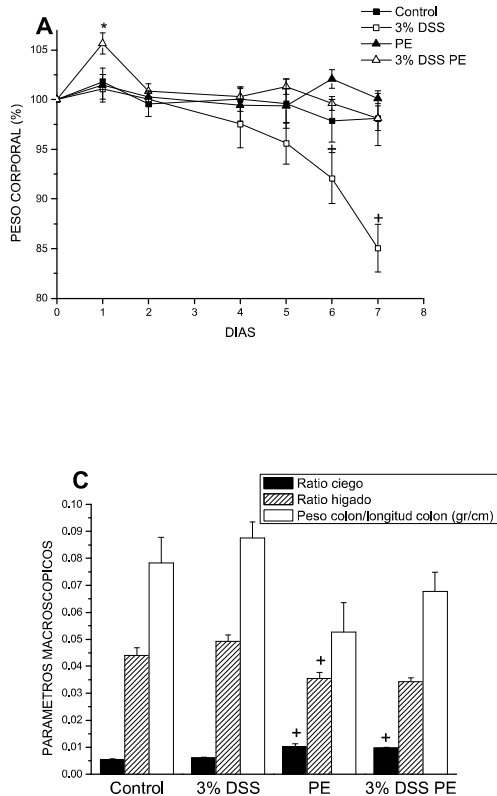
Por el contrario, el estado de esterilidad no afectó a la expresión de *Slc9a3* (NHE3). La administración de DSS en ratones libres de gérmenes dio lugar a una disminución de los niveles de ARNm de *Edn1*, *Atp1a1*, *Atp1b1* (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), *Scnn1a*, *Scnn1b* y *Scnn1g* (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de ENaC), *Slc26a3* (DRA), aunque no siempre con carácter significativo). No hubo diferencias en la expresión de *Slc9a3* (NHE3) (Fig. 49B). La administración de DSS en ratones convencionales aumentó de forma significativa los niveles de *end1* en el grupo tratado con DSS 4% y presentó una tendencia no significativa con *Atp1a1* ( $\alpha$  ATPasa). Se observó asimismo una reducción generalizada en la expresión de *Scnn1a*, *Scnn1b* y *Scnn1g* ( $\alpha\beta\gamma$  ENaC), que curiosamente fue más pronunciada con la dosis de 2%, así como de *Slc9a3* (NHE3) y *Aqp8*, y en menor medida *Slc26a3* (DRA) y *Atp1b1* ( $\beta$ ATPasa), aunque sin alcanzar en general carácter significativo (Fig 49A).

#### **4.3. Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones pseudo estériles**

Con el fin de averiguar si se obtendrían resultados similares al inducir la depleción de la flora bacteriana en ratones convencionales, realizamos un experimento similar en ratones pseudo estériles. Como en el caso anterior (sección estudio del papel de la microbiota en la expresión de transportadores en colon y ciego de ratones pseudo estériles), se administró una mezcla de antibióticos a ratones convencionales con el fin de reducir la microbiota. A las 4 semanas se determinó la proporción de 16S bacteriano en heces, observándose una disminución significativa con respecto al control (Fig 50). Una vez comprobada la depleción bacteriana, se inició el tratamiento con DSS 3% en agua de bebida. Los animales convencionales a los que se administró DSS perdieron peso a partir de día 4, mientras que los animales pseudo estériles se mantuvieron estables (Fig 51A). Los ratones tratados con DSS mostraron un incremento significativo en el índice de daño macroscópico comparados con el grupo control. El IDM en ratones DSS control triplicó el valor del de los ratones DSS PE (Fig 51B). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la relación peso:longitud del colon y tampoco se observó hepatomegalia. Los ratones que recibieron la mezcla de antibióticos mostraron un incremento significativo del tamaño del ciego, independientemente de la inducción de la colitis (Fig 51C).

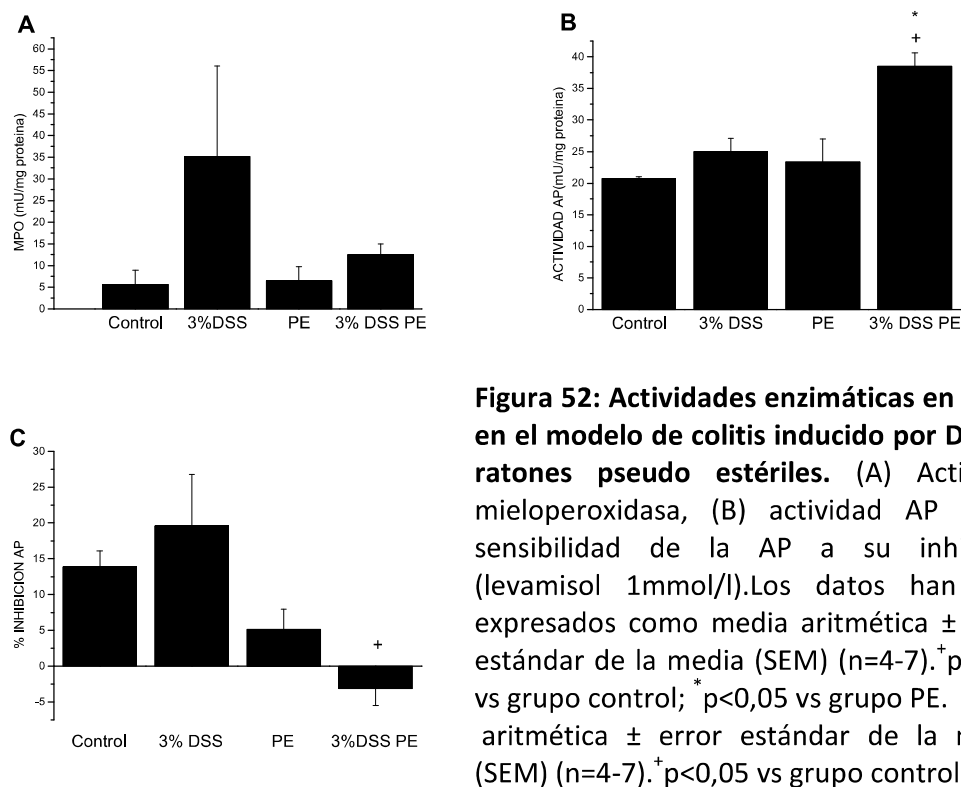


**Figura 50: Cuantificación de bacterias en heces en ratones pseudo estériles.** Se cuantificó el ADN 16s bacteriano en heces mediante RT-PCR después de administrar una mezcla de antibióticos durante 4 semanas, previa inducción de la colitis con DSS

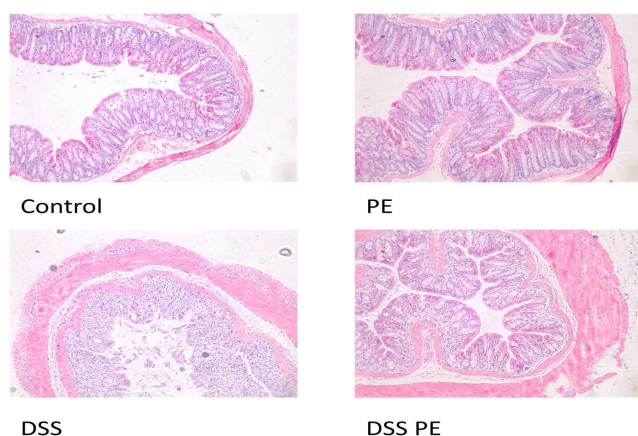


**Figura 51: Evolución del peso corporal y parámetros macroscópicos en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones pseudo estériles.** (A) Evolución del peso corporal, (B) IDM y (C) ratio hígado (peso hígado/ peso ratón), ratio ciego (peso ciego/ peso ratón) y peso colon/ longitud del colon. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=4-7).  $^+ p < 0,05$  vs grupo control;  $^* p < 0,05$  vs grupo PE.

La actividad MPO colónica fue considerablemente mayor en el grupo control DSS comparado con su correspondiente control no colítico, mientras que en animales pseudo estériles, el DSS no afectó significativamente a este parámetro (Fig 52). Por el contrario, la actividad AP colónica no aumentó en animales convencionales, y sí en los pseudo estériles, al administrar DSS. Este incremento se asoció a un descenso en la sensibilidad al levamisol *in vitro*.

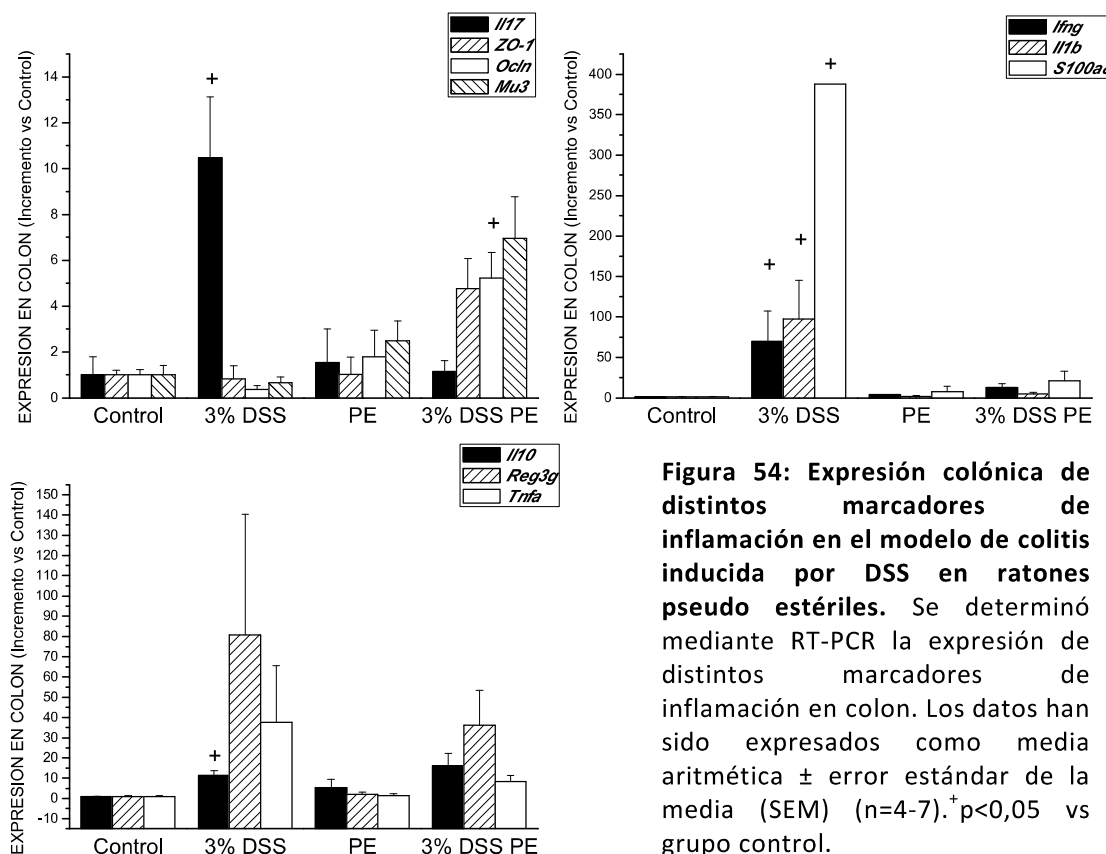


Al realizar una tinción eosina-hematoxilina de los cortes histológicos procedentes de colon distal, los animales convencionales tratados con DSS mostraron signos de inflamación, como infiltración en la mucosa y submucosa, así como elongación de las criptas y erosión epitelial. Sin embargo, en ratones pseudo estériles, la estructura general de la mucosa se preservó adecuadamente, detectándose tan solo una mínima infiltración leucocitaria (Fig 53).



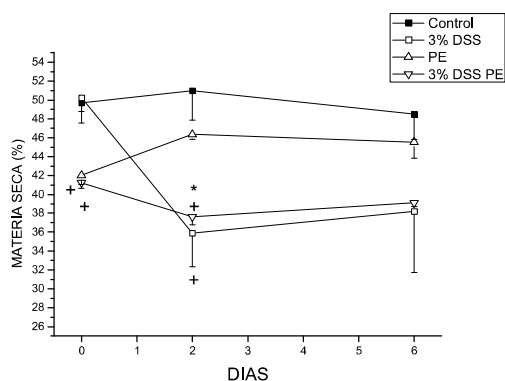
**Figura 53: Tinción eosina-hematoxilina en muestras histológicas de colon en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones pseudo estériles.**

En el grupo control DSS la expresión de *S100a8*, *Il17*, *Ifng*, *Il1b* e *Il10* en colon aumentó de forma significativa (Fig 54). También se observó un incremento, no significativo, en la expresión de *Tnfa* y *Reg3g*. En ratones pseudo estériles, el DSS no indujo la expresión de estos marcadores, sin embargo, *Muc3*, *ZO1* y *ocln*, que no se afectaron en el grupo control, aumentaron su expresión en animales pseudo estériles con DSS.



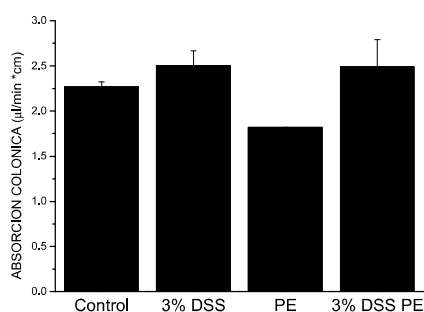
**Figura 54: Expresión colónica de distintos marcadores de inflamación en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones pseudo estériles.** Se determinó mediante RT-PCR la expresión de distintos marcadores de inflamación en colon. Los datos han sido expresados como media aritmética ± error estándar de la media (SEM) (n=4-7).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control.

Tal y como se había descrito previamente, el porcentaje de materia seca en heces de los ratones pseudo estériles fue inferior al de los ratones control (Fig 55). Al administrar el DSS tanto en ratones controles como pseudo estériles, este porcentaje descendió hasta alcanzar el mismo nivel en ambos grupos como consecuencia de la diarrea provocada por el DSS.



**Figura 55: Evolución del porcentaje de materia seca en heces en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones pseudo estériles.** El porcentaje de materia seca en heces se calculó a partir del peso de heces frescas y de heces sometidas a un proceso de deshidratación mediante incubación en estufa a 37 °C durante 72 horas. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=4-7).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control; \*p<0,05 vs grupo PE

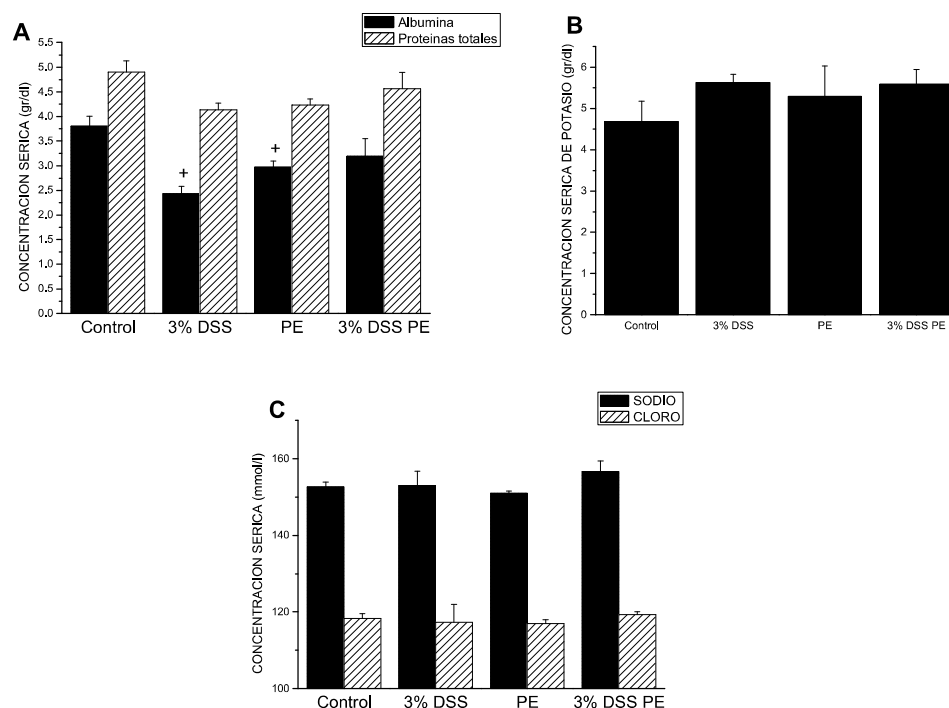
La absorción en colon no se vio afectada por el DSS en ratones convencionales. En ratones en condiciones de pseudoesterilidad se registró un descenso de la capacidad de absorción (no significativo), que desapareció totalmente a consecuencia de la exposición a DSS (Fig 56).



**Figura 56: Absorción colónica en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones pseudo estériles.** El volumen de absorción colónica expresado por unidad de tiempo y longitud del colon se determinó mediante la introducción de solución de Ringer en colon ligado durante 30 minutos y posterior cálculo del volumen restante. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=4-7).<sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control; \*p<0,05 vs grupo PE.

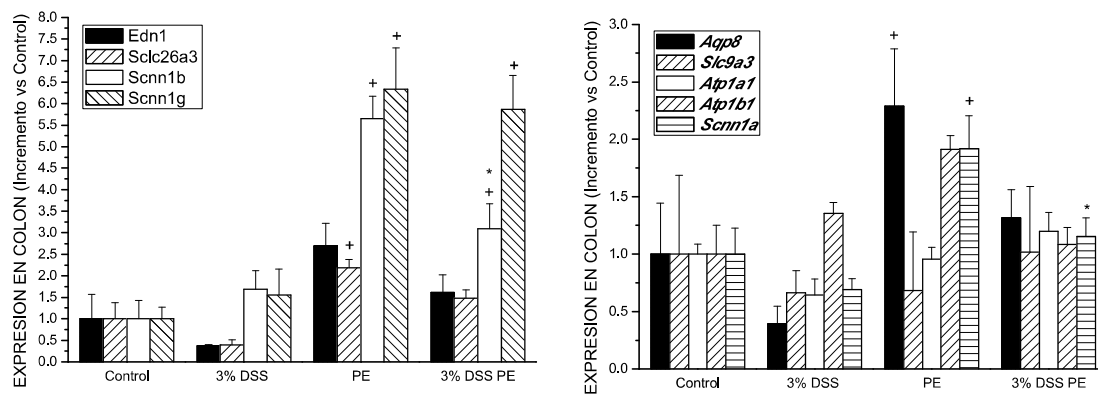
La inducción de colitis por DSS en animales normales dio lugar a un descenso de la concentración sérica de albúmina (significativo) y proteínas totales (no significativo). Curiosamente se apreció la misma tendencia en animales en pseudoesterilidad, con o sin DSS que fue significativo para la albúmina en ratones PE sin DSS. Asimismo, se verificó una tendencia similar a la hiperpotasemia como consecuencia de la pseudoesterilidad o el tratamiento

con DSS (no significativa). Por el contrario, los niveles de cloro y sodio no fueron modificados en absoluto (Fig 57).



**Figura 57** Concentración de iones y proteínas en suero en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones pseudo estériles. (A) Concentración sérica de albúmina y proteínas totales, (B) concentración sérica de potasio y (C) concentración sérica de sodio y cloro. Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=4-7). <sup>+</sup>p<0,05 vs grupo control; \*p<0,05 vs grupo PE.

Finalmente, el estudio de los transportadores en colon confirmó la inducción significativa de los genes que codifican las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de ENaC (*Scnn1a*, *Scnn1b* y *Scnn1g*), DRA (*Slc26a3*) y acuaporina 8 (*Aqp8*) como consecuencia de la depleción parcial de la microbiota. También se observó un incremento no significativo en *end1*. La administración de DSS causó efectos similares en ratones control y pseudo estériles, reduciendo la expresión de *Scnn1a* ( $\alpha$ ENaC), *Slc26a3* (DRA), *Aqp8* y *end1* en ambos grupos, si bien de forma generalmente no significativa. Merece la pena destacar el efecto diferencial de DSS sobre *Scnn1b* ( $\beta$  ENaC), cuya expresión se encuentra incrementada de forma no significativa en ratones convencionales pero es inhibida en ratones pseudo estériles (Fig 58).



**Figura 58: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos en colon por RT-PCR en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones pseudo estériles.** Los datos han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n=4-7).  $^{\dagger}$ p<0,05 vs grupo control;  $^*$ p<0,05 vs grupo PE.

## **Discusión**



La presente tesis doctoral se enmarca en el contexto de un proyecto de investigación financiado por el MINECO cuyo objeto es la dilucidación de acciones no prebióticas de los oligosacáridos no digeribles. El perfil de esta línea de trabajo nos llevó precisamente a utilizar desde el principio un término alternativo a “prebióticos” para designar estos compuestos, en la medida en que se trata de dos tipos de acciones biológicas diferentes que no tienen por qué coincidir en el mismo agente. Nuestro objetivo principal en este sentido estaba dirigido a la investigación del papel de dichas acciones no prebióticas, esto es, independientes de la modulación de la microbiota bacteriana, en el efecto antiinflamatorio intestinal de los OND, dada la gran implicación de nuestro grupo en la investigación de la enfermedad inflamatoria intestinal, tanto desde el punto de vista farmacológico y nutricional como puramente fisiopatológico. En paralelo, consideramos un objetivo secundario relacionado con la posible modulación de la maduración intestinal. Ambos objetivos han sido abordados a distintos niveles.

El mecanismo por el cual los OND ejercen efectos prebióticos no está claro, aunque se cree que implica la utilización preferencial de oligosacáridos por bacterias beneficiosas para el organismo como bifidobacterias o lactobacilos, protegiendo así frente a infecciones y reduciendo la presencia de patógenos [352, 353]. Otro posible mecanismo consiste en el aumento de la secreción de bacteriocinas por los lactobacilos, lo que facilita el asentamiento e inhibe la invasión de cepas competidoras (incluyendo patógenos). La inhibición de patógenos puede producirse mediante mecanismos indirectos [354], aunque se han descrito propiedades antimicrobianas en varios oligosacáridos [16]. Los oligosacáridos que alcanzan el colon pueden impedir además la unión de las bacterias al epitelio mediante competición con los receptores de glicanos [21, 312].

Como se ha indicado anteriormente, se han descrito algunas acciones no prebióticas de algunos oligosacáridos, aunque los estudios al respecto son muy escasos. En este sentido, consideramos que los resultados descritos en la presente tesis doctoral son muy novedosos, y permiten afirmar sin lugar a dudas que los OND estudiados ejercen acciones en ausencia de microbiota o microorganismos en general. Por otra parte, los prebióticos pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas; por este motivo abordamos también el estudio del efecto de los OND sobre el crecimiento y citotoxicidad de una bacteria sumamente relevante desde el punto de vista clínico como es

*Pseudomonas aeruginosa*. Este estudio es resultado de una colaboración estrecha con un grupo de investigación especializado en bacteriología, y concretamente en esta especie, liderado en este caso por el Dr. Abdelali Daddaoua, dentro del grupo del Dr. Juan Luis Ramos, en el CSIC. Así, nuestros resultados muestran que FOS, uno de los OND más empleados, tiene efectos específicos sobre *P. aeruginosa* PAO1, inhibiendo su crecimiento, su motilidad y la formación de biopelículas. Es interesante destacar que FOS e inulina afectaron de forma opuesta a la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*, teniendo el primero efectos inhibidores y la segunda estimulantes. El efecto de FOS fue retardado, ya que se observó únicamente pasadas 6 horas, lo que sugiere que interfiere en las últimas etapas de formación, o bien que induce la dispersión de la biopelícula ya formada. El efecto de FOS puede estar relacionado, al menos en parte, con la inhibición de la motilidad de tipo *twitching*, dada la implicación de esta en la formación de biopelículas [132].

El tratamiento con FOS se tradujo asimismo en una menor estimulación/citotoxicidad en macrófagos primarios de rata y en células IEC18 infectadas con *P. aeruginosa*. Estos efectos también se observaron con la inulina, pero en general la magnitud de los efectos de FOS fue mayor. Teniendo en cuenta la estructura química de ambos OND, esto indica que la actividad biológica está relacionada con la longitud de la cadena. El efecto es también dependiente de la concentración, puesto que a 10 mg/ml tanto FOS como inulina pueden ser empleados por *P. aeruginosa* como fuente de carbono y energía, estimulando el crecimiento bacteriano. Por el contrario, a 20 mg/ml la inulina tiene un efecto muy modesto sobre el crecimiento que contrasta con la inhibición significativa observada con FOS. Asimismo, se trata de un efecto específico de FOS/inulina, dado que los OSLC no produjeron inhibición alguna en las mismas condiciones experimentales.

El efecto preferente de FOS frente a inulina se observó también en la respuesta de los monocitos de rata a la infección con *P. aeruginosa*. Esta implica un aumento en la liberación de citoquinas dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B y la translocación al núcleo de p65. El tratamiento con FOS atenuó de forma significativa todos los pasos de esta respuesta (secreción de IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$ , fosforilación de I $\kappa$ B y translocación al núcleo de p65), mientras que la inulina tuvo un efecto más moderado. En ausencia de bacterias no se observaron efectos de FOS ni de inulina, lo que se debe con toda probabilidad al corto período de seguimiento, ya que en un estudio paralelo, nuestro grupo de

investigación ha puesto de manifiesto que ambos OND estimulan la producción de citoquinas en monocitos, incrementando el estado de activación de NF- $\kappa$ B, efecto contrario al observado en monocitos infectados con *P.aeruginosa*[355]. Este mismo efecto se observa, como sabemos, en enterocitos, y parece implicar la participación de TLR4. Es posible que esta circunstancia explique la no inhibición de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  por la inulina en el presente estudio, dado que la tendencia directa de esta es a activarla. Es posible por tanto que el efecto inhibitorio de la inulina sobre la secreción de IL-6 se deba a la actuación sobre otras vías no estudiadas, como Akt, Tak1 u otras. En cualquier caso, el hecho de que la tendencia de ambos compuestos sea la contraria a la observada en presencia de *P. aeruginosa* sugiere que la inhibición de NF- $\kappa$ B es probablemente indirecta, es decir, debida a la atenuación del potencial estimulador de la bacteria más que a una acción sobre el propio monocito. Nuestros datos sugieren asimismo que las MAPK no están implicadas en este proceso.

Con objeto de determinar si FOS efectivamente disminuye la virulencia de *P. aeruginosa*, seleccionamos el gen *toxA*, que codifica la exotoxina A, un importante determinante de patogenicidad en esta especie bacteriana. Para llevar a cabo nuestro objetivo, utilizamos dos cepas mutantes deficientes en PtxS y PtxR. La expresión de *toxA* está correlacionada con la estimulación de la producción de citoquinas inducida por las cepas PtxS y PtxR. Así, se observó una mayor secreción de citoquinas y de exotoxina A con el mutante PtxS, seguido por la bacteria control y finalmente por el mutante PtxR [356]. Nuestros datos demuestran la capacidad de FOS de ejercer sus efectos moduladores incluso en el mutante más virulento, PtxS. FOS disminuyó la virulencia de las 3 cepas diferentes de *P. aeruginosa*, lo que es indicativo de un amplio espectro de actuación en este sentido. El efecto de la inulina fue mayor en este mutante que en la cepa control, pero siempre menor que el de FOS. A su vez, nuestros datos sugieren que FOS podría actuar mediante la modulación de la expresión o del transporte de la exotoxina. Con el fin de verificar este extremo, utilizamos células epiteliales intestinales (IEC18), las cuales permiten eliminar los restos de bacterias por medio de lavados sucesivos más fácilmente que en cultivos en suspensión, confirmándose que FOS, pero no la inulina, reduce la cantidad de exotoxina A presente en las células infectadas.

La variedad de procesos celulares modulados por FOS fue un hallazgo ciertamente sorprendente. Es posible que estos efectos impliquen la interacción con receptores de glicósidos, señalizando a través de diferentes cascadas y

modulando en último término distintos procesos celulares. Este mecanismo sería comparable al de otros glicósidos antimicrobianos [357]. Globalmente, nuestros resultados indican la capacidad de FOS para reducir la patogenicidad de *P. aeruginosa in vitro* de forma específica y actuando a varios niveles. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que infecta a individuos inmunocomprometidos en diferentes zonas, como el tracto respiratorio, intestino, piel, tracto urinario y heridas. La gravedad de la infección depende de los factores de virulencia expresados por la bacteria que afectan a la citotoxicidad y la resistencia a antibióticos. Como resultado, las infecciones con *P. aeruginosa* son generalmente difíciles de tratar. Algunas clases de antibióticos, como cefalosporinas, penicilinas, carbapenems, quinolonas y aminoglicósidos se han utilizado para combatir *P. aeruginosa*, aunque se requieren tests de sensibilidad específica [358]. Nuestros datos sugieren que FOS podría ser útil para combatir infecciones de *P. aeruginosa* como componente de una mezcla de antibióticos. También podría emplearse vía oral como profiláctico con el objetivo de prevenir infecciones gastrointestinales. De hecho, FOS se emplea como suplemento para prevenir dichas infecciones de forma genérica [359]. Sin embargo, cualquier aplicación clínica requerirá un estudio más exhaustivo del efecto de FOS en humanos.

Como se ha indicado anteriormente, además de tener efectos sustanciales sobre bacterias, los OND son capaces de modificar el comportamiento de células eucariotas. Teniendo en cuenta que se trata de moléculas de peso molecular elevado que por definición no son objeto de hidrólisis significativa en ausencia de bacterias, los OND están en contacto con la barrera epitelial a lo largo del tubo digestivo hasta llegar al colon, donde finalmente son metabolizados. En consecuencia, las células epiteliales son las células de nuestro organismo que gozan de una mayor exposición de forma natural a los OND ingeridos. Además, estas acciones no se limitan al colon, dado que TLR4, que como veremos desempeña un papel importante en el efecto de los OND, también se expresa en intestino delgado y posiblemente con una mejor oportunidad para interactuar con estos, dada su expresión apical [94]. Por esta razón abordamos el estudio de los efectos de estos compuestos sobre líneas celulares de epitelio intestinal. El uso de líneas celulares es inevitable en este caso debido a la dificultad que presenta el cultivo de enterocitos primarios.

Nuestros datos demuestran que los prebióticos estudiados, concretamente FOS, GOS, OSLC e inulina, inducen la secreción de citoquinas

proinflamatorias en células epiteliales intestinales. Usando IEC18 como modelo principal *in vitro*, los OND incrementaron la producción de NHE3, GRO $\alpha$ , y MIP2, mientras que IL-6, eotaxina, CXCL10 y RANTES no se vieron afectadas. EL efecto sobre MCP1 y GRO $\alpha$  fue dependiente principalmente de TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B y secundariamente de MAPK. Nos planteamos que los OND podrían actuar como ligandos de TLR4 basándonos en el hecho de que su agonista canónico, el LPS, posee una parte glucídica en su estructura. De hecho, TLR4 puede ser activado por otros compuestos además del LPS, incluyendo proteínas de choque térmico, sulfato de heparina y otros componentes de la matriz extracelular, y la calprotectina [360, 361], lo que indica una gran variedad de estructuras aceptadas como ligando por parte del receptor. Cabe destacar que los efectos de LPS y OND en células IEC18 no fueron equivalentes, aunque en ambos casos se produce inmunoestimulación. Así, el LPS indujo la secreción de ICAM, IL-6, CXCL10 o RANTES, además de NHE3, GRO $\alpha$  y MIP2, y se comportó en general como un estímulo más eficiente. Del mismo modo, RANTES fue la citoquina que presentó un mayor efecto del LPS, mientras que no resultó afectada en absoluto por los OND. Por tanto, existe un solapamiento sustancial entre ambos estímulos, pero con efectos diferentes. Sin embargo, en los dos casos se produjo una inhibición drástica tras el silenciamiento genético de TLR4 y MyD88 en células IEC18, así como en ratones con delección génica de TLR4. Hubo asimismo una buena correlación entre la respuesta a los OND y la expresión de TLR4 en células epiteliales intestinales *in vitro*. Por tanto, es probable que el TLR4 sea la principal diana de los OND en IEC. Esta hipótesis es coherente asimismo con los resultados correspondientes a la interacción entre OND y LPS cuando son co-administrados a células IEC18. Así FOS, el OND con menor efecto sobre la producción de citoquinas, potenció la respuesta al LPS, mientras que el resto de OND la inhibió. Este comportamiento es típico de la tolerancia a la estimulación que se produce en los TLR y otros receptores, en virtud de la cual la estimulación previa del receptor reduce la respuesta al estímulo, aunque en este experimento en concreto el tiempo de pre tratamiento fue bastante corto (60 min). El hecho de que FOS no llegue a inducir tolerancia es coherente con su menor efecto global.

Es importante recordar que, dado que las células Caco-2 y T84 apenas expresan TLR4, y que no realizamos experimentos de silenciamiento del receptor en las células HT29, es posible que la importancia de la activación de TLR4 sea diferente en roedores y humanos.

Según nuestros datos, todos los OND actúan como ligandos agonistas del TLR4, pero la eficacia tiende a ser mayor conforme la estructura se vuelve más compleja (inulina con respecto a FOS y OSLC con respecto al resto de OND). En un estudio reciente, una preparación de 3-sialil lactosa y fructooligosacáridos inhibió la respuesta inmunológica en células Caco-2 actuando teóricamente a través del receptor PGlyRP3 [362]. Sin embargo, los OND mantuvieron su capacidad inhibidora después del silenciamiento de PGlyRP3, dificultando la interpretación de estos resultados.

Las consecuencias biológicas de la activación de TLR4 mediada por los OND u otros agonistas son controvertidas. En principio, la activación de TLR4 produce señales proinflamatorias que incluyen la producción de citoquinas, la captación de micropartículas por las células M, la fagocitosis y la proliferación celular. Dado que el epitelio intestinal está expuesto constantemente a bacterias y a sus componentes en la membrana apical, cabría esperar que la activación continua de TLR4 produjera inflamación. Sin embargo, es notorio que este no es el caso, sino que se establece un equilibrio homeostático entre la microbiota y el organismo mediante mecanismos no del todo conocidos, que incluyen la limitación de la expresión de los TLR en condiciones no inflamatorias y la existencia de señales inhibitoras como Tollip [17]. Así, la expresión de TLR4 está incrementada en pacientes con EC, y se ha descrito también un cambio de expresión predominante en la membrana apical en condiciones inflamatorias [94]. Se ha constatado que, en ratones, la delección específica de TLR4, MyD88 o NEMO en IEC o en células no hematopoyéticas da lugar a un debilitamiento de la respuesta a la infección bacteriana y/o de la respuesta inflamatoria [18-20]. Por tanto, la evidencia disponible apunta a que el TLR4 desempeña un papel importante en la función de barrera de la mucosa intestinal.

Independientemente de lo indicado hasta el momento, es incuestionable que la administración oral de OND resulta beneficiosa en modelos experimentales de inflamación intestinal [16, 363, 364]. Por tanto, la activación de TLR4 producida por estos compuestos no produce una respuesta inflamatoria *in vivo*. Existen precedentes de este efecto paradójico en inflamación intestinal. Por ejemplo, la administración del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) protege en la colitis experimental actuando sobre mecanismos de la inmunidad innata [365]. Además los ratones con delección génica de GM-CSF son más susceptibles a la colitis inducida [366]. Otros estudios demuestran que la falta de GRO $\alpha$  o

neutrófilos y la señalización deficiente de TLR en IEC están asociados con una colitis más severa [17, 367, 368]. Estos datos sugieren que una función barrera debilitada puede desencadenar una respuesta inflamatoria. Los OND podrían por tanto actuar reforzando la función barrera *in vivo*.

Nuestro grupo de investigación es el primero que ha descrito que los OND pueden actuar como ligandos de TLR4, tanto en células epiteliales intestinales, como en monocitos/macrófagos [355]. Esta acción no excluye que los OND puedan ejercer otras acciones no prebióticas que puedan ser igual o incluso más relevantes biológicamente, particularmente en cuanto a la función intestinal.

Los experimentos *in vitro* discutidos hasta el momento son útiles en la medida en que permiten demostrar de manera incontrovertible la existencia de acciones no prebióticas de los OND, a la vez que posibilitan la exploración mecanística de las mismas, pero por el contrario, tienen la limitación inherente a este modelo experimental, es decir, el carácter incierto de la extrapolación de los resultados al animal *in vivo*. En otras palabras, dado que los OND siempre van a ejercer sus acciones prebióticas, ¿cómo calibrar la importancia de las acciones no prebióticas? La respuesta lógica es que sólo es posible eliminando el componente prebiótico, es decir, examinando el efecto de los OND *in vivo* en animales desprovistos de microbiota. Aunque la cría de animales en completa esterilidad es técnicamente sencilla, y su estudio se remonta a los años 50, existen muy pocos laboratorios que cuenten con este sistema en Europa. En nuestro caso optamos por utilizar las instalaciones del Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia), a través de nuestra colaboración con el Dr. Carrero. Este laboratorio utiliza exclusivamente ratones NMRI, que por tanto usamos para todos los estudios en condiciones estériles, así como para sus estudios control en condiciones convencionales. Para la realización de experimentos en condiciones libres de gérmenes, se emplean incubadores estériles en los que se mantienen los ratones y se introduce el material necesario para el desarrollo del experimento (dieta, instrumental, etc). Estas condiciones hacen que la posibilidad de manipulación de los animales esté restringida, por lo que optamos por introducir los OND como suplemento dietético. Se eligieron FOS y GOS por ser los OND más utilizados, principalmente en fórmulas infantiles. Teniendo en cuenta antecedentes bibliográficos, seleccionamos la concentración de 5% (p/p).

El plan de trabajo contemplaba originalmente dos estudios en condiciones libres de gérmenes. El primero de ellos estaba dirigido a estudiar el efecto de FOS y GOS en ratones al destete, con objeto de verificar su posible efecto sobre la maduración intestinal. Esta hipótesis estaba basada en buena medida en la presencia de OND en la leche materna de diversas especies, incluida la humana, lo que sugiere que estos compuestos podrían contribuir a los procesos de maduración y defensa intestinal en el recién nacido. Este primer estudio tenía un diseño sencillo y no planteaba problemas significativos *a priori*. Por el contrario, el segundo estudio, cuyo objeto era la evaluación del efecto antiinflamatorio intestinal de los OND en ratones adultos con colitis experimental en ausencia de microbiota, planteaba un problema de consideración, ya que la inflamación intestinal depende en buena medida de la presencia de la microbiota, tanto en el hombre como en animales de experimentación [369-372], de forma que la realización de este experimento dependía de la posibilidad de inducir una respuesta inflamatoria suficiente en los animales libres de gérmenes. Se seleccionó en principio el modelo de colitis por DSS porque había estudios según los cuales la inflamación no sólo se producía de forma efectiva, sino que de hecho era más intensa que en animales convencionales [373], aunque había datos contradictorios en este sentido [374]. En vista de la ausencia de una evidencia sólida en cuanto al potencial colitogénico del DSS en los animales libres de gérmenes, decidimos llevar a cabo un ensayo preliminar con ratones NMRI libres de gérmenes expuestos a 3 dosis distintas de DSS.

Ya que nuestro objetivo era observar el efecto independiente de los efectos prebióticos, creímos interesante introducir grupos de animales a los que se adicionó un homogenado de bacterias estéril. De este modo intentamos mimetizar hasta cierto punto los efectos de la interacción de los OND con antígenos de la microbiota, a la vez que se evitaban los efectos sobre el crecimiento bacteriano y sobre la producción de sustancias por las bacterias como los ácidos grasos de cadena corta o bacteriocinas. Tanto en la obtención del HBE como la preparación de las dietas se prestó especial atención al mantenimiento de la estructura de los compuestos integrantes. Con esta finalidad, se sonicaron los homogenados y se liofilizaron hasta su utilización. En cuanto a las dietas, la esterilización se llevó a cabo por irradiación.

Como se ha indicado anteriormente, se aplicó una doble metodología a la evaluación de los ratones libres de gérmenes al destete; por una parte, se



examinaron parámetros predefinidos, relacionados con el tamaño de los órganos de interés, histología, actividades enzimáticas, inmunoglobulinas, etc., y, por otra, se realizó un análisis del transcriptoma del colon y del yeyuno, el cual por su propia naturaleza es independiente de hipótesis previas de trabajo. Globalmente considerados, nuestros resultados demuestran de forma incuestionable que FOS, GOS y el HBE afectan a los ratones tratados en condiciones estériles, lo que constituye una evidencia de acciones no prebióticas de estos oligosacáridos *in vivo*. Este hallazgo es de gran importancia dada la escasa bibliografía al respecto; en concreto, en estudios anteriores se ha puesto de manifiesto que altas dosis (40 g/kg) de GOS afectan a la distribución de la producción de mucus en el colon de ratas libres de gérmenes, pero no otros parámetros [375]. El efecto de los tres tratamientos fue sin embargo sumamente complejo, y no encaja en una categorización sencilla, como veremos a continuación.

Como se ha comentado en la introducción de esta Tesis Doctoral, se ha descrito una serie de alteraciones fisiológicas en animales criados en esterilidad que incluyen cambios en la longevidad, alteraciones en la inmunidad intestinal, en el metabolismo, en la función intestinal...[13]. En nuestro caso observamos un incremento en el peso relativo del ciego (aunque no alcanzó carácter significativo), heces más blandas, y un incremento del peso del duodeno y del yeyuno, sin cambios en la longitud, en los ratones libres de gérmenes. A diferencia de otros estudios, el tamaño relativo del hígado no se vio afectado en absoluto [376, 377]. La reducción del tamaño del hígado en animales libres de gérmenes se ha asociado a los menores requerimientos de detoxificación de amonio y otras sustancias provenientes de la microbiota ([377, 378] [379, 380]).

En cuanto a la maduración intestinal, se observó un incremento en la actividad fosfatasa alcalina en todos los segmentos intestinales, a excepción del colon. Se detectaron además incrementos de las actividades leucinaminopeptidasa y maltasa/sacarasa en el intestino delgado, pero no de forma consistente. Varios estudios ponen de manifiesto el aumento en la actividad de distintas enzimas del borde en cepillo en animales libres de gérmenes [381-385]. El incremento de enzimas disacaridasas ha sido relacionado con un menor recambio epitelial, prolongándose el tiempo de permanencia del enterocito y aumentando en consecuencia su capacidad de maduración [14]. Esta observación es coherente asimismo con la mayor cantidad de proteínas presente en el intestino delgado de animales libres de

gérmenes en comparación con los criados en condiciones convencionales [382]. Este incremento de actividades enzimáticas no se encuentra uniformemente en animales libres de gérmenes [384, 385].

Nuestros resultados indican que los OND no ejercieron efectos claros sobre el peso o la longitud de distintos fragmentos intestinales o sobre el tamaño del ciego en ratones libres de gérmenes al destete alimentados con dietas que contenían GOS o FOS durante 4 semanas. En ratones convencionales tampoco se registraron apenas efectos del tratamiento, más allá de un incremento del peso del duodeno y del tamaño del ciego (significativos sólo en el caso de FOS). Sin embargo, la histología llevada a cabo en ratones libres de gérmenes indicó un efecto trófico de los OND sobre las vellosidades del yeyuno, que se correlacionó con un incremento de la ratio peso/longitud (FOS) y del contenido en proteína (no significativo para FOS). Un efecto comparable de GOS ha sido observado previamente en ratones convencionales [386]. Tanto FOS como GOS aumentaron el contenido en proteínas en el yeyuno de animales convencionales en nuestro estudio.

Como se ha indicado anteriormente, la ausencia de microbiota ralentiza la dinámica de reposición epitelial y favorece la maduración del enterocito, lo que se traduce en una mayor actividad de enzimas digestivas. GOS tuvo un efecto destacable en la actividad AP. Los efectos más notables en este sentido se manifestaron en el colon, observándose un incremento por la administración de GOS en ratones libres de gérmenes, mientras que se produjo una disminución moderada en ratones convencionales. En ambos casos los cambios se asociaron a una inhibición de la sensibilidad a levamisol. Este hecho resulta un tanto sorprendente, porque los colonocitos expresan predominantemente la isoforma no específica de tejido del subtipo hepático (TNAP-L) en condiciones normales y, dado que esta es la menos activa de las formas de AP, y que es resistente a la inhibición por levamisol, el incremento de la actividad específica suele asociarse a una mayor inhibición por este agente, al menos en situaciones de inflamación [387, 388]. En la colitis la actividad AP tisular aumenta tanto por un cambio de isoforma en el epitelio, con predominio de formas TNAP sensibles a levamisol (es decir, del tipo renal u óseo), como por la AP aportada por la infiltración neutrofílica (que es del mismo tipo). En nuestro caso, por el contrario, la menor sensibilidad al levamisol es coherente con un incremento de la expresión relativa de una o ambas isoformas resistentes, es decir, IAP y TNAP-L. Puesto que los ratones libres de gérmenes se caracterizan por una menor

infiltración leucocitaria, cabría esperar un origen fundamentalmente epitelial de la AP tisular, de forma que el incremento de actividad que se observa en ratones libres de gérmenes tratados con GOS podría deberse a la inducción de IAP/TNAP-L en los enterocitos. Esta explicación es especulativa, puesto que no se han llevado a cabo experimentos específicos de carácter confirmatorio. Por su parte, el efecto de FOS sobre la actividad AP es, en general, poco consistente.

A diferencia de la AP, no se encontraron efectos consistentes de FOS o GOS sobre las actividades LAP, sacarasa o maltasa tanto en ratones libres de gérmenes como en ratones convencionales. No obstante, un análisis más detallado de las actividades en yeyuno, que es la sección de intestino con mayor actividad enzimática específica, indica que FOS inhibió la actividad de estas tres enzimas en animales libres de gérmenes, mientras que incrementó las actividades sacarasa y LAP en animales convencionales. Del mismo modo, respecto a GOS, se observó una inhibición de la actividad sacarasa en animales libres de gérmenes y un incremento tanto de la actividad sacarasa como LAP en animales convencionales. Estos datos son difíciles de interpretar, pero parecen indicar un efecto divergente de ambos OND en ratones libres de gérmenes y ratones convencionales. Dada la acción trófica que FOS/GOS presentan en el yeyuno de animales libres de gérmenes, según comentamos con anterioridad, cabría esperar un aumento del recambio epitelial en este segmento intestinal y consecuentemente una menor capacidad de diferenciación, lo que es coherente con nuestros resultados. Es posible que existan asimismo mecanismos de carácter directo. En este sentido, se ha descrito el incremento de la actividad sacarasa por GOS, tanto en ratones convencionales como en células Caco-2, es decir, tanto en presencia como en ausencia de bacterias[386], mientras que el efecto de FOS sobre LAP en animales convencionales cuenta con un precedente asimismo en pollos [389]. Es interesante constatar además que GOS incrementó todas las actividades enzimáticas en el colon de ratones libres de gérmenes, pero no en los convencionales. Por otra parte, en un estudio anterior de nuestro grupo de investigación no obtuvimos datos que indicaran un efecto consistente de los OND sobre las actividades enzimáticas digestivas en células Caco-2, lo que contradice los resultados de Lefolestier y colaboradores [386]. Aunque el planteamiento inicial era que los OND podrían ser importantes en la maduración intestinal, ya que la fibra soluble, que constituye aproximadamente el 12% de los componentes de la leche humana, puede afectar a este proceso [22], es necesario indicar que estos componentes son mucho más complejos estructuralmente que GOS o FOS [390]. En consecuencia, nuestros datos son

coherentes globalmente con un efecto de estos OND sobre la maduración del epitelio intestinal, posiblemente relacionado con un mayor recambio celular.

En consonancia con la atrofia inmunológica de la mucosa ya mencionada, se ha descrito que los animales libres de gérmenes tienen niveles de IgA e IgG reducidos y, en general, un menor desarrollo inmunológico a nivel de mucosa [23]. Nuestros resultados no indican la existencia de efectos a este nivel de GOS, mientras que la administración de FOS a ratones libres de gérmenes disminuye la IgG sérica. Tanto FOS como GOS han mostrado cierta capacidad de modificar los niveles séricos de inmunoglobulinas de distinto tipo. Así, en niños con alto riesgo de alergia una combinación de GOS y FOS reduce los niveles de IgE, IgG1, IgG2 e IgG3 y en ratones expuestos a ovoalbúmina la suplementación dietética con FOS disminuye el nivel de anticuerpos específicos del tipo IgG1, mientras que una intervención similar con FOS potencia la respuesta de producción de IgG frente a *Salmonella* en ratones vacunados [24, 359, 391]. Estos estudios sugieren que el resultado global se ve influido decisivamente por las condiciones ambientales. Nuestros resultados demuestran que FOS modula los niveles de IgG sérica mediante un mecanismo independiente de la presencia de microbiota.

A nivel hepático, aunque no se observaron diferencias entre ratones libres de gérmenes y convencionales, se produjo una disminución en el peso relativo del hígado cuando se administraron ambos OND en ambas condiciones (que no llegó a ser significativo en el caso de animales convencionales que recibieron FOS). Se trata por tanto de un efecto muy consistente, a la vez que llamativo. Se ha descrito cómo FOS reduce el peso del hígado en ratones a los que se administró una dieta rica en grasas y en ratas Zucker obesas. En ambos casos, este descenso se asoció a una disminución en el contenido de triglicéridos en hígado [392, 393]. Sin embargo, en estos experimentos los animales partían de esteatosis hepática y a diferencia de estos, los ratones libres de gérmenes parecen tener una menor cantidad de triglicéridos en hígado que los ratones convencionales [394]. Por otro lado, el peso relativo del hígado se ha relacionado inversamente con la capacidad de metabolizar xenobióticos [376] lo que implicaría un aumento de dicha capacidad en ratones a los que se administró los OND. De hecho, Sugatani y colaboradores han descrito como la inulina es capaz de inhibir el fallo hepático inducido por xenobióticos en ratas [395]. Otros estudios sin embargo han mostrado una ausencia de efecto de FOS a este nivel [396] [397] [397] [398].

Por su parte, el tratamiento de ratones libres de gérmenes con el HBE indujo muy pocos cambios significativos en los parámetros morfológicos y bioquímicos estudiados. Concretamente, el HBE disminuyó el peso del colon (20 %) y la actividades LAP y sacarasa en yeyuno, e incrementó la actividad maltasa en colon. Estos datos contrastan marcadamente con los efectos observados cuando se combinó el HBE con FOS o GOS. En primer lugar, ambas combinaciones incrementaron el peso del ciego y disminuyeron el del hígado; cuando se comparan estos efectos con los de la adición de los OND por separado se constata que el efecto sobre el ciego es dependiente de HBE en animales libres de gérmenes, mientras que el del hígado no lo es. En animales convencionales FOS también aumentó el tamaño relativo del ciego. Diversos estudios muestran un aumento en el peso del ciego en ratones convencionales tratados con FOS, lo que se ha relacionado con un aumento de biomasa como consecuencia de la mayor fermentación en el ciego. También se ha atribuido al efecto trófico de los ácidos grasos de cadena corta producidos como consecuencia de la fermentación de FOS por la microbiota [399, 400]. Esto explicaría por qué no se observa este aumento al administrar FOS en animales libres de gérmenes, pero no el aumento al asociarlo al HBE. El aumento de tamaño del ciego en animales libres de gérmenes se ha relacionado con la acumulación de mucus como consecuencia del menor desgaste por la ausencia de bacterias. Nuestros datos indican que este HBE y los OND tienen efectos sinérgicos añadidos a esta tendencia basal de los ratones libres de gérmenes. Es posible que este hecho represente simplemente la presencia añadida de moléculas no absorbibles que produzcan retención de agua (FOS y GOS permanecen en forma polimérica en ausencia de microbiota, y al menos parte del HBE debe estar compuesto por moléculas de gran tamaño). En contra de este razonamiento está la baja dosis de HBE utilizada, 0,016% de suplemento dietético, que corresponde a ~0,5 mg por día asumiendo un consumo de unos 3 g de dieta. Aun suponiendo que la totalidad de este suplemento fuera no absorbible, el incremento de presión osmótica asociado a esta cantidad es probablemente muy pequeño para justificar la potenciación de este efecto. Por razones técnicas no hemos podido llevar a cabo un experimento que examine la capacidad funcional de transporte del ciego en función del tratamiento con OND±HBE en estas condiciones.

Por otra parte, se produjo una segunda interacción positiva entre HBE y FOS en cuanto al incremento de la longitud de yeyuno, íleon y colon, fundamentalmente. El efecto sobre la longitud de yeyuno se acompañó de una

tendencia a incrementar la longitud de las vellosidades y el contenido proteico. Asimismo, aunque el tratamiento con GOS+HBE no tuvo efecto sobre el peso o la longitud de ninguno de los fragmentos intestinales, sí se observó un incremento significativo de la longitud de las vellosidades y del contenido proteico en yeyuno. Estos datos apuntan a un posible efecto trófico de la combinación OND+HBE, pero no de forma consistente, dado que por ejemplo no se producen cambios en la ratio peso:longitud. Del mismo modo, el efecto del tratamiento combinado sobre las actividades enzimáticas epiteliales se alejó también de un perfil claramente definido. En concreto, la combinación GOS+HBE produjo un incremento de la actividad sacarasa en íleon y colon, mientras que la variante FOS+HBE produjo un efecto similar pero en duodeno y se observaron efectos dispares sobre las actividades fosfatasa alcalina y maltasa en los distintos fragmentos por la combinación de HBE y OND, y ningún efecto en absoluto sobre LAP. En cuanto a la actividad fosfatasa alcalina, los resultados fueron asimismo dispares, con un descenso en yeyuno de HBE+GOS y un incremento de HBE+FOS. Por tanto, nuestros resultados indican que el HBE tiene escasos efectos por sí solo pero que potencia algunos de los efectos de los OND.

Globalmente, nuestros resultados confirman la existencia de acciones no prebióticas de FOS y GOS *in vivo* y la capacidad de interacción con antígenos de la microbiota, pero sin distinguirse un patrón claro de la naturaleza de estas acciones. Este primer análisis se ve complementado por el correspondiente estudio del transcriptoma, utilizando *microarrays*. Este análisis se llevó a cabo de forma exhaustiva, en la medida en que se utilizó un dispositivo *microarray* por cada 3 muestras, y dos órganos por ratón, concretamente yeyuno y colon. Teniendo en cuenta el complejo diseño experimental, que comprende 6 grupos, el procesamiento de los datos generados resultó ser sumamente difícil. Cabe recordar en este sentido el escaso desarrollo que ha alcanzado la técnica estadística aplicada a la genómica, lo que impone muchas limitaciones a la hora de trabajar con resultados de este tipo, la principal de las cuales es posiblemente el hecho de que sólo se puedan analizar comparaciones por parejas. En nuestro caso, evaluamos por una parte las comparaciones entre GOS, FOS y HBE con el grupo LG control, por un lado, y las combinaciones OND+HBE con HBE. Como es habitual en nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo un análisis manual de las listas de genes modificados, y un análisis global a través de la plataforma Ingenuity, a la que tenemos acceso gracias a la Plataforma Andaluza de Bioinformática. De acuerdo con el protocolo seguido

habitualmente en estudios de carácter genómico [401, 402], hemos realizado una validación postgenómica en colon, por medio de la determinación por RT-PCR de un total de 16 genes. En general la validación arrojó un resultado positivo, observándose una buena correlación entre los resultados obtenidos por esta técnica y los obtenidos en los *microarrays*.

Los resultados obtenidos confirman el efecto directo, no prebiótico, de los tratamientos, dado que tanto los OND como el HBE o sus combinaciones modularon la expresión de cientos de genes, lo que constituye una respuesta relativamente modesta pero sin duda sustancial. FOS presentó el efecto más acusado en el yeyuno, mientras que en el colon el efecto principal fue del HBE. En ambos casos quedó de manifiesto la potenciación del efecto de las combinaciones OND+HBE frente al HBE, excepto en el caso de GOS+HBE en yeyuno, lo que concuerda con los datos expuestos anteriormente. Desde el punto de vista de la genómica funcional, el análisis a través de Ingenuity mostró similitudes sustanciales, de forma que se identificaron funciones moleculares moduladas significativamente por los 3 tratamientos que resultaron en buena medida coincidentes. Es el caso del transporte molecular, el crecimiento y proliferación celular, el movimiento celular, y el metabolismo lipídico, por citar los más destacables. En lo que respecta a este último, en el yeyuno el HBE indujo cambios de expresión consistentes con una disminución de la absorción, síntesis y metabolismo de ácidos grasos, mientras que FOS y GOS presentaron el efecto opuesto. En el colon el resultado global no estaba claro, pero en general se registró una disminución en la expresión de genes que codifican distintas apoproteínas, incluyendo APOB, APOC2 y APOC3 (ver más adelante).

Existen algunos precedentes de estudios de este tipo con OND. Rodenburg y colaboradores estudiaron el efecto de FOS sobre el transcriptoma colónico en ratas convencionales [403]. Sus datos apuntan a alteraciones en el metabolismo energético, especialmente a nivel mitocondrial, con un total de 997 genes afectados. Por su parte, en un estudio similar llevado a cabo en el íleon de ratón, Fukasawa y colaboradores detectaron cambios de carácter fundamentalmente inmunomodulador [404], que se producen fuera de las placas de Peyer, es decir, en la lámina propia normal. Nuestros resultados, que obviamente son mucho más amplios, son hasta cierto punto comparables con el primero de estos estudios, mientras que no hemos podido constatar cambios reseñables en lo que respecta a la regulación del sistema inmunológico.

Como se ha comentado, la ausencia de microbiota tiene un impacto determinante sobre la dinámica del epitelio intestinal, que podría ser modificada por los OND o por el HBE; nuestro análisis genómico indica que los tratamientos estudiados afectan sustancialmente a los procesos de crecimiento y proliferación celular y de movimiento celular (las listas de genes que definen cada función no son excluyentes entre sí, sino que se solapan), lo que en principio apoya la hipótesis de que los OND y HBE efectivamente tienen un efecto en este sentido. Es importante recordar que los resultados corresponden al transcriptoma global y por tanto no son de ningún modo específicos del epitelio. Así, en el yeyuno HBE y FOS produjeron cambios consistentes con una disminución del movimiento de leucocitos, mientras que en el colon FOS y FOS+HBE se asociaron al efecto contrario. Sin embargo, la existencia de efectos significativos sobre las enzimas digestivas epiteliales, aunque no sencillos, son coherentes con un cierto efecto sobre la proliferación epitelial. La propia complejidad de los efectos observados sugiere que los estímulos luminales ensayados pueden ejercer acciones paralelas distintas, por ejemplo un incremento de la proliferación acompañado de acciones específicas sobre determinados marcadores de diferenciación, como sugieren los escasos datos disponibles *in vitro* a los que aludimos anteriormente [386].

Por otra parte, el único gen inducido por ambos OND y por el HBE, *Prrx1*, codifica una proteína que parece comportarse como un coactivador transcripcional que potencia la actividad del factor de respuesta sérica y que posiblemente está implicado en la respuesta de otros factores con efectos sobre la diferenciación y proliferación celular, tanto a nivel embrionario como postembrionario. Por ejemplo, se ha descrito que este gen inhibe la diferenciación de adipocitos a través de la vía de TGF- $\beta$  y que desempeña un papel importante en la regeneración del páncreas, así como en la carcinogénesis en este órgano [405, 406]. En el intestino, *Prrx1* ha sido implicado igualmente en el cáncer colorrectal, concretamente en la transición epitelial-mesenquimal, aunque su función en el intestino normal no está bien definida [407, 408]. Por tanto, aunque nuestra interpretación de la inducción común de este gen es necesariamente especulativa, es muy posible que este efecto esté relacionado con la modulación de la proliferación y diferenciación celular en ratones libres de gérmenes tratados con OND y HBE.

Por último, tanto el análisis global mediante la plataforma Ingenuity como nuestro propio análisis manual, indicó la presencia de cambios relevantes



a nivel de transporte. En este sentido, teniendo en cuenta este hecho y el posible efecto de los tratamientos aplicados sobre la función de barrera intestinal y su posible impacto en su efecto antiinflamatorio intestinal, decidimos llevar a cabo un estudio pormenorizado de genes que regulan dicha función de barrera y la defensa frente a agentes patógenos. Efectivamente, un estudio pormenorizado de genes alterados en los *microarrays* por por el HBE y los OND mostró alteraciones en la expresión de genes relacionados con el transporte lipídico (apolipoproteínas), el metabolismo del glutatión, la función de barrera y la defensa frente a agentes patógenos (Fig 32-33). En general es muy interesante observar la oposición directa que se observa entre los efectos del HBE y el de los OND. Así, mientras la administración en la dieta de HBE inhibe la expresión de lipoproteínas , defensinas, genes relacionados con las *uniones estrechas* o lisozima, la adición de FOS o GOS a esta dieta induce la expresión de estos genes. En este sentido, los datos de los *microarrays* indican un efecto inhibitorio (o nulo) del HBE sobre distintas lipoproteínas, mientras que los oligosacáridos, y especialmente la combinación de HBE con oligosacáridos, ejercieron el efecto contrario, incrementando su expresión. Como se ha comentado anteriormente, nuestros datos indican que los oligosacáridos pueden ejercer efectos complejos sobre la diferenciación celular en el intestino, particularmente en el yeyuno, y en este sentido es interesante resaltar que diversos estudios en células Caco-2 han puesto de manifiesto que la expresión de lipoproteínas (APOA1, APOC2, APOC3, APOH y APOM) es proporcional a su diferenciación [409, 410], y de hecho ApoA1 ha sido propuesta como marcador de diferenciación [411, 412]. Mención especial merece la fuerte inducción de *Apoa2* por FOS en yeyuno (FC=51,57). Se ha descrito que esta apoproteína se expresa principalmente en el hígado y que entra a formar parte de las partículas HDL. Los defectos en la ApoA2 inducen hipercolesterolemia y por tanto *Apoa2* puede tener una función ateroprotectora [413]; por otra parte, su sobreexpresión induce hipertrigliceridemia postprandial y disminución de las HDL circulantes[414].

En cuanto al colon, es interesante constatar que el HBE inhibió la expresión de *Apoc3*, *c2* y *b*, mientras que la combinación con FOS o GOS contrarrestó este efecto, incrementando de hecho su expresión junto con la de *Apoa1*. Tanto FOS como GOS indujeron individualmente asimismo la expresión de *Apoc2* y *c3*. Aunque prácticamente no hay estudios en los que se haya caracterizado la expresión de apoproteínas en colon, sí se ha descrito que *Apoa1*, *b* y *c3* son las lipoproteínas más expresadas en el intestino [415]. Se ha

descrito que las dietas ricas en fibra inhiben la expresión de *Apoa1* en yeyuno e íleon y de *Apob* en íleon en animales convencionales[416-418]. Nuestros resultados en ratones libres de gérmenes contradicen por tanto estos resultados. Esto puede ser debido a la ausencia de microbiota, al tipo de fibra o al hecho de que en estos estudios se utilizan mayores cantidades de fibra en la dieta (usan un 10%).

Como se ha indicado anteriormente, la expresión de genes relacionados con el metabolismo del glutatión se vio alterada en nuestro estudio. Al igual que en el caso de las apoproteínas, la expresión de estos genes se afectó de manera diferencial (sobre todo en el colon) por la administración de HBE y de OND+HBE. Por ejemplo, el HBE incrementó la expresión en colon de *Gpx2*, la isoforma gastrointestinal de la glutatión peroxidasa, mientras que la adición de FOS o GOS a esta dieta contrarrestó este efecto. Aunque hay estudios que no muestran diferencias entre animales convencionales y libres de gérmenes en la expresión de *Gpx2* [419], varios estudios han puesto de manifiesto que la introducción de microbiota en animales libres de gérmenes induce la expresión de *Gpx2* [420, 421]. Este incremento se ha explicado como el resultado de una respuesta inflamatoria a la introducción de la microbiota [421], aunque posiblemente cabe hablar más de maduración inmunológica que de inflamación propiamente dicha.

En un estudio en el que se caracterizó la expresión de enzimas en animales libres de gérmenes y convencionales, se observó una mayor expresión de *Gsta1/2* en el colon de animales libres de gérmenes [419], lo que nuevamente se ha interpretado como parte de una respuesta inflamatoria de adaptación a la presencia de bacterias. Aunque no se incluyeron muestras de animales convencionales en este caso, nuestros resultados muestran que la administración del HBE disminuye la expresión de *Gsta1* y no varía la de *Gsta2*, de forma que parecen divergir sustancialmente de los anteriores

Por lo demás, existe cierta consistencia en los efectos de los OND, en el sentido de que se puede constatar una tendencia a la inducción de *Gst* (que es específica porque varía en función del oligosacárido considerado) y a la represión de *Gpx2*. Se ha descrito que FOS presenta un efecto compatible con un aumento de la protección antioxidante en el colon, aunque presumiblemente a través de mecanismos dependientes de la microbiota[396]. Un efecto comparable ha sido descrito a nivel de íleon [422]. Como vemos,

apenas hay precedentes de nuestros datos, que representan por tanto un avance sustancial en este campo.

Un aspecto importante y novedoso en la relación de la microbiota con su hospedador es el relacionado con la función de barrera del intestino. Observamos inicialmente a partir de los datos de genómica que la administración del HBE y de OND modificaba la expresión de genes relacionados con la defensa frente a bacterias (péptidos antibacterianos) y con el mantenimiento de la permeabilidad intestinal (claudinas, ocludinas, etc.). De los resultados obtenidos con *microarrays* es interesante destacar las diferencias que se observan entre yeyuno y colon en la expresión de genes relacionados con la respuesta frente a bacterias (defensinas y moléculas relacionadas) (Fig 33). Así, mientras que en yeyuno las mayores diferencias se observan en presencia de FOS o del HBE por separado (la adición de oligosacáridos a la dieta con HBE no contrarresta o modifica los efectos de HBE), en el caso del colon no se observan diferencias reseñables cuando se administran los OND solos, y además la adición de estos a la dieta que contenía HBE tiende a anular los efectos de este (Fig 33A-B). Este efecto se puede observar también en colon en cuanto a la expresión de genes como *Cldn4*, *Cldn5*, *Aqp8*, *Tnf*, *Cxcl10* o *Efna1* (Fig 33C). Es posible que estas diferencias puedan estar relacionadas con la presencia de una microbiota mucho más densa en el colon, en el que por tanto es normal la coexistencia de bacterias y oligosacáridos, en tanto que en intestino delgado la cantidad de bacterias presentes es mucho menor, aunque sigue siendo significativa.

Se estudió la expresión en colon de una selección de estos genes mediante RT-PCR tanto en ratones convencionales como en libres de gérmenes. La primera observación relevante es que en los ratones libres de gérmenes la expresión de todos los genes seleccionados, con la notable excepción de *Reg3g*, es mayor que en ratones convencionales (Fig 35). Por tanto, la ausencia de microbiota estimula la expresión de genes relacionados con la producción de péptidos antibacterianos y con la función de barrera, lo que sin duda constituye una respuesta paradójica, dado que *a priori* cabría esperar una relación directa entre la presencia luminal de bacterias y la expresión de proteínas dirigida a controlar a dichas bacterias, como ocurre precisamente con *Reg3g*. De hecho, en un estudio realizado en ratones convencionales se observó que la administración de antibióticos inhibe la expresión de *Reg3g* y también de *Pl2g2a* y *Ang4* en colon[27] . Análogamente, Larsson y colaboradores.

estudiaron la expresión de *Reg3g* en animales convencionales y libres de gérmenes y observaron que hay más en los primeros (4,2 veces) que en condiciones libres de gérmenes [423].

Por su parte, el efecto de los OND en la función de barrera es controvertido. En humanos, la suplementación dietética con inulina la potencia, disminuyendo la permeabilidad a lactulosa [25], mientras que GOS reduce el aumento de permeabilidad producido por la pancreatitis aguda en ratas [26]. Los OND (polidextrosa y goma de agar) también reducen la translocación bacteriana en ratones [424]. Sin embargo, el efecto de FOS parece ser el contrario, es decir, un incremento de la translocación [425]. En un estudio llevado a cabo con *microarrays* no se halló correlación con genes relacionados con la función de barrera [403]. Los autores propusieron que el origen de este fenómeno se encontraba por el contrario en alteraciones en el metabolismo de la mucosa, lo que como sabemos es coherente con nuestros propios resultados. En todo caso, este incremento no parece producirse en humanos [426] pues FOS no afecta a la permeabilidad intestinal en pacientes quemados [427]. Nuestros resultados muestran incrementos en la expresión de *cln4* y, en menor medida, *cln5*, en el colon de ratones libres de gérmenes y convencionales tratados con FOS, aunque GOS presentó una tendencia similar. Estos cambios son consistentes en principio con una menor permeabilidad. Otro efecto destacable de GOS y FOS fue el incremento de expresión de *Cxcl10* y *Reg3g* en el colon, tanto en ratones libres de gérmenes como convencionales. CXCL10 es una quimioquina implicada en la atracción de diversos tipos celulares, incluyendo monocitos y linfocitos T, mientras que *Reg3g* es una lectina antibacteriana que participa en la defensa epitelial. Por tanto, se trata de efectos plenamente compatibles con una potenciación de la función de barrera. En vista de los resultados obtenidos en enterocitos *in vitro*, es tentador considerar la posibilidad de que estos genes puedan ser regulados de forma directa por FOS/GOS a través de la vía NF- $\kappa$ B. CXCL10 formaba parte del multiplex utilizado para evaluar la respuesta de las células IEC18 a OND, donde se observó un efecto positivo pero sólo en el caso de los OSLC. En consecuencia, no tenemos datos que confirmen el efecto de FOS/GOS, pero consideramos muy posible que pueda ser verificado mediante medición estándar con ELISA, que es presumiblemente más sensible.

En suma, hemos demostrado que los OND presentan acciones no prebióticas biológicamente relevantes a nivel del tracto gastrointestinal. Estas

acciones implican al menos parcialmente cambios en el comportamiento del epitelio y son de naturaleza compleja. Además, parece existir una interacción significativa entre dichas acciones y componentes normales de la microbiota. Entre las acciones de los OND en intestino podemos destacar una alteración del crecimiento y la proliferación celular, del metabolismo lipídico un aumento de la función barrera así como la modulación de la expresión de distintas enzimas implicadas en procesos de detoxificación.

Por otra parte, el efecto predominante del HBE sobre el transporte despertó nuestro interés puesto que nuestro grupo de investigación ha estado interesado desde hace más de 20 años en el estudio de las alteraciones en el transporte iónico en el intestino inflamado. Además, estudios previos habían descrito defectos en el transporte hidroelectrolítico en animales libres de gérmenes [15, 129]. Por este motivo nos planteamos estudiar el efecto de la ausencia de microbiota en la expresión de transportadores. El estudio de la expresión de distintos transportadores mediante RT-PCR en ratones normales y libres de gérmenes indicó que en ausencia de microbiota la expresión de *Scnn1b*, *Scnn1g* (las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de ENaC), *Slc9a3*, (NHE3), *Aqp8* y *Atp1a1* (la subunidad  $\alpha$  de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) se encontraba incrementada significativamente, observándose asimismo una tendencia a incrementar la expresión de *Slc26a3* (DRA) y *Atp1b1* (subunidad  $\beta$  de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) (Fig 36). Globalmente estos resultados son coherentes con la hipótesis de un cambio en el transporte hidroelectrolítico en colon asociado a las condiciones libres de gérmenes. En este sentido, es interesante observar que los resultados de *microarrays* y de PCR indicaron que la presencia de pequeñas cantidades de antígenos bacterianos (grupo HBE) normalizó la expresión de los transportadores cuando se comparó con la expresión en animales libres de gérmenes (Fig 36), sugiriendo una posible relación causa-efecto. Datos preliminares realizados en células Caco-2 muestran cómo el HBE modula la expresión de *Slc9a3* (NHE3), *Atp1a1* y *Atp1b1* (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) (datos no mostrados). Por el contrario, los OND presentaron un efecto escaso a este nivel, mostrando tan solo una tendencia general a aumentar la expresión de distintos transportadores en ratones convencionales, que fue menos patente en condiciones libres de gérmenes.

Desafortunadamente no contamos en este experimento con ensayos funcionales que permitan evaluar el impacto fisiológico de las alteraciones en la expresión génica de moléculas relacionadas con el transporte a consecuencia de

la presencia/ausencia de microbiota. Por este motivo, llevamos a cabo varios experimentos en los que eliminamos la microbiota mediante la administración de una mezcla de antibióticos. Este es un modelo que nos permitió repetir experimentos fácilmente, sin necesidad de utilizar las instalaciones del Karolinska Institutet, a la vez que facilita estudiar el efecto de la eliminación de gérmenes y las posibles diferencias entre los efectos de la ausencia de gérmenes como condición congénita (o natural) y como condición sobrevenida. A la hora de poner a punto este modelo partimos de estudios previos de otros grupos de investigación, según los cuales es posible conseguir una depleción sustancial de la microbiota con una mezcla de antibióticos [344]. En este sentido el modelo funcionó razonablemente bien, ya que conseguimos la depleción de al menos un 90% de la microbiota, que se vio acompañada de cambios fenotípicos que reproducían en lo sustancial los observados en ratones libres de gérmenes. Por ejemplo, se observó un incremento del tamaño del ciego y un aumento de la humedad de las heces (aproximadamente del 20%) [27]. El estudio de la expresión de transportadores en este modelo mostró un incremento de su expresión no sólo en el colon, sino también en el ciego. En ambos casos el cambio más marcado se observó en la subunidad  $\gamma$  de ENaC .

Estos resultados contradicen los de un estudio previo en el que se observó que la expresión de *Slc26a3* (DRA) y de *Aqp4* en ratones libres de gérmenes se encuentra reducida, y que se normaliza cuando se establece la colonización bacteriana en ellos [428]. En cambio, nuestros resultados sí coinciden con un estudio del transcriptoma realizado en ratones libres de gérmenes y convencionales que revela una menor expresión de *Aqp4* en colon de ratones convencionales [429]. Los resultados también son coherentes con el trabajo publicado por Simonetta y colaboradores., en el que encontraron mayores niveles de ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en íleon y ciego de ratas libres de gérmenes en comparación con ratas convencionales, lo que asociaron con una mayor eficiencia absorbente [28]. Efectivamente, un incremento en la expresión de estos genes debería traducirse en una mayor fuerza motriz en cuanto al transporte iónico debida a la ATPasa, mayor absorción de sodio/cloro y también de agua. En un estudio llevado a cabo en ratones, se constató que, además de detectarse una mayor actividad ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en el duodeno de animales libres de gérmenes, esta se reduce al introducir una microbiota bacteriana normal [430].

Por tanto, nuestros resultados indican que la reducción/ausencia de microbiota induce la expresión de transportadores iónicos, mientras que la

introducción de antígenos bacterianos la inhibe. El incremento en la expresión de transportadores se traduciría en una mayor absorción de agua a nivel del colon y ciego. Clásicamente se ha descrito que los animales libres de gérmenes tienen una diarrea suave; aunque por razones técnicas no realizamos un seguimiento de este parámetro en los ratones libres de gérmenes, es patente que estos no tenían una diarrea claramente establecida, aunque globalmente los ratones NMRI criados en las instalaciones libres de gérmenes del Karolinska Institutet tienden a tener heces algo más blandas de lo normal. En consecuencia, es posible que la inducción de genes proabsortivos contrarreste esta tendencia fundamental de los animales libres de gérmenes. La realización de experimentos en condiciones pseudo estériles nos permitió profundizar en el estudio de los posibles cambios en el transporte hidroelectrolítico, constatándose que estos ratones tampoco presentaban diarrea, pero sí un cierto ablandamiento de las heces. Además, su contenido en agua era incuestionablemente mayor que en animales control, lo que confirma que la disminución marcada de la microbiota es capaz de reproducir este defecto fundamental de los animales libres de gérmenes. Cuando se evaluó la capacidad de transporte de agua se observó una disminución de la capacidad de absorción de agua ( $p=0,012$ ), combinando los datos de ambos experimentos). Este experimento se ha hecho dos veces y está prevista una repetición adicional con objeto de aumentar el número de muestras y la potencia estadística global. Es importante destacar que estas medidas se realizaron con la técnica del colon ligado, lo que excluye cualquier posible influencia de la motilidad intestinal. El hecho de que estos animales no presenten signos claros de diarrea y de que no se aprecien alteraciones en la concentración de iones ni en la concentración de proteínas plasmáticas indica que este defecto esencial de la capacidad absorptiva está compensado funcionalmente. Desconocemos obviamente si el transporte hidroelectrolítico está afectado a nivel del intestino delgado, dado que no era factible realizar el estudio funcional con más de un segmento intestinal, sin embargo es poco probable dado que está descrito que la absorción de agua en intestino delgado es similar en ratones libres de gérmenes y convencionales [431].

La causa del defecto de absorción en ausencia de microbiota ha sido objeto de estudio con anterioridad. Así, se ha constatado que los animales libres de gérmenes presentan una menor absorción de agua *in vivo* y una mayor absorción electrogénica de sodio [129, 431]. Donowitz y Binder observaron que la absorción de agua por el ciego en ratas libres de gérmenes estaba disminuida,

pero que este fenómeno estaba ligado a la composición de la solución presente en el intestino *in vivo* más que a un cambio específico de tipo regulador, en la medida en que la absorción a partir de una solución de NaCl era normal en animales libres de gérmenes, mientras que la absorción en animales control resultaba inhibida cuando se partía del líquido contenido en el ciego de los primeros [15]. Estos autores señalaron al mayor contenido en mucus en dicho líquido como responsable de este efecto. Como se ha indicado anteriormente, el recambio de mucus se enlentece considerablemente en ausencia de bacterias lumenales, por lo que tendería a acumularse en la luz del intestino. El resultado es una mayor densidad de cargas aniónicas, obviamente no absorbibles, que tenderían a retener sodio y agua. Sin embargo, hay datos contradictorios respecto a si hay más o menos moco en el colon de animales libres de gérmenes [125, 432]. Asumiendo que haya efectivamente más moco y que este impida la absorción, la inducción de transportadores absortivos tiene sentido fisiológicamente, pero esta hipótesis no encaja con la absorción normal de una solución iónica estándar en el ciego de ratas libres de gérmenes [15]. Es posible que esta discrepancia se deba a diferencias relacionadas con la especie animal utilizada.

Cuando se produce la pérdida de agua y sodio se induce el sistema renina-angiotensina-aldosterona, lo que tiende a incrementar la presión arterial, a preservar la función renal y a potenciar la reabsorción de agua y sodio en el riñón pero también en el colon distal, a través de la estimulación de la absorción electrogénica de sodio y otros mecanismos. El transporte electrogénico de sodio está mediado por ENaC, que muestra los cambios más importantes en nuestro estudio. Aunque esta es la diana fundamental de la acción mineralocorticoide, la aldosterona tiene un efecto más amplio sobre transportadores proabsortivos, incluyendo la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y el NHE3, entre otros [433]. Por tanto, es plausible que un defecto básico de absorción en condiciones libres de gérmenes pueda ser compensado por una respuesta de hiperaldosteronismo secundario. Sorprendentemente, al medir los niveles de aldosterona en el plasma de los ratones libres de gérmenes, encontramos no ya una ausencia de incremento, sino una franca disminución. Posteriormente medimos los niveles de corticosterona (principal glucocorticoide en el ratón) en estas muestras y hallamos un aumento del 75%, aunque con carácter no significativo. Estos resultados coinciden con los de otros estudios que han descrito que en ratones libres de gérmenes existen niveles de corticosterona elevados, tanto en condiciones basales como después de la estimulación con LPS [29, 30]. Algunos



autores han descrito además que las ratas libres de gérmenes pueden tener una mayor producción de corticosterona en respuesta al estrés y que puede existir una resistencia a la corticosterona a nivel de sus receptores [434]. Dado que la producción de glucocorticoides se regula por mediación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, en el que se ejerce una inhibición por parte del producto final (corticosterona en este caso) a nivel central, una menor sensibilidad de los receptores daría lugar a un aumento en la producción de glucocorticoide. A su vez, los niveles elevados de corticosterona son susceptibles de superar la barrera de contención que presentan las células sensibles a mineralocorticoides, que consiste en la inactivación enzimática de glucocorticoides por medio de la 11 $\beta$ -hidroxiesterol deshidrogenasa 2[433]. En la medida en que tenga lugar este fenómeno, la corticosterona induciría los efectos de la aldosterona en los tejidos sensibles, empezando por el aumento de expresión e inserción en membrana plasmática de ENaC. Por otra parte, es conocido que los glucocorticoides estimulan *per se* la absorción de agua y electrolitos en el intestino. Por tanto, nuestros resultados pueden explicarse en función de esta hipótesis. La disminución de aldosterona en sangre sería el resultado de la inhibición indirecta. Aunque nuestros ratones no experimentaron hipopotasemia, hay que recordar que los datos corresponden a un estado de compensación fisiológica, no a una fase intermedia en la que se haya podido producir el ajuste.

Por su parte, la endotelina 1 es un mediador conocido por sus efectos presores a nivel arterial [435], pero que ejerce también funciones reguladoras del transporte hidroelectrolítico, actuando como secretagogo e inhibidor de la absorción de NaCl en el colon [436, 437] y el íleon [438]. Por tanto, el incremento de la expresión de endotelina 1 que se observa en nuestro estudio tendería a neutralizar los efectos presumiblemente proabsortivos de los transportadores inducidos en condiciones libres de gérmenes. Nuestro interés en este gen surgió fundamentalmente por ser una de las secuencias incrementadas en condiciones libres de gérmenes que eran sensibles al HBE. Aunque los resultados del *microarray* no muestran cambios de expresión en transportadores secretores, el incremento en la expresión de *Edn1* sugiere que pueden producirse efectos complejos a este nivel, es decir, la endotelina 1 puede estar implicada en los cambios adaptativos asociados a la menor capacidad de absorción oponiéndose funcionalmente a la inducción de transportadores absortivos, o bien puede presentar un efecto no secretor en estas condiciones. La dilucidación de este extremo requerirá la realización de

experimentos adicionales. Es importante recordar que el gen *Edn1* es regulado por la aldosterona.

Nuestro grupo ha trabajado intensamente en el estudio de las bases moleculares y bioquímicas de la EII [182, 401, 402, 439]. Como se ha indicado anteriormente, el segundo experimento en condiciones libres de gérmenes estaba destinado a evaluar el efecto antiinflamatorio intestinal de los OND en ausencia de microbiota, es decir, dependiente de las acciones no prebióticas, pero dicho experimento dependía lógicamente de la capacidad de inducir inflamación intestinal en estas condiciones. Nuestros resultados demuestran sin lugar a dudas que la respuesta inflamatoria al DSS se encuentra fuertemente atenuada en ratones libres de gérmenes, aunque su estado global experimenta un deterioro importante, que hemos relacionado con una mayor pérdida de sangre, debido posiblemente a un defecto en la función barrera del intestino. Es importante destacar que los ratones pseudo estériles presentan igualmente una respuesta inflamatoria escasa pero, a diferencia de los animales libres de gérmenes, no muestran signo alguno de daño o de deterioro de su estado de salud. Nuestro grupo de investigación ha relacionado este fenómeno con la mayor presencia de células Treg en la mucosa de estos ratones, en virtud de la presencia previa de una microbiota normal. Estos experimentos han sido ejecutados y analizados por un equipo del que la doctoranda ha formado parte, pero como se ha comentado con anterioridad han sido tratados exhaustivamente en otra tesis doctoral presentada recientemente, por lo que no serán analizados aquí. Sin embargo, en paralelo con la investigación relacionada con la inflamación en sí, y en consonancia con nuestro interés por las alteraciones en el transporte electrogénico, consideramos de gran relevancia estudiar los cambios que se registran en estos modelos en este sentido.

Nuestros resultados indican que la administración de DSS a los ratones tuvo en general un efecto inhibitor sobre la expresión de los transportadores en los ratones convencionales, al tiempo que se desarrolla la respuesta inflamatoria. Nuestros datos coinciden con algunos estudios que indican disminución en DRA, NHE3, ENaC, AQP8 y ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en el intestino inflamado de humanos con EII y/o en modelos de inflamación en animales [31-33], pero no con todos [32, 34]. Varios grupos de investigación, incluyendo el nuestro, han puesto de manifiesto que la inflamación crónica del intestino inhibe los procesos absorptivos y también los secretorios, a través de mecanismos que pueden comprender desde alteraciones en la expresión de transportadores

y moléculas reguladoras del transporte (lo que se denomina transportoma) hasta cambios en la permeabilidad epitelial, represión de isoformas de adenilato ciclasa, etc. [182, 440]. En general, en nuestro estudio se observó una inhibición, que no siempre alcanzó significancia, de la expresión de *Slc26a3* (DRA), *Atp1b1* (subunidad  $\beta$  de la ATasa), *Aqp8* y *Scnn1a* ( $\alpha$ ENaC) en todos los modelos (ratones convencionales+DSS, ratones LG+DSS y ratones PE+DSS). Con algunas excepciones, se registró asimismo una menor expresión de *Atp1a1* (la subunidad  $\alpha$  de la ATPasa), *Scnn1g* ( $\gamma$ ENaC) y *Slc9a3* (NHE3). También se observó inhibición de *Scnn1b* ( $\beta$ ENaC) en ratones convencionales y ratones pseudo estériles a los que se administró DSS. Por tanto, hay más coincidencias que discrepancias en el perfil de expresión de transportadores en los 3 modelos. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, mientras que los marcadores de inflamación determinados y el estado de los animales indican la presencia de colitis en animales convencionales, en ratones pseudo estériles y libres de gérmenes a los que se administró DSS se observó inflamación muy leve. Además, los ratones libres de gérmenes mostraron síntomas de afectación grave, probablemente por pérdida abundante de sangre, en tanto que los ratones pseudo estériles no mostraron síntomas en absoluto. Por tanto la inhibición de la expresión de transportadores parece deberse en ese caso más al daño del DSS a la barrera epitelial que a la presencia o ausencia de inflamación y/o de bacterias. En este sentido, es conocido que el DSS actúa como agente lesivo sobre las células epiteliales, lo que de hecho constituye su mecanismo de acción como agente colitogénico. Precisamente para reducir el sesgo en este sentido utilizamos villina en la normalización de estos datos, de forma que la expresión de los transportadores está referida a la cantidad de células epiteliales presentes en la muestra. Por tanto, el descenso de los transportadores podría interpretarse en función de la existencia de más enterocitos inmaduros o por un efecto sobre la expresión en enterocitos maduros. Alternativamente, es posible que un nivel mínimo de inflamación como el detectado en nuestros modelos libres de gérmenes y pseudo estériles sea suficiente para determinar la represión génica observada. Es interesante constatar también que la endotelina 1 presentó un comportamiento diferencial, ya que fue inducida en ratones convencionales e inhibida en los ratones libres de gérmenes y pseudo estériles expuestos a DSS.

Desde el punto de vista funcional, en los ratones convencionales y en los pseudo estériles la administración de DSS produjo el esperado incremento de la humedad de las heces. Nuestros datos indican que este efecto se superpone

con el defecto de absorción ligado a la depleción masiva de la microbiota en los ratones pseudo estériles, pero se llega a un límite fijo cercano al 60% de humedad. En consecuencia, el efecto del DSS es proporcionalmente mayor en ratones convencionales que en los pseudo estériles. Paradójicamente, este efecto no se asoció con cambios significativos en la absorción de agua en los animales expuestos a DSS, cuya tendencia fue de hecho a aumentar más que a disminuir. Por tanto, en los ratones tratados con DSS se pierde la correlación entre el grado de humedad en heces/diarrea y la capacidad específica de absorción del colon, tanto en ratones convencionales como pseudo estériles. Dado que el DSS típicamente produce hematoquecia, incluyendo la presencia de sangre oculta en heces, es posible que esta contribuya decisivamente a la mayor pérdida de agua y que no se detecte en el corto período de estudio del experimento de transporte. Alternativamente, esta puede deberse al menos en parte a una mayor motilidad intestinal, dado que esta no influye en la captación de agua en la técnica del colon ligado. Una tercera posibilidad es que el DSS produzca una mayor secreción o menor absorción de agua en las porciones proximales del intestino, aunque es improbable porque el DSS no produce inflamación en el intestino delgado.

Con independencia de la causa concreta, dado que el DSS produce una disminución global de la expresión de transportadores absorptivos en el colon de ratones normales y pseudo estériles, el hecho de que no se registre una inhibición paralela de la capacidad de absorción colónica indica que el impacto funcional de este cambio regulador es despreciable en este caso. Por supuesto, es posible que no se produzcan cambios paralelos a nivel de proteína, lo que de hecho constituiría la explicación más probable para esta discrepancia. En vista de esta observación, es posible que los ratones libres de gérmenes tratados con DSS tampoco experimenten una inhibición de la capacidad de transporte, pero es imposible afirmarlo categóricamente al no disponer de datos de funcionalidad en este modelo.

Los OND son productos que, además de ser empleados con frecuencia en la industria alimentaria, han demostrado ser efectivos en la prevención y el tratamiento de distintas enfermedades como la diarrea o la enfermedad inflamatoria intestinal, al menos a nivel preclínico. A pesar de que la mayoría de sus efectos se han relacionado con sus acciones prebióticas, el mecanismo de acción es relativamente desconocido. La presente tesis doctoral demuestra la capacidad de los OND de actuar directamente no solo sobre células de la

mucosa intestinal sino también sobre la bacteria patógena *Pseudomas aeruginosa*, contribuyendo al conocimiento del mecanismo de acción de estos compuestos. El hecho de que convivamos con la microbiota nos plantea cuál es la importancia biológica de estas acciones directas. En primer lugar, los OND deben atravesar todo el tracto intestinal antes de llegar al ciego, pudiendo ejercer sus acciones directas principalmente en estas zonas. Además, existen algunas situaciones como el uso prolongado de antibióticos que reducen la flora bacteriana, haciendo a estos individuos más susceptibles de percibir estas acciones directas. Algunas de estas acciones son el efecto inmunoestimulador de los OND sobre células de la mucosa intestinal ,además de la modificación en la expresión de genes implicados en diversas funciones como el metabolismo lipídico o la función barrera. Para determinar la importancia biológica de estos cambios se requerirá de estudios más amplios en cada una de estas áreas.

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral demuestran cómo la presencia de la microbiota está implicada en el mantenimiento de la homeostasis del agua. Este hecho no solo nos ayuda a comprender la relación existente entre individuo y microbiota y sus implicaciones, sino también las consecuencias derivadas de la alteración de la microbiota. Las implicaciones a nivel funcional, así como las posibles ventajas de la administración de antígenos de la microbiota, deberán ser objeto de futuros estudios.

# **Conclusiones/Conclusions**

## Conclusiones

- Fos reduce la patogenicidad de *P. aeruginosa* mediante distintos mecanismos.
- Los OND ejercen efectos directos *in vitro* induciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias en células epiteliales intestinales a través de la activación de la vía TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B.
- FOS y GOS presentan acciones directas independientes de su efecto prebiótico *in vivo* que son moduladas por antígenos de la microbiota. Entre estos efectos destacamos la regulación del crecimiento y la proliferación celular, del transporte de lípidos, del metabolismo del glutatión, de la función barrera y de moléculas que intervienen en la defensa frente a patógenos.
- La ausencia de microbiota implica una inducción de la expresión de transportadores como posible mecanismo de compensación a las alteraciones de la homeostasis del agua observada en animales libres de gérmenes.
- El DSS inhibe la expresión de transportadores en colon independientemente de la presencia de microbiota o de su grado de inflamación. Esta inhibición no se correlaciona con una menor absorción de agua.
- El DSS no induce inflamación colónica en animales libres de gérmenes de forma que no es posible realizar el estudio del efecto antiinflamatorio directo, independiente de su efecto prebiótico de los OND.

## Conclusions

- FOS reduces *P. aeruginosa* pathogenicity through several mechanisms
- NDOs exert direct effects *in vitro* inducing the secretion of proinflammatory cytokines by intestinal epithelial cells via TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B activation.
- FOS and GOS exert direct actions independent of their prebiotic effect *in vivo*. These effects are modulated by microbiota antigens. Some of these actions include effects on the regulation of cell growing and proliferation, lipid transport, glutathione metabolism, epithelial barrier function and defense against pathogens.
- The lack of microbiota results in an induction of the expression of hydroelectrolytic carriers as a possible compensatory mechanism to water homeostasis alteration observed in germ free mice.
- DSS inhibits the expression of hydroelectrolytic carriers in colon independently of the presence of microbiota or the degree of inflammation. This inhibition did not correlate with lower water absorption.
- DSS does not induce colonic inflammation in germ free mice. Consequently there is not a suitable model of colitis to investigate the non prebiotic antiinflammatory actions of NDOs.





## ***Bibliografía***

1. Roberfroid, M., et al., *Prebiotic effects: metabolic and health benefits*. The British journal of nutrition, 2010. **104 Suppl 2**: p. S1-63.
2. Macfarlane, G.T., H. Steed, and S. Macfarlane, *Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics*. J Appl Microbiol, 2008. **104**(2): p. 305-44.
3. Martínez-Férez, A., et al., *Goat's milk is a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology*. International Dairy Journal, 2005. **16**: p. 173-181.
4. Lara-Villoslada, F., et al., *Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis*. Clin Nutr, 2006. **25**(3): p. 477-88.
5. Amer, L.S., B.M. Bishop, and M.L. van Hoek, *Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against Francisella*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(2): p. 246-51.
6. Periti, P., et al., *Pharmacokinetic drug interactions of macrolides*. Clin Pharmacokinet, 1992. **23**(2): p. 106-31.
7. Velez, E., et al., *Study of the effect exerted by fructo-oligosaccharides from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) root flour in an intestinal infection model with *Salmonella Typhimurium**. Br J Nutr, 2012: p. 1-9.
8. Babu, U.S., et al., *Effects of fructooligosaccharide-inulin on *Salmonella*-killing and inflammatory gene expression in chicken macrophages*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **149**(1-2): p. 92-6.
9. Buddington, K.K., J.B. Donahoo, and R.K. Buddington, *Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers*. J Nutr, 2002. **132**(3): p. 472-7.
10. Cao, H., R.L. Baldini, and L.G. Rahme, *Common mechanisms for pathogens of plants and animals*. Annu Rev Phytopathol, 2001. **39**: p. 259-84.
11. Rahme, L.G., et al., *Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals*. Science, 1995. **268**(5219): p. 1899-902.
12. Chastre, J. and J.Y. Fagon, *Ventilator-associated pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(7): p. 867-903.
13. Sanchez de Medina, F., et al., *Host-microbe interactions: the difficult yet peaceful coexistence of the microbiota and the intestinal mucosa*. Br J Nutr, 2013. **109 Suppl 2**: p. S12-20.
14. Thompson, G.R. and P.C. Trexler, *Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals*. Gut, 1971. **12**(3): p. 230-5.
15. Donowitz, M. and H.J. Binder, *Mechanism of fluid and electrolyte secretion in the germ-free rat cecum*. Dig Dis Sci, 1979. **24**(7): p. 551-9.
16. Daddaoua, A., et al., *Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis*. J Nutr, 2006. **136**(3): p. 672-6.
17. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.

18. Nenci, A., et al., *Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation*. *Nature*, 2007. **446**(7135): p. 557-61.
19. Brandl, K., et al., *MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection*. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1891-900.
20. Lebeis, S.L., et al., *TLR signaling mediated by MyD88 is required for a protective innate immune response by neutrophils to *Citrobacter rodentium**. *J Immunol*, 2007. **179**(1): p. 566-77.
21. Boehm, G. and B. Stahl, *Oligosaccharides from milk*. *J Nutr*, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 847S-9S.
22. Kuntz, S., S. Rudloff, and C. Kunz, *Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells*. *Br J Nutr*, 2008. **99**(3): p. 462-71.
23. Pesti, H.A.G.L., *The Gnotobiotic Animal as a Tool in the Study of Host Microbial Relationships*. *Bacteriological Reviews*, 1971. **35**(4): p. 390-429.
24. Benyacoub, J., et al., *Feeding a diet containing a fructooligosaccharide mix can enhance *Salmonella* vaccine efficacy in mice*. *J Nutr*, 2008. **138**(1): p. 123-9.
25. Russo, F., et al., *Inulin-enriched pasta improves intestinal permeability and modifies the circulating levels of zonulin and glucagon-like peptide 2 in healthy young volunteers*. *Nutr Res*, 2012. **32**(12): p. 940-6.
26. Zhong, Y., et al., *Protective effect of galactooligosaccharide-supplemented enteral nutrition on intestinal barrier function in rats with severe acute pancreatitis*. *Clin Nutr*, 2009. **28**(5): p. 575-80.
27. Reikvam, D.H., et al., *Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17996.
28. Simonetta, M., et al., *Electrical resistance and ATPase levels in the cecal wall of germ free and conventional rats*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1975. **150**(2): p. 541-5.
29. Neufeld, K.M., et al., *Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice*. *Neurogastroenterol Motil*, 2011. **23**(3): p. 255-64, e119.
30. Ikeda, M., et al., *Serum amyloid A, cytokines, and corticosterone responses in germfree and conventional mice after lipopolysaccharide injection*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999. **63**(6): p. 1006-10.
31. Sullivan, S., et al., *Downregulation of sodium transporters and NHERF proteins in IBD patients and mouse colitis models: potential contributors to IBD-associated diarrhea*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(2): p. 261-74.
32. Farkas, K., et al., *New therapeutic targets in ulcerative colitis: the importance of ion transporters in the human colon*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(4): p. 884-98.
33. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., *Gene expression of carnitine organic cation transporters 1 and 2 (OCTN) is downregulated in patients with ulcerative colitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(10): p. 2205-6.
34. Yeruva, S., et al., *Preserved Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 expression and localization, but decreased NHE3 function indicate regulatory sodium transport defect in ulcerative colitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(7): p. 1149-61.
35. Mahida, Y.R., *Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2004. **18**(2): p. 241-53.

36. Mitic, L.L., C.M. Van Itallie, and J.M. Anderson, *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(2): p. G250-4.
37. Shifrin, D.A., Jr. and M.J. Tyska, *Ready...aim...fire into the lumen: a new role for enterocyte microvilli in gut host defense*. Gut Microbes, 2012. **3**(5): p. 460-2.
38. Kindon, H., et al., *Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein*. Gastroenterology, 1995. **109**(2): p. 516-23.
39. Loomes, K.M., et al., *Functional protective role for mucin glycosylated repetitive domains*. Eur J Biochem, 1999. **266**(1): p. 105-11.
40. Ouwerkerk, J.P., W.M. de Vos, and C. Belzer, *Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2013. **27**(1): p. 25-38.
41. Lindahl, M. and I. Carlstedt, *Binding of pig small intestinal mucin glycopeptides to fimbriated enterotoxigenic Escherichia coli*. Symp Soc Exp Biol, 1989. **43**: p. 423-8.
42. Piotrowski, J., et al., *Inhibition of Helicobacter pylori colonization by sulfated gastric mucin*. Biochem Int, 1991. **24**(4): p. 749-56.
43. Smith, C.J., J.B. Kaper, and D.R. Mack, *Intestinal mucin inhibits adhesion of human enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1995. **21**(3): p. 269-76.
44. Ouellette, A.J., *Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment*. Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1779-84.
45. Bevins, C.L. and N.H. Salzman, *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 356-68.
46. O'Neil, D.A., et al., *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6718-24.
47. Vaishnava, S., et al., *The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine*. Science, 2011. **334**(6053): p. 255-8.
48. Gebert, A., H.J. Rothkotter, and R. Pabst, *M cells in Peyer's patches of the intestine*. Int Rev Cytol, 1996. **167**: p. 91-159.
49. Colgan, S.P., et al., *Interferon-gamma induces a cell surface phenotype switch on T84 intestinal epithelial cells*. Am J Physiol, 1994. **267**(2 Pt 1): p. C402-10.
50. Zund, G., et al., *Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7460-4.
51. Colgan, S.P., et al., *Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13938-43.
52. Dickinson, B.L., et al., *Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. 903-11.
53. Witmer-Pack, M.D., et al., *Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues*. Cell Immunol, 1995. **163**(1): p. 157-62.
54. Kaiserlian, D., K. Vidal, and J.P. Revillard, *Murine enterocytes can present soluble antigen to specific*

- class II-restricted CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 1989. **19**(8): p. 1513-6.
55. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(4): p. 331-41.
56. Cruickshank, S.M., et al., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 678-84.
57. Madara, J.L. and J. Stafford, *Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers*. *J Clin Invest*, 1989. **83**(2): p. 724-7.
58. Telega, G.W., D.C. Baumgart, and S.R. Carding, *Uptake and presentation of antigen to T cells by primary colonic epithelial cells in normal and diseased states*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1548-59.
59. Beckman, E.M., et al., *Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells*. *Nature*, 1994. **372**(6507): p. 691-4.
60. Sieling, P.A., et al., *CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens*. *Science*, 1995. **269**(5221): p. 227-30.
61. Blumberg, R.S., et al., *Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins*. *Immunol Rev*, 1995. **147**: p. 5-29.
62. Somnay-Wadgaonkar, K., et al., *Immunolocalization of CD1d in human intestinal epithelial cells and identification of a beta2-microglobulin-associated form*. *Int Immunol*, 1999. **11**(3): p. 383-92.
63. van de Wal, Y., et al., *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1420-31.
64. Simecka, J.W., *Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance*. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998. **34**(2-3): p. 235-259.
65. Debard, N., et al., *Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches*. *Gastroenterology*, 2001. **120**(5): p. 1173-82.
66. Singer, II, et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(4): p. 871-85.
67. Dijkstra, G., et al., *Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease*. *J Pathol*, 1998. **186**(4): p. 416-21.
68. Wallace, J.L., *Cooperative modulation of gastrointestinal mucosal defence by prostaglandins and nitric oxide*. *Clin Invest Med*, 1996. **19**(5): p. 346-51.
69. Ward, P.A., *Sepsis, apoptosis and complement*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(11): p. 1383-8.
70. Tegla, C.A., et al., *Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes*. *Immunol Res*, 2011. **51**(1): p. 45-60.
71. Bellamy, W., et al., *Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin*. *J Appl Bacteriol*, 1992. **73**(6): p. 472-9.
72. Iweala, O.I. and C.R. Nagler, *Immune privilege in the gut: the establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora*. *Immunol Rev*, 2006. **213**: p. 82-100.
73. Billsborough, J. and J.L. Viney, *Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(1): p. 300-9.
74. Sato, A., et al., *CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6*

- and induce IgA secretion from naive B cells. *J Immunol*, 2003. **171**(7): p. 3684-90.
75. Smith, P.D., et al., *Intestinal macrophages and response to microbial encroachment*. *Mucosal Immunol*, 2011. **4**(1): p. 31-42.
76. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(10): p. 987-95.
77. Brandtzaeg, P., I.N. Farstad, and L. Helgeland, *Phenotypes of T cells in the gut*. *Chem Immunol*, 1998. **71**: p. 1-26.
78. Targan, S.R., et al., *Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway*. *J Immunol*, 1995. **154**(2): p. 664-75.
79. Lefrancois, L., et al., *On the front lines: intraepithelial lymphocytes as primary effectors of intestinal immunity*. *Springer Semin Immunopathol*, 1997. **18**(4): p. 463-75.
80. Carbonare, S.B., et al., *Inhibition of HEp-2 cell invasion by enteroinvasive Escherichia coli by human colostrum IgA*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995. **108**(2): p. 113-8.
81. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. *Science*, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
82. Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, and W.M. De Vos, *Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 1998. **64**(10): p. 3854-9.
83. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
84. Blaut, M. and S. Klaus, *Intestinal microbiota and obesity*. *Handb Exp Pharmacol*, 2012(209): p. 251-73.
85. Duboc, H., et al., *Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome*. *Neurogastroenterol Motil*, 2012. **24**(6): p. 513-20, e246-7.
86. Song, Y., C. Liu, and S.M. Finegold, *Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(11): p. 6459-65.
87. Finegold, S.M., et al., *Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children*. *Anaerobe*, 2010. **16**(4): p. 444-53.
88. Bouskra, D., et al., *Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis*. *Nature*, 2008. **456**(7221): p. 507-10.
89. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(6): p. 478-85.
90. Bry, L., et al., *A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem*. *Science*, 1996. **273**(5280): p. 1380-3.
91. Cash, H.L., et al., *Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin*. *Science*, 2006. **313**(5790): p. 1126-30.
92. Diaz Heijtz, R., et al., *Normal gut microbiota modulates brain development and behavior*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(7): p. 3047-52.
93. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
94. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal*

- function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
95. Uematsu, S. and S. Akira, *Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands*. Handb Exp Pharmacol, 2008(183): p. 1-20.
96. Akira, S., *Toll receptor families: structure and function*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 1-2.
97. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 353-64.
98. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-51.
99. Gewirtz, A.T., et al., *Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1882-5.
100. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
101. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 1054-70.
102. Inohara, et al., *NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 355-83.
103. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
104. Lala, S., et al., *Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 47-57.
105. Biswas, A., T. Petnicki-Ocwieja, and K.S. Kobayashi, *Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(1): p. 15-24.
106. Franchi, L., R. Munoz-Planillo, and G. Nunez, *Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 325-32.
107. Rathinam, V.A., S.K. Vanaja, and K.A. Fitzgerald, *Regulation of inflammasome signaling*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 333-2.
108. Gordon, H.A.B.-K., E.; Staley, T.E.; Wagner, M.; Wostmann, B.S., *Characteristics of the germfree rat*. Acta Anat, 1966. **64**: p. 367-389.
109. Hapfelmeier, S., et al., *Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1705-9.
110. Imaoka, A., et al., *Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice*. Eur J Immunol, 1996. **26**(4): p. 945-8.
111. Umesaki, Y., et al., *Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus*. Immunology, 1993. **79**(1): p. 32-7.
112. Helgeland, L., et al., *Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine*. Immunology, 1996. **89**(4): p. 494-501.
113. Husebye, E., P.M. Hellstrom, and T. Midtvedt, *Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex*. Dig Dis Sci, 1994. **39**(5): p. 946-56.
114. Carlstedt-Duke, B., et al., *Isolation and characterization of a mucin-degrading strain of*



- Peptostreptococcus* from rat intestinal tract. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B, 1986. **94**(5): p. 293-300.
115. Gordon, H.A., M. Wagner, and B.S. Wostmann, *Studies on conventional and germ-free chickens treated orally with antibiotics*. Antibiot Annu, 1957. **5**: p. 248-55.
116. Meynell, G.G., *Antibacterial mechanisms of the mouse gut. II. The role of Eh and volatile fatty acids in the normal gut*. Br J Exp Pathol, 1963. **44**: p. 209-19.
117. Desplaces, A., D. Zagury, and E. Sacquet, [Study of the thyroid function of the germ-free rat]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1963. **257**: p. 756-8.
118. Gordon, H.A., *Is the germfree animal normal? The germ free animal in research*. 1968, New York: Academic Press Inc.
119. Wostmann, B.S. and N.L. Wiech, *Total serum and liver cholesterol in germfree and conventional male rats*. Am J Physiol, 1961. **201**: p. 1027-9.
120. Danielsson, H. and B. Gustafsson, *On serum-cholesterol levels and neutral fecal sterols in germ-free rats; bile acids and steroids* 59. Arch Biochem Biophys, 1959. **83**: p. 482-5.
121. Gustafsson, B.E., et al., *Turnover and nature of fecal bile acids in germfree and infected rats fed cholic acid-24-14C; bile acids and steroids* 41. Proc Soc Exp Biol Med, 1957. **94**(3): p. 467-71.
122. Gordon, H.A., E. Bruckner-Kardoss, and B.S. Wostmann, *Aging in germ-free mice: life tables and lesions observed at natural death*. J Gerontol, 1966. **21**(3): p. 380-7.
123. Alam, M., T. Midtvedt, and A. Uribe, *Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats*. Scand J Gastroenterol, 1994. **29**(5): p. 445-51.
124. Csáky, T.Z., *Intestinal water permeability regulation involving the microbial flora*, in *The germ free animal in research*, I.M.E. Coates, Editor. 1968, Academic Press Inc.: New York. p. 151-159.
125. Lindstedt, G., S. Lindstedt, and B.E. Gustafsson, *Mucus in Intestinal Contents of Germfree Rats*. J Exp Med, 1965. **121**: p. 201-13.
126. Loesche, W.J., *Protein and carbohydrate composition of cecal contents of gnotobiotic rats and mice*. Proc Soc Exp Biol Med, 1968. **128**(1): p. 195-9.
127. Hoskins, L.C., et al., *Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins*. J Clin Invest, 1985. **75**(3): p. 944-53.
128. Gustafsson, B.E., T. Midtvedt, and K. Strandberg, *Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germfree rats*. Scand J Gastroenterol, 1970. **5**(4): p. 309-14.
129. Rosel, E. and W. von Engelhardt, *Sodium transport across the caecal and colonic epithelium of germfree and specific-pathogen free rats*. Reprod Nutr Dev, 1996. **36**(3): p. 289-99.
130. Colmer, J.A. and A.N. Hamood, *Characterization of ptxS, a Pseudomonas aeruginosa gene which interferes with the effect of the exotoxin A positive regulatory gene, ptxR*. Mol Gen Genet, 1998. **258**(3): p. 250-9.
131. Mattick, J.S., *Type IV pili and twitching motility*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 289-314.
132. O'Toole, G.A. and R. Kolter, *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Mol Microbiol, 1998. **30**(2): p. 295-304.

133. Hoiby, N., et al., *Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth*. Microbes Infect, 2001. **3**(1): p. 23-35.
134. Verstraeten, N., et al., *Living on a surface: swarming and biofilm formation*. Trends Microbiol, 2008. **16**(10): p. 496-506.
135. Meyer, J.M., et al., *Pyoverdinin is essential for virulence of Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 1996. **64**(2): p. 518-23.
136. Jobin, C. and R.B. Sartor, *The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(3): p. C451-62.
137. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
138. 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.
139. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
140. Siebenlist, U., K. Brown, and E. Claudio, *Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 435-45.
141. Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown, *Structure, regulation and function of NF-kappa B*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 405-55.
142. 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.
143. Cheng, Q., et al., *NF-kappa B subunit-specific regulation of the I kappa B alpha promoter*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13551-7.
144. 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.
145. Zandi, E. and M. Karin, *Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I kappa B kinase complex*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4547-51.
146. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
147. 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.
148. DiDonato, J., et al., *Mapping of the inducible I kappa B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1295-304.
149. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
150. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
151. Xiao, G., E.W. Harhaj, and S.C. Sun, *NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 401-9.
152. 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.
153. 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.

154. Herfarth, H., et al., *Nuclear factor-kappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin*. Clin Exp Immunol, 2000. **120**(1): p. 59-65.
155. Pasparakis, M., *Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 778-88.
156. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
157. Broom, O.J., et al., *Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease?* Clin Exp Immunol, 2009. **158**(3): p. 272-80.
158. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2449-76.
159. Coulombe, P. and S. Meloche, *Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1376-87.
160. Brown, M.D. and D.B. Sacks, *Compartmentalised MAPK pathways*. Handb Exp Pharmacol, 2008(186): p. 205-35.
161. Yoshioka, K., *Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades*. J Biochem, 2004. **135**(6): p. 657-61.
162. Jeffrey, K.L., et al., *Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 391-403.
163. Woo, C.H., et al., *ERK5 activation inhibits inflammatory responses via peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) stimulation*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32164-74.
164. Rovida, E., et al., *ERK5/BMK1 is indispensable for optimal colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-induced proliferation in macrophages in a Src-dependent fashion*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4166-72.
165. Delaney, J., et al., *Regulation of c-fos, c-jun and c-myc gene expression by angiotensin II in primary cultured rat astrocytes: role of ERK1/2 MAP kinases*. Neurochem Res, 2008. **33**(3): p. 545-50.
166. Grund, E.M., et al., *Interleukins 2 and 15 regulate Ets1 expression via ERK1/2 and MNK1 in human natural killer cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4772-8.
167. Guha, M., et al., *Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1429-39.
168. Caruso, R., et al., *A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3alpha, by gut epithelial cells*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 166-75.
169. Kwon, K.H., H. Ohigashi, and A. Murakami, *Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 beta release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages*. Life Sci, 2007. **81**(5): p. 362-71.
170. Garat, C. and W.P. Arend, *Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways*. Cytokine, 2003. **23**(1-2): p. 31-40.
171. Hollenbach, E., et al., *Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease*. FASEB J, 2004. **18**(13): p. 1550-2.

172. Rowlett, R.M., et al., *MNK kinases regulate multiple TLR pathways and innate proinflammatory cytokines in macrophages*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(2): p. G452-9.
173. Schindler, J.F., J.B. Monahan, and W.G. Smith, *p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets*. J Dent Res, 2007. **86**(9): p. 800-11.
174. Saklatvala, J., *The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 372-7.
175. Wang, M.L., et al., *Regulation of RELM/FIZZ isoform expression by Cdx2 in response to innate and adaptive immune stimulation in the intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(5): p. G1074-83.
176. 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.
177. Roy, P.K., et al., *Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(2): p. 200-2.
178. Aud, D. and S.L. Peng, *Mechanisms of disease: Transcription factors in inflammatory arthritis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(8): p. 434-42.
179. Novotny, V., et al., *Nrf1 in a complex with fosB, c-jun, junD and ATF2 forms the AP1 component at the TNF alpha promoter in stimulated mast cells*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(23): p. 5480-5.
180. Schmeck, B., et al., *Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 - dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells*. Respir Res, 2006. **7**: p. 98.
181. Zenz, R., et al., *Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(1): p. 201.
182. 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.
183. Kunzelmann, K. and M. Mall, *Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 245-89.
184. Zachos, N.C., M. Tse, and M. Donowitz, *Molecular physiology of intestinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange*. Annu Rev Physiol, 2005. **67**: p. 411-43.
185. Geibel, J.P., *Secretion and absorption by colonic crypts*. Annu Rev Physiol, 2005. **67**: p. 471-90.
186. Hirota, C.L. and D.M. McKay, *Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(5): p. 463-79.
187. Tough, I.R., et al., *Dual and selective antagonism of neurokinin NK(1) and NK(2) receptor-mediated responses in human colon mucosa*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2003. **367**(2): p. 104-8.
188. Khurana, S., et al., *Brush border phosphatidylinositol 3-kinase mediates epidermal growth factor stimulation of intestinal NaCl absorption and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 9919-27.
189. Frieling, T., et al., *Leukotriene-evoked cyclic chloride secretion is mediated by enteric neuronal modulation in guinea-pig colon*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997. **355**(5): p. 625-30.
190. Stoner, M.C. and J.M. Kellum, *Both serotonin and a nitric-oxide donor cause chloride secretion in*

- rat colonocytes by stimulating cGMP. *Surgery*, 2001. **130**(2): p. 236-41.
191. Kachintorn, U., et al., *Activation by calcium alone of chloride secretion in T84 epithelial cells*. *Br J Pharmacol*, 1993. **109**(2): p. 510-7.
192. Esfandyari, T., et al., *A novel receptor for calcitonin gene-related peptide (CGRP) mediates secretion in the rat colon: implications for secretory function in colitis*. *FASEB J*, 2000. **14**(10): p. 1439-46.
193. Bode, H., et al., *IL-1beta and TNF-alpha, but not IFN-alpha, IFN-gamma, IL-6 or IL-8, are secretory mediators in human distal colon*. *Cytokine*, 1998. **10**(6): p. 457-65.
194. Schmitz, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces Cl- and K+ secretion in human distal colon driven by prostaglandin E2*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(4 Pt 1): p. G669-74.
195. Wardle, T.D., L. Hall, and L.A. Turnberg, *Platelet activating factor: release from colonic mucosa in patients with ulcerative colitis and its effect on colonic secretion*. *Gut*, 1996. **38**(3): p. 355-61.
196. Mall, M., et al., *Activation of ion secretion via proteinase-activated receptor-2 in human colon*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **282**(2): p. G200-10.
197. Rolfe, V.E. and P.J. Milla, *Nitric oxide stimulates cyclic guanosine monophosphate production and electrogenic secretion in Caco-2 colonocytes*. *Clin Sci (Lond)*, 1999. **96**(2): p. 165-70.
198. Tien, X.Y., et al., *Neurokinin A increases short-circuit current across rat colonic mucosa: a role for vasoactive intestinal polypeptide*. *J Physiol*, 1991. **437**: p. 341-50.
199. Keely, S.J. and K.E. Barrett, *Regulation of chloride secretion. Novel pathways and messengers*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **915**: p. 67-76.
200. Clarke, L.L. and M.C. Harline, *CFTR is required for cAMP inhibition of intestinal Na+ absorption in a cystic fibrosis mouse model*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(2 Pt 1): p. G259-67.
201. Mall, M., et al., *CFTR-mediated inhibition of epithelial Na+ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(3 Pt 1): p. G709-16.
202. Li, J., et al., *Experimental colitis modulates the functional properties of NMDA receptors in dorsal root ganglia neurons*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **291**(2): p. G219-28.
203. Akbarali, H.I., C. Pothoulakis, and I. Castagliuolo, *Altered ion channel activity in murine colonic smooth muscle myocytes in an experimental colitis model*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **275**(2): p. 637-42.
204. Mankertz, J. and J.D. Schulzke, *Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007. **23**(4): p. 379-83.
205. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. *Gut*, 2007. **56**(1): p. 61-72.
206. Soderholm, J.D., et al., *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease*. *Gut*, 2002. **50**(3): p. 307-13.
207. Gookin, J.L., et al., *PG-mediated closure of paracellular pathway and not restitution is the primary determinant of barrier recovery in acutely injured porcine ileum*. *Am*

- J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(5): p. G967-79.
208. Gookin, J.L., J.M. Rhoads, and R.A. Argenzio, *Inducible nitric oxide synthase mediates early epithelial repair of porcine ileum*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(1): p. G157-68.
209. Sandle, G.I., et al., *Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon*. Gastroenterology, 1990. **99**(1): p. 97-105.
210. Greig, E. and G.I. Sandle, *Diarrhea in ulcerative colitis. The role of altered colonic sodium transport*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **915**: p. 327-32.
211. Hawker, P.C., J.S. McKay, and L.A. Turnberg, *Electrolyte transport across colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1980. **79**(3): p. 508-11.
212. Jenkins, H.R. and P.J. Milla, *The effect of colitis on large-intestinal electrolyte transport in early childhood*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1993. **16**(4): p. 402-5.
213. Burgel, N., et al., *Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis*. Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 433-43.
214. Pithadia, A.B. and S. Jain, *Treatment of inflammatory bowel disease (IBD)*. Pharmacol Rep, 2011. **63**(3): p. 629-42.
215. Greenberg, G.R., et al., *Oral budesonide for active Crohn's disease*. Canadian Inflammatory Bowel Disease Study Group. N Engl J Med, 1994. **331**(13): p. 836-41.
216. Aberra, F.N., et al., *Corticosteroids and immunomodulators: postoperative infectious complication risk in inflammatory bowel disease patients*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 320-7.
217. Sicilia, B., R. Vicente, and F. Gomollon, *[Epidemiology of inflammatory bowel disease: controversies in classical epidemiology]*. Acta Gastroenterol Latinoam, 2009. **39**(2): p. 135-45.
218. Blanchard, J.F., et al., *Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Am J Epidemiol, 2001. **154**(4): p. 328-35.
219. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
220. 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.
221. Ekbohm, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. Gastroenterology, 1991. **100**(2): p. 350-8.
222. Sonnenberg, A., *Disability from inflammatory bowel disease among employees in West Germany*. Gut, 1989. **30**(3): p. 367-70.
223. Acheson, E.D. and M.D. Nefzger, *Ulcerative colitis in the United States Army in 1944. Epidemiology: comparisons between patients and controls*. Gastroenterology, 1963. **44**: p. 7-19.
224. Stephan R. Targan, F.S., Loren C Karp, *Inflammatory bowel disease From Bench to Bedside*, Springer, Editor. 2002. p. 21-65.
225. Yang H, R.J., *Inflammatory bowel disease*. Principles and Practice of Medical Genetics, ed. C.J. Rimo DL, Pyeritz RE, Emery AEH. 1997, London: Churchill Livingstone.
226. Ishihara, S., et al., *Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics*. J Gastroenterol, 2009. **44**(11): p. 1097-108.

227. 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.
228. Waller, S., et al., *Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis*. Gut, 2006. **55**(6): p. 809-14.
229. Yang, H., et al., *Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 1080-4.
230. Silverberg, M.S., et al., *A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1\*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2003. **9**(1): p. 1-9.
231. Yamazaki, K., et al., *Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(22): p. 3499-506.
232. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
233. Tremelling, M., et al., *IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1657-64.
234. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease*. Nat Genet, 2008. **40**(8): p. 955-62.
235. Anderson, C.A., et al., *Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship*. Gastroenterology, 2009. **136**(2): p. 523-9 e3.
236. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 207-11.
237. Parkes, M., et al., *Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 830-2.
238. Manichanh, C., et al., *The gut microbiota in IBD*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **9**(10): p. 599-608.
239. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
240. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
241. Selby, W., et al., *Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2313-9.
242. Ott, S.J., et al., *Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease*. Gut, 2004. **53**(5): p. 685-93.
243. Scanlan, P.D., et al., *Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(11): p. 3980-8.
244. Willing, B.P., et al., *A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes*. Gastroenterology, 2010. **139**(6): p. 1844-1854 e1.

245. Boller, R., [Results of 89 ulcerative colitis cases in the Boller Division in the Vienna General Hospital]. *Gastroenterologia*, 1956. **86**(5): p. 693-6.
246. Calkins, B.M., et al., *Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Dig Dis Sci*, 1984. **29**(10): p. 913-20.
247. Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(5): p. 1251-3.
248. Duggan, A.E., et al., *Appendectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study*. *Gut*, 1998. **43**(4): p. 494-8.
249. Gilat, T., et al., *Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study*. *Scand J Gastroenterol*, 1987. **22**(8): p. 1009-24.
250. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
251. Lashner, B.A., S.V. Kane, and S.B. Hanauer, *Lack of association between oral contraceptive use and Crohn's disease: a community-based matched case-control study*. *Gastroenterology*, 1989. **97**(6): p. 1442-7.
252. Irvine, E.J. and J.K. Marshall, *Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1740-4.
253. Sun, Y., et al., *Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo*. *Gut*, 2004. **53**(3): p. 362-7.
254. Ortega-Cava, C.F., et al., *Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut*. *J Immunol*, 2003. **170**(8): p. 3977-85.
255. Frolova, L., et al., *Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis*. *J Histochem Cytochem*, 2008. **56**(3): p. 267-74.
256. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.
257. Elson, C.O., et al., *Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma*. *Semin Immunol*, 2001. **13**(3): p. 187-94.
258. Maeda, S., et al., *Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing*. *Science*, 2005. **307**(5710): p. 734-8.
259. Niess, J.H., *Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(33): p. 5138-48.
260. Nakazawa, A., et al., *The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(5): p. 1347-57.
261. Ina, K., et al., *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 1081-90.
262. Brimnes, J., et al., *Enteric bacterial antigens activate CD4(+) T cells from scid mice with inflammatory bowel disease*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(1): p. 23-31.
263. Peluso, I., F. Pallone, and G. Monteleone, *Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(35): p. 5606-10.



264. Heller, F., et al., *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 629-38.
265. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
266. Schmidt, C., et al., *Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(1): p. 16-23.
267. Yen, D., et al., *IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1310-6.
268. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
269. Goebel, S., et al., *VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(4): p. G648-54.
270. Keshavarzian, A., et al., *Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(5): p. 720-8.
271. Leeb, S.N., et al., *Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase*. Gastroenterology, 2003. **125**(5): p. 1341-54.
272. Kirkegaard, T., et al., *Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease*. Gut, 2004. **53**(5): p. 701-9.
273. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Mouse models of inflammatory bowel disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(11): p. 1073-83.
274. Wirtz, S., et al., *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. Nature protocols, 2007. **2**(3): p. 541-6.
275. Dieleman, L.A., et al., *Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice*. Gastroenterology, 1994. **107**(6): p. 1643-52.
276. 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.
277. 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.
278. Kaur, N. and A.K. Gupta, *Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition*. J Biosci, 2002. **27**(7): p. 703-14.
279. Priebe, M.G., et al., *The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics*. Eur J Nutr, 2002. **41 Suppl 1**: p. I2-10.
280. sako, T.M., K. Tanaka, R., *Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides*. Int Dairy Journal, 1999. **9**(1): p. 69-80.
281. Van Loo, J., et al., *Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095)*. Br J Nutr, 1999. **81**(2): p. 121-32.
282. Hasler, C.M., *Pre- and probiotics: where are we today? Introduction*. Br J Nutr, 1998. **80**(4): p. S195.
283. Charalampopoulos, D., et al., *Application of cereals and cereal components in functional foods: a*

- review. *Int J Food Microbiol*, 2002. **79**(1-2): p. 131-41.
284. Korhonen, H., *Technology options for new nutritional concepts*. *Int. J. Dairy Technol*, 2002. **55**(2): p. 79-88.
285. Ziemer, C.J., Gibson, G.R., *An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies*. *Int Dairy Journal*, 1998. **8**(5-6): p. 473-479.
286. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid, *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. *J Nutr*, 1995. **125**(6): p. 1401-12.
287. Knol, J., et al., *Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005. **40**(1): p. 36-42.
288. Moro, G., et al., *Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002. **34**(3): p. 291-5.
289. Tuohy, K.M., et al., *The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides--a human volunteer study*. *Br J Nutr*, 2001. **86**(3): p. 341-8.
290. Salminen, S., et al., *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. *Br J Nutr*, 1998. **80 Suppl 1**: p. S147-71.
291. Blaut, M., *Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora*. *Eur J Nutr*, 2002. **41 Suppl 1**: p. I11-6.
292. Brandt, L.A., *Prebiotics enhance gut health*. *Prepared Foods*, 2001. **170**(9): p. NS7-NS10.
293. Hirayama, M., *Novel physiological functions of oligosaccharides*. *Pure Appl. Chem*, 2004. **74**(7): p. 1271-1279.
294. Teitelbaum, J.E. and W.A. Walker, *Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms*. *Annu Rev Nutr*, 2002. **22**: p. 107-38.
295. Roberfroid, M.B. and N.M. Delzenne, *Dietary fructans*. *Annu Rev Nutr*, 1998. **18**: p. 117-43.
296. Gibson, G.R., et al., *Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin*. *Gastroenterology*, 1995. **108**(4): p. 975-82.
297. Sako, T., Natsumoto, K., and Tanaka, R., *Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides*. *Int. Dairy J.*, 1999. **9**(1): p. 69-80.
298. Scholz-Ahrens, K.E., et al., *Effects of prebiotics on mineral metabolism*. *Am J Clin Nutr*, 2001. **73**(2 Suppl): p. 459S-464S.
299. Manning, T.S. and G.R. Gibson, *Microbial-gut interactions in health and disease*. *Prebiotics*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2004. **18**(2): p. 287-98.
300. Conway, P.L., *Prebiotics and human health: the state-of-the-art and future perspectives*. *Scand. J. Nutr*, 2001. **45**: p. 13-21.
301. Roberfroid, M.B., *Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties*. *Br J Nutr*, 1998. **80**(4): p. S197-202.
302. Johnson, I.T., *New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract*. *Mutat Res*, 2004. **551**(1-2): p. 9-28.
303. Tunland, B.C., and Meyer, D., *Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food*. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saety*, 2002. **1**(3): p. 90-109.
304. Wollowski, I., G. Rechkemmer, and B.L. Pool-Zobel, *Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer*. *Am J Clin Nutr*, 2001. **73**(2 Suppl): p. 451S-455S.
305. Bornet, F.R. and F. Brouns, *Immune-stimulating and gut health-promoting properties of*

- short-chain fructo-oligosaccharides. *Nutr Rev*, 2002. **60**(10 Pt 1): p. 326-34.
306. van Dokkum, W., et al., *Effect of nondigestible oligosaccharides on large-bowel functions, blood lipid concentrations and glucose absorption in young healthy male subjects*. *Eur J Clin Nutr*, 1999. **53**(1): p. 1-7.
307. Delzenne, N.M. and C.M. Williams, *Prebiotics and lipid metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2002. **13**(1): p. 61-7.
308. Oku, T., *Oligosaccharides with beneficial health effects: a Japanese perspective*. *Nutr Rev*, 1996. **54**(11 Pt 2): p. S59-66.
309. Bosscher, D., J. Van Loo, and A. Franck, *Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases*. *Nutr Res Rev*, 2006. **19**(2): p. 216-26.
310. Schley, P.D. and C.J. Field, *The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics*. *Br J Nutr*, 2002. **87 Suppl 2**: p. S221-30.
311. Kelly-Quagliana, K.A., Nelson, P.D., Buddington, R.K., *Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice*. *Nutr Res*, 2003. **23**(2): p. 257-267.
312. Newburg, D.S., G.M. Ruiz-Palacios, and A.L. Morrow, *Human milk glycans protect infants against enteric pathogens*. *Annu Rev Nutr*, 2005. **25**: p. 37-58.
313. Otnaess, A.B., A. Laegreid, and K. Ertresvag, *Inhibition of enterotoxin from Escherichia coli and Vibrio cholerae by gangliosides from human milk*. *Infect Immun*, 1983. **40**(2): p. 563-9.
314. Shoaf, K., et al., *Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic Escherichia coli to tissue culture cells*. *Infect Immun*, 2006. **74**(12): p. 6920-8.
315. Bode, L., et al., *Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides*. *Thromb Haemost*, 2004. **92**(6): p. 1402-10.
316. Rudloff, S., et al., *Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk*. *Eur J Nutr*, 2002. **41**(2): p. 85-92.
317. Naarding, M.A., et al., *Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(11): p. 3256-64.
318. Velupillai, P. and D.A. Harn, *Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosoma-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(1): p. 18-22.
319. Eiwegger, T., et al., *Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010. **21**(8): p. 1179-88.
320. Eiwegger, T., et al., *Human milk-derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro*. *Pediatr Res*, 2004. **56**(4): p. 536-40.
321. Suzuki, T. and H. Hara, *Various nondigestible saccharides open a paracellular calcium transport pathway with the induction of intracellular calcium signaling in human intestinal Caco-2 cells*. *J Nutr*, 2004. **134**(8): p. 1935-41.
322. Roberfroid, M.B., *Introducing inulin-type fructans*. *Br J Nutr*, 2005. **93 Suppl 1**: p. S13-25.
323. Kleessen, B., L. Hartmann, and M. Blaut, *Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal*

- flora*. Br J Nutr, 2001. **86**(2): p. 291-300.
324. Weaver, C.M. and M. Liebman, *Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis*. Br J Nutr, 2002. **88 Suppl 2**: p. S225-32.
325. Delzenne, N.M., et al., *Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects*. Br J Nutr, 2002. **87 Suppl 2**: p. S255-9.
326. Guarner, F., *Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders*. Br J Nutr, 2005. **93 Suppl 1**: p. S61-5.
327. Pool-Zobel, B.L., *Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data*. Br J Nutr, 2005. **93 Suppl 1**: p. S73-90.
328. Taper, H.S. and M. Roberfroid, *Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth*. J Nutr, 1999. **129**(7 Suppl): p. 1488S-91S.
329. Taper, H.S., N.M. Delzenne, and M.B. Roberfroid, *Growth inhibition of transplantable mouse tumors by non-digestible carbohydrates*. Int J Cancer, 1997. **71**(6): p. 1109-12.
330. Taper, H.S. and M.B. Roberfroid, *Inhibitory effect of dietary inulin or oligofructose on the development of cancer metastases*. Anticancer Res, 2000. **20**(6B): p. 4291-4.
331. Taper, H.S. and M.B. Roberfroid, *Inulin/oligofructose and anticancer therapy*. Br J Nutr, 2002. **87 Suppl 2**: p. S283-6.
332. Taper, H.S. and M.B. Roberfroid, *Non-toxic potentiation of cancer radiotherapy by dietary oligofructose or inulin*. Anticancer Res, 2002. **22**(6A): p. 3319-23.
333. Akiyama, K., et al., *Production of galactooligosaccharides from lactose using a beta-glucosidase from Thermus sp. Z-1*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. **65**(2): p. 438-41.
334. Hsu, C.A., S.L. Lee, and C.C. Chou, *Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from Bifidobacterium longum BCRC 15708*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(6): p. 2225-30.
335. Kunz, C., et al., *Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 699-722.
336. Gnoth, M.J., et al., *Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3014-20.
337. Newburg, D.S., *Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens*. Curr Med Chem, 1999. **6**(2): p. 117-27.
338. Martinez-Ferez A., R.S., Guadix A., Henkel CA., Pohlentz G., Boza JJ., Guadix EM., *Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology*. Int Dairy Journal, 2006. **16**: p. 173-81.
339. Abril, M.A., et al., *Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway*. J Bacteriol, 1989. **171**(12): p. 6782-90.
340. Fredheim, E.G., et al., *Biofilm formation by Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(4): p. 1172-80.
341. Hay, I.D., U. Remminghorst, and B.H. Rehm, *MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(4): p. 1110-20.
342. Smith, A.J., T.E. Cawston, and B.L. Hazleman, *A rapid and reproducible method for the analysis of immune complexes*

- using affinity chromatography and Western blotting. *J Immunol Methods*, 1985. **84**(1-2): p. 125-34.
343. Halprin, K.M. and A. Ohkawara, *Lactate production and lactate dehydrogenase in the human epidermis*. *J Invest Dermatol*, 1966. **47**(3): p. 222-9.
344. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. *Cell*, 2004. **118**(2): p. 229-41.
345. 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.
346. Dahlqvist, A., *Assay of intestinal disaccharidases*. *Anal Biochem*, 1968. **22**(1): p. 99-107.
347. 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.
348. Kerr, T.A., et al., *Dextran sodium sulfate inhibition of real-time polymerase chain reaction amplification: a poly-A purification solution*. *Inflamm Bowel Dis*, 2012. **18**(2): p. 344-8.
349. Asano, T., *Modification of cecal size in germfree rats by long-term feeding of anion exchange resin*. *Am J Physiol*, 1969. **217**(4): p. 911-8.
350. Lin, M.Y., I.A. Munshi, and A.J. Ouellette, *The defensin-related murine CRS1C gene: expression in Paneth cells and linkage to Defcr, the cryptdin locus*. *Genomics*, 1992. **14**(2): p. 363-8.
351. Ouellette, A.J. and J.C. Lualdi, *A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides. Regulation in small intestine and cells of myeloid origin*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(17): p. 9831-7.
352. Garrido, D., D. Barile, and D.A. Mills, *A molecular basis for bifidobacterial enrichment in the infant gastrointestinal tract*. *Adv Nutr*, 2012. **3**(3): p. 415S-215S.
353. Kondepudi, K.K., et al., *Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 2012. **18**(5): p. 489-97.
354. Knol, J., et al., *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 Suppl*, 2005. **94**(449): p. 31-3.
355. Fermín Capitán-Cañadas, M.O.-G., Emilia Guadix, Antonio Zarzuelo, María Dolores Suárez, Fermín Sánchez de Medina, Olga Martínez-Augustin, *Prebiotic Oligosaccharides Directly Modulate Proinflammatory Cytokine Production in Monocytes Via Activation of TLR4*. *Molecular Nutrition & Food Research*. **in press**.
356. Daddaoua, A., et al., *Genes for carbon metabolism and the ToxA virulence factor in Pseudomonas aeruginosa are regulated through molecular interactions of PtxR and PtxS*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e39390.
357. Nenaah, G., *Antimicrobial activity of Calotropis procera Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013. **29**(7): p. 1255-62.
358. Livermore, D.M., *Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare?*

- Clin Infect Dis, 2002. **34**(5): p. 634-40.
359. Yasuda, A., et al., *Dietary supplementation with fructooligosaccharides attenuates allergic peritonitis in mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **422**(4): p. 546-50.
360. Ehrchen, J.M., et al., *The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer.* J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 557-66.
361. Piccinini, A.M. and K.S. Midwood, *DAMPening inflammation by modulating TLR signalling.* Mediators Inflamm, 2010. **2010**.
362. Zenhom, M., et al., *Prebiotic oligosaccharides reduce proinflammatory cytokines in intestinal Caco-2 cells via activation of PPARgamma and peptidoglycan recognition protein 3.* J Nutr, 2011. **141**(5): p. 971-7.
363. 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.
364. 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.
365. Sainathan, S.K., et al., *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental colitis.* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(1): p. 88-99.
366. 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.
367. Kuhl, A.A., et al., *Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils.* Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1882-92.
368. 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.
369. Dianda, L., et al., *T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment.* Am J Pathol, 1997. **150**(1): p. 91-7.
370. Schultz, M., et al., *IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation.* Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 1): p. G1461-72.
371. Marteau, P., P. Seksik, and F. Shanahan, *Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(1): p. 47-61.
372. Shanahan, F., *Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **278**(2): p. G191-6.
373. Kitajima, S., et al., *Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice.* Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science, 2001. **50**(5): p. 387-95.
374. Hudcovic, T., et al., *The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice.* Folia Microbiol (Praha), 2001. **46**(6): p. 565-72.
375. Meslin, J.C., et al., *Effects of galacto-oligosaccharide and bacterial status on mucin distribution in mucosa and on large intestine fermentation in rats.* Br J Nutr, 1993. **69**(3): p. 903-12.

376. Bjorkholm, B., et al., *Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6958.
377. Muramatsu, T., et al., *The influence of the gut microflora on protein synthesis in liver and jejunal mucosa in chicks*. Br J Nutr, 1983. **49**(3): p. 453-62.
378. Visek, W.J., *Urease Immunity in Liver Disease: A New Approach*. Gastroenterology, 1964. **46**: p. 326-9.
379. Visek, W.J., *Some biochemical considerations in utilization of nonspecific nitrogen*. J Agric Food Chem, 1974. **22**(2): p. 174-84.
380. Cheeseman, G.C. and R. Fuller, *A study by high voltage electrophoresis of the amino acid decarboxylases and arginine dihydrolase of bacteria isolated from the alimentary tract of pigs*. J Appl Bacteriol, 1966. **29**(3): p. 596-606.
381. Kozakova, H., et al., *Differences in enterocyte brush border enzyme activities in ageing rats reared in germ-free and conventional conditions*. Physiol Res, 1998. **47**(4): p. 253-8.
382. Whitt, D.D. and D.C. Savage, *Influence of indigenous microbiota on amount of protein and activities of alkaline phosphatase and disaccharidases in extracts of intestinal mucosa in mice*. Appl Environ Microbiol, 1981. **42**(3): p. 513-20.
383. Kawai, Y. and M. Morotomi, *Intestinal enzyme activities in germfree, conventional, and gnotobiotic rats associated with indigenous microorganisms*. Infect Immun, 1978. **19**(3): p. 771-8.
384. Reddy, B.S. and B.S. Wostmann, *Intestinal disaccharidase activities in the growing germfree and conventional rats*. Arch Biochem Biophys, 1966. **113**(3): p. 609-16.
385. Dahlqvist, A., B. Bull, and B.E. Gustafsson, *Rat Intestinal 6-Bromo-2-Naphthyl Glycosidase and Disaccharidase Activities. I. Enzymic Properties and Distribution in the Digestive Tract of Conventional and Germ-Free Animals*. Arch Biochem Biophys, 1965. **109**: p. 150-8.
386. Leforestier, G., et al., *Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice*. Eur J Nutr, 2009. **48**(8): p. 457-64.
387. Lopez-Posadas, R., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(2): p. 543-56.
388. Martinez-Augustin, O., et al., *It may not be intestinal, but tissue non-specific alkaline phosphatase*. Gut, 2010. **59**(4): p. 560; author reply 560.
389. Williams, J., et al., *The effects of fructo-oligosaccharides or whole wheat on the performance and digestive tract of broiler chickens*. Br Poult Sci, 2008. **49**(3): p. 329-39.
390. Thurl, S., B. Muller-Werner, and G. Sawatzki, *Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography*. Anal Biochem, 1996. **235**(2): p. 202-6.
391. van Hoffen, E., et al., *A specific mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy*. Allergy, 2009. **64**(3): p. 484-7.
392. Daubioul, C.A., et al., *Dietary oligofructose lessens hepatic steatosis, but does not prevent hypertriglyceridemia in obese Zucker rats*. J Nutr, 2000. **130**(5): p. 1314-9.
393. Nakamura, Y., et al., *Fructooligosaccharides suppress high-fat diet-induced fat*

- accumulation in C57BL/6J mice. *Biofactors*, 2011.
394. Velagapudi, V.R., et al., *The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice*. *J Lipid Res*, 2010. **51**(5): p. 1101-12.
395. Sugatani, J., et al., *Dietary inulin alleviates hepatic steatosis and xenobiotics-induced liver injury in rats fed a high-fat and high-sucrose diet: association with the suppression of hepatic cytochrome P450 and hepatocyte nuclear factor 4alpha expression*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(10): p. 1677-87.
396. Chen, H.L., et al., *Antioxidative and hepatoprotective effects of fructo-oligosaccharide in d-galactose-treated Balb/cJ mice*. *Br J Nutr*, 2011. **105**(6): p. 805-9.
397. Lopez, H.W., et al., *Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats*. *J Nutr Biochem*, 2000. **11**(10): p. 500-8.
398. Aufreiter, S., J.H. Kim, and D.L. O'Connor, *Dietary oligosaccharides increase colonic weight and the amount but not concentration of bacterially synthesized folate in the colon of piglets*. *J Nutr*, 2011. **141**(3): p. 366-72.
399. Lobo, A.R., et al., *Effects of fructans-containing yacon (Smallanthus sonchifolius Poepp and Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats*. *Br J Nutr*, 2007. **97**(4): p. 776-85.
400. Wang, Y., et al., *Fructo-oligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice*. *Nutrition*, 2010. **26**(3): p. 305-11.
401. 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.
402. 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.
403. Rodenburg, W., et al., *Impaired barrier function by dietary fructo-oligosaccharides (FOS) in rats is accompanied by increased colonic mitochondrial gene expression*. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 144.
404. Fukasawa, T., et al., *Identification of marker genes for intestinal immunomodulating effect of a fructooligosaccharide by DNA microarray analysis*. *J Agric Food Chem*, 2007. **55**(8): p. 3174-9.
405. Reichert, M., et al., *The Prrx1 homeodomain transcription factor plays a central role in pancreatic regeneration and carcinogenesis*. *Genes Dev*, 2013. **27**(3): p. 288-300.
406. Lelkes, Z., et al., *Effects of acute and chronic treatment with an atypical antidepressant drug, nomifensine, on the sleep-wake activity in rats*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1987. **335**(2): p. 149-53.
407. Ocana, O.H., et al., *Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(6): p. 709-24.
408. Takahashi, Y., et al., *Paired related homoeobox 1, a new EMT inducer, is involved in metastasis and poor prognosis in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2013. **109**(2): p. 307-11.
409. Zarrilli, R., et al., *Constitutive insulin-like growth factor-II expression interferes with the enterocyte-like differentiation of*



- CaCo-2 cells. *J Biol Chem*, 1996. **271**(14): p. 8108-14.
410. Dullens, S.P., et al., *Differentiated CaCo-2 cells as an in-vitro model to evaluate de-novo apolipoprotein A-I production in the small intestine*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **21**(6): p. 642-9.
411. Ricchi, P., et al., *Effect of aspirin on cell proliferation and differentiation of colon adenocarcinoma Caco-2 cells*. *Int J Cancer*, 1997. **73**(6): p. 880-4.
412. Fleet, J.C., et al., *Gene expression profiling of Caco-2 BBe cells suggests a role for specific signaling pathways during intestinal differentiation*. *Physiol Genomics*, 2003. **13**(1): p. 57-68.
413. Wang, Y., et al., *Human apolipoprotein A-II protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(2): p. 224-31.
414. Pastier, D., et al., *Apolipoprotein A-II/A-I ratio is a key determinant in vivo of HDL concentration and formation of pre-beta HDL containing apolipoprotein A-II*. *Biochemistry*, 2001. **40**(41): p. 12243-53.
415. Mansbach, C.M., P. Tso, and A. Kuksis, *Intestinal Lipid Metabolism*. 2000: Springer US.
416. Felgines, C., et al., *The effect of dietary fiber on apolipoprotein A-I and A-IV gene expression in rat intestine*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1993. **39**(4): p. 371-5.
417. Sonoyama, K., et al., *Apolipoprotein mRNA in liver and intestine of rats is affected by dietary beet fiber or cholestyramine*. *J Nutr*, 1995. **125**(1): p. 13-9.
418. Mazur, A., et al., *Apolipoprotein B gene expression in rat intestine. The effect of dietary fiber*. *FEBS Lett*, 1991. **284**(1): p. 63-5.
419. Meinel, W., et al., *Impact of gut microbiota on intestinal and hepatic levels of phase 2 xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat*. *Drug Metab Dispos*, 2009. **37**(6): p. 1179-86.
420. Esworthy, R.S., et al., *Microflora trigger colitis in mice deficient in selenium-dependent glutathione peroxidase and induce Gpx2 gene expression*. *Biol Chem*, 2003. **384**(4): p. 597-607.
421. Hrdina, J., et al., *The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice*. *J Nutr Biochem*, 2009. **20**(8): p. 638-48.
422. D'Souza, A., et al., *Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats*. *Pediatr Res*, 2010. **67**(5): p. 526-31.
423. Larsson, E., et al., *Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88*. *Gut*, 2012. **61**(8): p. 1124-31.
424. Azuma, H., et al., *Enteral supplementation enriched with glutamine, fiber, and oligosaccharide prevents gut translocation in a bacterial overgrowth model*. *J Trauma*, 2009. **66**(1): p. 110-4.
425. Ten Bruggencate, S.J., et al., *Dietary fructooligosaccharides increase intestinal permeability in rats*. *J Nutr*, 2005. **135**(4): p. 837-42.
426. Ten Bruggencate, S.J., et al., *Dietary fructooligosaccharides affect intestinal barrier function in healthy men*. *J Nutr*, 2006. **136**(1): p. 70-4.
427. Olguin, F., et al., *Prebiotic ingestion does not improve gastrointestinal barrier function in burn patients*. *Burns*, 2005. **31**(4): p. 482-8.

428. Cresci, G.A., et al., *Colonic gene expression in conventional and germ-free mice with a focus on the butyrate receptor GPR109A and the butyrate transporter SLC5A8*. *J Gastrointest Surg*, 2010. **14**(3): p. 449-61.
429. Mutch, D.M., et al., *Impact of commensal microbiota on murine gastrointestinal tract gene ontologies*. *Physiol Genomics*, 2004. **19**(1): p. 22-31.
430. Fernandes, D.J., et al., *Understanding the shape-memory alloys used in orthodontics*. *ISRN Dent*, 2011. **2011**: p. 132408.
431. Coates, M.E., H.A. Gordon, and B.S. Wostmann, *The germ-free animal in research*. 1968: Academic Press.
432. Szentkuti, L., et al., *Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats*. *Histochem J*, 1990. **22**(9): p. 491-7.
433. Goodman, L.L.S., et al., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 2011: McGraw-Hill Medical.
434. Sasaki, S., A. Ōzawa, and K. Hashimoto, *Recent advances in germfree research: proceedings of the VIIth International Symposium on Gnotobiology, 1981, Tokyo, Japan*. 1981: Tokai University Press.
435. Thorin, E. and M. Clozel, *The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1*. *Adv Pharmacol*, 2010. **60**: p. 1-26.
436. Kuhn, M., et al., *Endothelin-1 potently stimulates chloride secretion and inhibits Na(+)-glucose absorption in human intestine in vitro*. *J Physiol*, 1997. **499 ( Pt 2)**: p. 391-402.
437. Kiyohara, T., et al., *Effect of endothelin 1 on ion transport in isolated rat colon*. *Gastroenterology*, 1993. **104**(5): p. 1328-36.
438. Brown, M.A. and P.L. Smith, *Endothelin: a potent stimulator of intestinal ion secretion in vitro*. *Regul Pept*, 1991. **36**(1): p. 1-19.
439. Perez-Navarro, R., et al., *Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis*. *Life Sci*, 2005. **76**(13): p. 1489-501.
440. Romero-Calvo, I., et al., *Intestinal inflammation and the enterocyte transportome*. *Biochem Soc Trans*, 2011. **39**(4): p. 1096-101.

## **ANEXO**

## Índice de Esquemas

Esquema 1: Esquema diferenciación linfocitos T CD4+

Esquema 2: Ruta de señalización de TLR4.

Esquema 3: Ruta de señalización de NF- $\kappa$ B

Esquema 4: Rutas de señalización de las MAPK

Esquema 5: absorción iónica en el epitelio intestinal

Esquema 6: Secreción iónica en el epitelio intestinal

Esquema 7: Estructura de los oligosacáridos. A) Fructooligosacáridos y B) galactooligosacáridos.

Esquema 8: Diseño experimental: efecto de los OND en ratones libre de gérmenes y convencionales

Esquema 9: Diseño experimental: depleción de microbiota.

Esquema 10: Diseño experimental: Colitis experimental inducida por DSS en ratones libres de gérmenes

Esquema 11: Diseño experimental: Expresión de transportadores en colitis experimental inducida por DSS en ratones pseudo estériles.

## Índice de tablas

Tabla 1: clasificación de citoquinas y quimioquinas

Tabla 2: Patrón de expresión de TLR y sus ligandos

Tabla 3: Índice de daño macroscópico

Tabla 4: Secuencia de los cebadores utilizados en PCR

Tabla 5: Número de genes cuya expresión está modificada de forma estadísticamente significativa en yeyuno de ratones libres de gérmenes

Tabla 6: Número de genes cuya expresión está modificada de forma estadísticamente significativa en colon de ratones libres de gérmenes

Tabla 7: Funciones moleculares modificadas en yeyuno en ratones libres de gérmenes tratados con los OND.

Tabla 8: Funciones moleculares modificadas en colon en ratones libres de gérmenes tratados con los OND

Índice de figuras

Figura 1: Efecto de FOS e inulina sobre la proliferación de *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 2: Formación de biopelículas por *P. aeruginosa*

Figura 3: Efecto de FOS e inulina en la motilidad de *P. aeruginosa*.

Figura 4: Efecto de FOS e inulina en la respuesta inflamatoria de los macrófagos contra *P. aeruginosa*.

Figura 5: Efecto de FOS e inulina en la activación de NF- $\kappa$ B por *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 6: Efecto de las distintas cepas de *P. aeruginosa* PAO1 en macrófagos.

Figura 7: Efecto de inulina y FOS en la respuesta inflamatoria de los macrófagos contra las distintas cepas de *P. aeruginosa*.

Fig 8: Expresión de exotoxina A en células IEC18 infectadas con *P. aeruginosa* tratadas con FOS e inulina.

Figura 9: Producción de GRO $\alpha$  y MCP1 inducida por los OND en la línea celular IEC18

Figura 10. Secreción de citoquinas e ICAM inducida por LPS y los OND en la línea celular IEC18

Figura 11: Secreción de citoquinas inducida por los OND en IEC18 tratadas con inhibidores de NF- $\kappa$ B y PI3K

Figura 12: Efecto de los inhibidores de MAPK en la producción de citoquinas inducida por los OND en células IEC18.

Figura 13: Efecto del silenciamiento de TLR4 en la secreción de citoquinas inducida por los OND en IEC18.

Figura 14: Efecto del silenciamiento de MyD88 en la secreción de citoquinas inducida por los OND en IEC18

Figura 15: Correlación entre la respuesta de las células epiteliales a LPS y OND y la expresión constitutiva de TLR4.

Figura 16: Producción de MCP1 inducida por OND en explantes colónicos de ratones con delección génica de TLR4.

Figura 17: Interacción entre los OND y LPS en células IEC18.

Figura 18: Ratio relativas en el tratamiento con OND en ratones convencionales y libres de gérmenes

Figura 19: Peso de los segmentos intestinales en el tratamiento con OND en ratones convencionales y libres de gérmenes.

Figura 20: Longitud de los segmentos intestinales en el tratamiento con OND en ratones convencionales y libres de gérmenes.

Figura 21: Tinción eosina-hematoxilina en muestras histológicas de yeyuno en el tratamiento con OND en ratones libres de gérmenes.

Figura 22: Relación mg de proteína y gr de tejido en yeyuno en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND

Figura 23: Actividad fosfatasa alcalina en distintos segmentos intestinales en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND

Figura 24: Actividad leucín amino peptidasa en distintos segmentos intestinales en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.

Figura 25: Actividad sacarasa en distintos segmentos intestinales en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND.

Figura 26: Actividad maltasa en distintos segmentos intestinales en ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND

Figura 27: Sensibilidad de la AP a su inhibidor (levamisol) en colon de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND

Figura 28: Concentración de Inmunoglobulinas en plasma.

Figura 29: Número de genes cuya expresión está modificada de forma estadísticamente significativa en yeyuno de ratones libres de gérmenes

Figura 30: Número de genes cuya expresión está modificada de forma estadísticamente significativa en colon de ratones libres de gérmenes

Figura 31: Modificación de la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico y bioquímica de moléculas de pequeño tamaño en colon

Figura 32: Modificación en la expresión de genes en ratones libres de gérmenes tratados con los OND.

Figura 33: Modificación en la expresión de genes en ratones libres de gérmenes tratados con los OND.

Figura 34: Determinación de la expresión de claudinas y ocludina mediante RT-PCR en colon de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND

Figura 35: Determinación de la expresión de moléculas secretadas en colon de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND

Figura 36: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos mediante RT-PCR en colon de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND

Figura 37: Validación de los datos obtenidos mediante *microarrays* en el tratamiento con OND en animales libres de gérmenes

Figura 38: Concentración de aldosterona y corticosterona en plasma de ratones convencionales y libres de gérmenes tratados con OND

Figura 39: Cuantificación de bacterias en heces en ratones pseudo estériles

Figura 40: Evolución del peso corporal y parámetros macroscópicos en ratones pseudo estériles.

Figura 41: Porcentaje de materia seca en heces de ratones pseudo estériles

Figura 42: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos por RT-PCR en ratones pseudo estériles.

Figura 43: Absorción colónica en ratones pseudo estériles

Figura 44: Evolución del peso corporal en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes

Figura 45: Parámetros macroscópicos en el modelo de colitis experimental inducida por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes.

Figura 46: Actividades enzimáticas en colon en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes

Figura 47: Expresión colónica de distintos marcadores de inflamación y de integridad de la función barrera de la mucosa en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones convencionales y libres de gérmenes

Figura 48: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos mediante RT-PCR en ratones convencionales y libres de gérmenes

Figura 48: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos mediante RT-PCR en ratones convencionales y libres de gérmenes

Figura 50: Cuantificación de bacterias en heces en ratones pseudo estériles.

Figura 51 Evolución del peso corporal y parámetros macroscópicos en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones pseudo estériles

Figura 52: Actividades enzimáticas en colon en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones pseudo estériles.

Figura 53: Tinción eosina-hematoxilina en muestras histológicas de colon en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones pseudo estériles.

Figura 54: Expresión colónica de distintos marcadores de inflamación en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones pseudo estériles

Figura 55: Evolución del porcentaje de materia seca en heces en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones pseudo estériles



Figura 56: Absorción colónica en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones pseudo estériles

Figura 57 Concentración de iones y proteínas en suero en el modelo de colitis inducida por DSS en ratones pseudo estériles

Figura 58: Determinación de la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de agua y electrolitos en colon por RT-PCR en el modelo de colitis inducido por DSS en ratones pseudo estériles.